

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİMİN (ACE, E.C. 3.4.15.1) AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE KOYUN AKCİĞERİNDEN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Fatih AYDIN  
DANIŞMAN: Prof. Dr. Vedat TÜRKÖĞLU

VAN-2021



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

**ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİMİN (ACE, E.C. 3.4.15.1) AFİNİTE  
KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE KOYUN AKCİĞERİNDEN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Fatih AYDIN

VAN-2021



## KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU danışmanlığında, Fatih AYDIN tarafından sunulan “**Anjiotensin Konverting Enzimin (ACE, E.C. 3.4.15.1) Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Koyun Akciğerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 31/12/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN

İmza:

Üye: Dr. Öğrt. Üyesi Zehra BAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.01.2021 tarih ve 2021/4-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.





## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.



Fahih AYDIN



## ÖZET

### ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİMİN (ACE, E.C.3.4.15.1) AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİYLE KOYUN AKCİĞERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

AYDIN, Fatih  
Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU  
Ocak 2021, 82 sayfa

Anjiotensin konverting enzim (ACE; EC 3.4.15.1), renin-anjiotensin sisteminin düzenlenmesiyle kan basıncının korunmasına yardımcı olan bir dipeptidil karboksipeptidaz enzimidir. ACE, inaktif dekapeptid anjiotensin I'i, etkili bir vazokonstriktör olan aktif bir oktapeptit anjiotensin II'ye dönüştürür ve böylece kan basıncını düzenler. Aynı zamanda bu enzim; kinin-kallikrein sistemindeki vazodilatör bradikininini inaktive eder. Hipertansiyon; inme, koroner kalp hastalığı, ateroskleroz ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklar için en önemli risk faktörlerinden biridir. Bu nedenle son yıllarda ACE enzimine ilgi artmış ve bu enzimle ilgili çalışmalar çoğalmıştır. Hipertansiyon ACE enziminin inhibisyonu ile tedavi edilebilir. Enzim inhibisyonu çalışabilmek için saf enzim ile çalışmak çok daha doğru sonuçlar verir.

Bu çalışmada ACE, koyun akciğerinden homojenizasyon ve santrifüj basamaklarından sonra afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta saflaştırılmıştır ve karakterize edilmiştir. Enzimin saflaştırma oranı 6405 kat ve spesifik aktivite 16871 EU/mg protein olarak hesaplanmıştır. ACE enziminin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir. SDS-PAGE ile ACE enziminin 60 kDa ve 70 kDa molekül ağırlığında iki alt birime sahip olduğu bulunmuştur. Saflaştırılan ACE enziminin optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri belirlenmiştir. Saf ACE için optimum sıcaklık ve optimum pH değerleri sırasıyla 40 °C ve 7.4'dür.

**Anahtar kelimeler:** Anjiotensin konverting enzim, Karakterizasyon, Saflaştırma.



## ABSTRACT

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE, E.C.3.4.15.1) FROM SHEEP LUNG BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY METHOD

AYDIN, Fatih

M. Sc., Thesis Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

January 2021, 82 pages

Angiotensin converting enzyme (ACE; EC 3.4.15.1) is a dipeptidyl carboxypeptidase enzyme that helps maintain blood pressure by regulation of the renin-angiotensin system. ACE converts the inactive decapeptide angiotensin I into an active octapeptide angiotensin II, which is an effective vasoconstrictor, thereby regulating blood pressure. At the same time, ACE inactivates the vasodilator bradykinin in the kinin-kallikrein system. Hypertension is one of the most important risk factors for cardiovascular diseases such as stroke, coronary heart disease, atherosclerosis and heart failure. For this reason, interest in ACE enzyme has increased in recent years and studies on this enzyme have increased. Hypertension can be treated by inhibition of the ACE enzyme. Working with pure enzyme gives much more accurate results in order to work on enzyme inhibition.

In this study, ACE was purified and characterized in one step by affinity chromatography method after homogenization and centrifugation steps from sheep lungs. The purification rate of the enzyme was 6405-fold and the specific activity was calculated to be 16871 EU/mg protein. The purity and molecular weight of the ACE enzyme was determined by SDS-PAGE. Optimum temperature and optimum pH values of the purified ACE enzyme were determined. Optimum temperature and optimum pH values for pure ACE were found as 40 °C and 7.4, respectively.

**Keywords:** Angiotensin converting enzyme, Characterization, Purification.



## ÖN SÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU yönetiminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Yüksek lisans çalışmamın araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda deneyim ve özverisini üzerimden hiç eksik etmeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım saygı değer hocam Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Öğretim Üyesi Zehra BAŞ'a teşekkür ederim.

2020

Fatih AYDIN



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi .....	2
1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim.....	4
1.3. Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri.....	5
1.4. Hipertansiyon.....	7
1.5. Enzimler.....	9
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ .....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal .....	21
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	21
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar .....	21
3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	22
3.1.3.1. Protein tayininde kullanılan çözeltiler.....	22
3.1.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler .....	23
3.1.3.3. Kolon dolgu maddesi için kullanılan çözeltiler.....	23
3.1.3.4. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler .....	23
3.1.3.5. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Protein tayini.....	25
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini .....	25
3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini.....	25

	<b>Sayfa</b>
3.2.2. Afinite kolonunun hazırlanması .....	26
3.2.3. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enziminin saflaştırılması .....	27
3.2.3.1. Koyun akciğeri eldesi.....	27
3.2.3.2. Koyun akciğerinin afinite kolonuna uygulanması ve enzim elüsyonu .....	28
3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ACE'nin saflığının kontrolü .....	29
3.2.5. Koyun akciğeri ACE'nin alt birimlerinin SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarının belirlenmesi .....	31
3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçümü .....	31
3.2.7. ACE ile yapılan kinetik çalışmalar .....	33
3.2.7.1. Koyun akciğeri ACE aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	33
3.2.7.2. Koyun akciğeri ACE aktivitesi üzerine pH'nın etkisi .....	33
4. BULGULAR .....	35
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	35
4.2. Koyun Akciğeri Anjiotensin Konverting Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları .....	35
4.2.1. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enzimi için saflaştırma sonuçları 36	
4.3. Koyun Akciğeri ACE'nin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü.....	38
4.4. Koyun Akciğeri ACE'nin Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar .....	39
4.5. Koyun Akciğeri ACE'nin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları.....	40
4.6. Koyun Akciğeri ACE'nin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları.....	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	43
KAYNAKLAR.....	49
ÖZ GEÇMİŞ.....	55

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. SDS-PAGE için ayırma jeli ve yığma jeli konsantrasyon değerleri .....	30
Çizelge 3.2. Koyun akciğeri ACE'nin aktivite ölçüm kuvvet içeriği .....	33
Çizelge 4.1. Koyun akciğeri ACE'nin saflaştırma basamakları .....	37
Çizelge 4.2. Koyun akciğeri ACE'nin sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri .....	40
Çizelge 4.3. Koyun akciğeri ACE'nin pH, aktivite ve % aktivite değerleri.....	41



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. ACE enziminin FAPGG substratı ile reaksiyonu .....	32
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik .....	35
Şekil 4.2. Afinite kolonundan alınan koyun akciğeri fraksiyonlarının kantitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.....	37
Şekil 4.3. Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE'nin jel elektroforez fotoğrafı ve standart markırın (belirteç) orjinal göstergesi .....	38
Şekil 4.4. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılan standart grafik ....	39
Şekil 4.5. Koyun akciğeri ACE'nin Sıcaklık - % Aktivite grafiği.....	40
Şekil 4.6. Koyun akciğeri ACE'nin pH - % Aktivite grafiği .....	41



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililitre
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
cm Hg	Santimetre civa
mm Hg	Milimetre civa
Da	Dalton
dk	Dakika
EU	Enzim ünitesi
g	Gram
IC <sub>50</sub>	% 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
K <sub>kat</sub>	Turnover sayısı
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	İnhibisyon sabiti
K <sub>M</sub>	Michealis menten sabiti
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
$\mu\text{M}$	Mikromolar

**Simgeler****Açıklama**

<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b>V<sub>max</sub></b>	Maksimum hız

**Kısaltmalar****Açıklama**

<b>ACE</b>	Anjiotensin konverting enzim
<b>ADP</b>	Adenozin difosfat
<b>APS</b>	Amoyum persülfat
<b>AT1</b>	Anjiotensin II tip 1 reseptörü
<b>AT2</b>	Anjiotensin II tip 2 reseptörü
<b>BK</b>	Bradikinin
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetra asetik asit
<b>ES</b>	Enzim-Substrat kompleksi
<b>FAPGG</b>	N-[3-(2-Furil)akriloil]-Fenil-Glisil-Glisin
<b>GC-MS</b>	Gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi
<b>GSH</b>	Redükte glutatyon
<b>GSSG</b>	Okside glutatyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HEPESNa</b>	(2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit sodyum)
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>IMACM @ mPEG</b>	Poli (etilen glikol) metil eter
<b>JG</b>	Jukstaglomerüler
<b>LC-MS/MS</b>	Nano sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi
<b>MR</b>	Mineralokortikoid reseptörü

**Kısaltmalar****Açıklama****Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O**

Sodyum tetra borat

**NaCl**

Sodyum klorür

**NaHCO<sub>3</sub>**

Sodyum bikarbonat

**NaN<sub>3</sub>**

Sodyum azid

**nativ-PAGE**

Nativ-poliakrilamid jel elektroforezi

**NHS**

N-hidroksisüksinimid

**NICE**

Ulusal Sağlık ve Bakım Mükemmellik Enstitüsü

**NMR**

Nükleer manyetik rezonans

**ODS**

Oktadesil silika

**RAAS**

Renin anjiotensin aldosteron sistemi

**RAS**

Renin anjiotensin sistemi

**R<sub>f</sub>**

Göreceli göç

**ROS**

Reaktif oksijen türleri

**SDS-PAGE**

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

**SHR**

Spontan hipertansif ratlar

**TEMED**

N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin

**Tris**

Trihidroksimetil aminometan

**ZnCl<sub>2</sub>**

Çinko klorür

## 1. GİRİŞ

Hipertansiyon, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından dünya çapında morbidite ve mortalite için en önemli risk faktörlerinden biri olarak tanımlanmıştır ve yılda yaklaşık dokuz milyon insanın ölümünden sorumludur. Yüksek tansiyon sadece yaşlı erişkinlerde gelişmez. 2015 yılında İngiltere'de 45 yaşın altındaki 2.1 milyondan fazla insanın yüksek tansiyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bu önemlidir, çünkü hipertansiyon tedavisi sonraki kardiyovasküler hastalık riskinde önemli azalmalar ile sonuçlanır. Bu tür tedaviler için güçlü kanıtlara rağmen, çalışmalar birçok insanın yetersiz kontrol edildiğini göstermektedir. Bu nedenle, toplumdaki yüksek tansiyonun taranması, saptanması ve kontrolünün iyileştirilmesi için yeni teknolojiler de dahil olmak üzere yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Collins ve ark., 1990; Kitt ve ark., 2019).

Yüksek tansiyon, özellikle erken evrelerde büyük ölçüde asemptomatiktir ve 'sessiz katil' olarak tanımlanmasına yol açar. Hastalık yükü ile birlikte hipertansiyonun asemptomatik doğası, rutin kan basıncı taramasını gerektirir. Birleşik Krallık'ta, Ulusal Sağlık ve Bakım Mükemmellik Enstitüsü (NICE) kılavuzları normotansif yetişkinler arasında en az yılda bir kez kan basıncı ölçümü yapılmasını önermektedir. Yeni teknolojiler kullanılarak hekim tabanlı olmayan kan basıncı ölçümlerindeki gelişmeler, hipertansiyonun daha fazla saptanması için bir fırsat sağlayabilir (Wolf-Maier, 2004; Law ve ark., 2009; Kitt ve ark., 2019).

Hipertansiyon, dünya çapında yaklaşık bir milyar insanı etkileyen, dünyadaki kronik sağlık sorunlarından biridir. ACE inhibitörleri, hipertansiyon tedavisi için tıbbi ilaçlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kritik bir dipeptidil karboksipeptidaz olan anjiotensin konverting (dönüştürücü) enzim (ACE), kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. ACE tarafından anjiotensin I'in bölünmesi, kan basıncını artıran aktif bir vazokonstriktör olan anjiotensin II bileşimini oluşturur. Bununla birlikte, ACE aktivitesinin inhibisyonu, anjiotensin II üretimini inhibe eder ve sonuç olarak vazodilatasyona ve kan basıncının düşmesine neden olur (Khong ve Adeyeye, 2019; Singer, 2019).

### 1.1. Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi

Klasik renin anjiotensin aldosteron sisteminin (RAAS) aktivasyonu, renal afferent arteriolün jukstaglomerüler (JG) hücreleri tarafından bir glikoprotein olan renin sentezinden kaynaklanır. JG hücrelerinde preprorenin, prorenin ve daha sonra dolaşımda salgılanan aktif renin için işlenir. Renal renin salınımı; düşük hacimli durumlar, distal tübüllerde yüksek tuz içeriği, renal sempatik sinir aktivitesi ve azalmış renal perfüzyon ile uyarılır. Kanda, bir aspartil proteaz olan renin, dekapeptid anjiotensin I'i oluşturmak için karaciğer kaynaklı anjiotensinojeni ayırır. Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE), etkin olmayan anjiotensin I'i biyolojik olarak aktif oktapeptid anjiotensin II'ye hidrolize eder. ACE esas olarak endotelial hücrelerde (özellikle pulmoner endotelium) bulunur. Anjiotensin I'in parçalanmasına ek olarak, ACE bir vazodilatör olan bradikinin (BK), inaktif BK-(1-7) 'ye metabolize eder. Bu nedenle ACE, vazodilatör olan bradikinin parçalanırken güçlü bir vazokonstriktör olan anjiotensin II'nin üretimini teşvik ettiği için damar sisteminde ikili bir role sahiptir (Carey ve Siragy, 2003; Heeneman ve ark., 2007).

Renin-anjiotensin sistemi (RAS) kan basıncı ve hacim homeostazının fizyolojik düzenlenmesinde ve hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde kritik rol oynar. RAS'ın farmakolojik inhibisyonu, halen hipertansiyonu yönetmek ve kardiyovasküler olay risklerini azaltmak için kullanılan önemli bir terapötik stratejidir. 1890'larda keşfinden bu yana, RAS, dolaşımdaki böbrekten türetilen reninin, hedef dokulardaki reseptörlerine anjiotensin II bağlanması ile kardiyovasküler fonksiyonu düzenleyen bir endokrin sistemi olarak tanımlanmıştır. Yakın zamana kadar bu sistem geleneksel RAS olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, böbreğin renin üretiminin tek kaynağı olmadığı ve kan basıncından bağımsız bir işlevi olan dokularda ve organlarda anjiotensin peptitlerinin oluşturulabileceği açıktır (Ferrario, 2010; Singh ve ark., 2010; Aurelie ve Touyz, 2011).

Tersine, anjiotensinojen yapısal olarak karaciğerden salınır ve renin ile karşılaştırıldığında genellikle fazla bulunur. Düşük sistemik kan basıncı, hipovolemi (vücutta aşırı sıvı kaybı), sodyum yoksunluğu ve sempatik stimülasyon durumunda, artan renin sentezi ve salınımı meydana gelir. Dolaşımda renin, anjiotensinojeni

metabolize ederek anjiotensin I'i serbest bırakır. Endotel hücrelerinden salınan anjiotensin konverting enzim (ACE), anjiotensin I'i anjiotensin II'ye dönüştürür. Anjiotensin II, anjiotensin tip-1 ve tip-2 reseptörleri (AT1R ve AT2R) olmak üzere iki reseptörde etki eder. AT1R'deki anjiotensin II'nin etkileri; artmış sodyum retansiyonuna, vazokonstriksiyona, susuzluk uyarılmasına, artmış sempatik sinir sistemi aktivitesine ve adrenal bezin zona glomerulozadan gelen aldosteron salınımına yol açar (Bader, 2013; De Mello ve Frohlich, 2014).

RAAS'ın terminal (son) hormonu olan Aldosteron, adrenal sekresyonların (salgılarının) mineralokortikoid aktivitesinin % 90'ını uygular ve sodyum, potasyum ve vücut sıvısı dengesinin önemli bir düzenleyicisidir. Aldosteron için en güçlü sekretagog (salgı artırıcı) olan anjiotensin II ve artmış hücre dışı  $K^+$  konsantrasyonu, aldosteron sentazını kodlayan CYP11B2 geninin ekspresyonunu artırır. Mineralokortikoid reseptörü (MR) yoluyla hareket eden aldosteron, epitel dokularında (böbrek, kolon ve tükürük ve ter bezleri) iyon kanallarının, pompaların ve eşanjörlerin (değiştirici) ekspresyonunu modüle eder. Bu sonuçta, transepitelyal  $Na^+$  ve su yeniden emiliminde ve  $K^+$  atılımında bir artışa yol açar. Mineralokortikoid reseptörleri ayrıca retina, beyin, miyokard, vasküler düz kas hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve adipositler gibi epitelial olmayan dokularda bulunur. Aldosteron'un etkileri bu nedenle "böbrek hormonu" rolünün çok ötesine uzanan geniş bir alana yayılmıştır. Özellikle, aldosteronun enflamasyona aracılık ettiği ve epitelial olmayan dokulardaki enerji metabolizmasını etkilediği düşünülmektedir (Seelinger ve ark., 2005; Hall ve Guyton, 2010; Beuschlein, 2013; Ames ve ark., 2019).

Anjiotensin peptidleri ve aldosteron; beyin, kan damarları, böbrekler ve kalp gibi dokularda üretilir. Lokal olarak üretilen RAAS hormonları normal kardiyovasküler fonksiyon ve elektrolit sıvısı homeostazında önemli rol oynar, aynı zamanda dokulardaki anormal yeniden şekillenmeye aracılık eder. Doku RAAS bileşenleri ayrıca miyokard ve damarların mekanik gerilmesi, adiposit salgıları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) varlığı ve iltihaplanma ile modüle edilir. Dokularda üretilen aldosteron miktarı normalde adrenal bezler tarafından üretilen miktarın  $<1\%$  olmasına rağmen, lokal olarak üretilen aldosteron muhtemelen anormal yeniden şekillenmede (hipertrofi ve fibrozis) bir rol oynar ve doku RAAS yönetimi muhtemelen gelecekteki

farmakoterapötik stratejinin bir parçası olacaktır (Waanders ve ark., 2011; Ames ve ark., 2019).

## 1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim

Anjiotensin konverting (dönüştürücü) enzim (ACE veya kininaz II) endotelial, epitelyal ve nöroepitelyal hücrelerde ve beyinde bir membran enzimi olan iki değerlikli bir dipeptidil karboksil metallopeptidazdır; ayrıca kanda çözünen bir formda ve çok sayıda vücut sıvısında bulunur. ACE, C terminal dipeptidini anjiotensin I ve bradikinininden ayırır, böylece RAS ve kallikrein-kinin sistemi ile aynı anda etkileşir.

ACE enziminin bradikininin vazodilatör ve natriüretik özellikleri ile anjiotensin II'nin vazokonstriktif ve tuz tutucu özellikleri arasındaki dengede önemli bir rolü olduğu sonucuna varılabilir. ACE aktivitesindeki bir artış, bu hassas dengeyi bozar ve vazokonstriktif ve tuz tutucu anjiotensin II'yi teşvik eder ve vazodilatör ve natriüretik bradikininini azaltır. ACE inhibitörleri, anjiotensin II oluşumunu ve bradikininin bozulmasını azaltarak bu dengeyi eski haline getirir (Skidgel ve Erdos, 1993; Brown ve Vaughan, 1998; Hanif ve ark., 2010).

ACE; mannoz, galaktoz, fruktoz, N-asetilnöraminik asit ve N asetilglukozaminden oluşan karbonhidrat parçası içeren bir glikoproteindir. Karbonhidrat parçasına bağlı olarak, ACE'nin moleküler kütlesi 130 ile 170 kDa arasında değişebilir. ACE, N-alanı ve C-alanı olan iki alandan oluşur ve her biri bir çinko (Zn) kofaktör bağlanma aktif bölgesi içerir. Bu nedenle, ACE metal şelatlayıcı ajanlar tarafından inhibe edilebilir. ACE için en etkili inhibitörler; EDTA, CdBr<sub>2</sub>, bradikinin ve *Bothrops jararaca* venomunun bir bileşeni olan bir pentapeptid (L-pirolglutamil-L-lizil-L-triptofil-L-alanil-L-prolin) olarak rapor edilmiştir. ACE, M2 ailesi (peptidaz ailesi M2, metaloekzopeptidazları içerir) metallopeptidazın bir üyesidir ve hipertansiyonda önemli bir role sahiptir (Deddish ve ark.,1994; Murray ve FitzGerald, 2007; Aluko, 2015; Daskaya-Dikmen ve ark., 2017).

Kan basıncının düzenlenmesi, renin-anjiotensin sistemi veya renin-anjiotensin-aldosteron sistemi tarafından kontrol edilir. Vücut, kan basıncını düşürmek için savunma mekanizması olarak böbreklerden renin adı verilen proteolitik bir enzim salgılar. Salgılanan renin, karaciğerden sürekli olarak salgılanan anjiotensinojenin

anjiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His Leu) adı verilen aktif olmayan bir decapeptide dönüşümünü katalize eder. İnaktif anjiotensin I daha sonra plazmada bulunan bir ACE enzimi tarafından aktif oktapeptit anjiotensin II'ye (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) dönüştürülür. Anjiotensin, bir noradrenalin hormonuna kıyasla kırk kat daha güçlüdür ve en güçlü vazokonstriktörlerden biri olarak kabul edilir. ACE inhibitörleri, anjiotensin II sentezindeki bloke edici etkiye ek olarak, ayrıca kininaz 2 enziminin inhibisyonu ve bradikinin yıkımının azaltılması yoluyla vazodilatasyona ve kan basıncında azalmaya neden olur (Murray ve FitzGerald, 2007; Aluko, 2015; Daskaya-Dikmen ve ark., 2017).

Anjiotensin konverting (dönüştürücü) enzim (ACE), fizyolojik açıdan inaktif anjiotensin I'den histidil-lösini ayırarak anjiotensin II oktapeptidine dönüştüren bir dipeptidil-karboksipeptidazdır. Bu enzim bradikininini de inaktive eder. Dolaşımdaki anjiotensin II'nin oluşumunu sağlayan bu enzimin büyük bölümü endotel hücrelerinde bulunur. Bu dönüşüm vücudun diğer birçok bölümlerinde de görülmekle beraber büyük oranda kanın akciğerlerden geçişi sırasında gerçekleşir (Ganong, 1996; Onat ve ark., 2002).

ACE bir ektoenzim olup biri bütün vücutta somatik, diğeri sadece olgun sperm hücrelerinde bulunan germinal form olmak üzere iki formda bulunur. Her iki ACE enziminin tek bir transmembran domeni ve kısa bir stoplazmik kuyruğu vardır. Bununla beraber somatik ACE 170 kDa'luk bir protein olup her biri aktif bir bölge taşıyan iki homolog ekstrasellüler domeni varken germinal ACE sadece bir tane ekstrasellüler domen ve bir tane aktif bölge içerir. Her iki form da tek bir gen oluşur. Bununla beraber bu genin iki farklı mRNA üreten iki farklı promotörü vardır (Ganong, 1996; Onat ve ark., 2002).

### **1.3. Anjiotensin Konverting Enzim İnhibitörleri**

Hipertansiyon tedavisi için anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri birinci basamak ilaçlardan biridir. Evre I hipertansiyonu olan hastalar genellikle ACE inhibitörleri ile tedavi edilir. ACE inhibitörleri hipertansif hastalarda ve ayrıca tuz tüketen normotansif deneklerde ortalama, sistolik ve diyastolik basınçları düşürmede oldukça etkilidir. ACE inhibitörlerinin karakteristik özelliklerinden biri, kalp hızında

telafi edici bir artışa neden olmadan veya baroreseptör aktivitesini değiştirmeden periferik vasküler direnci azaltmalarıdır (Hanif ve ark., 2010). ACE inhibitörlerinin antihipertansif etkilerinden bağımsız olarak kalp damar hipertrofisini önlediği belirlenmiştir. ACE inhibitörleri, hipertansiyonun neden olduğu kardiyovasküler ölüm riskini azaltır. Aynı zamanda bu inhibitörler, böbreklerin damarlarını genişleterek ve böbrek kan akışını artırarak sodyum ve su salgılanmasına yardımcı olur. Bu da ödem ve kan hacmini azaltmaya yardımcı olur. ACE inhibitörleri kalpteki anjiotensin II seviyelerinin düşürülmesinden kaynaklanan kalpteki patolojik değişiklikleri engeller (Solski ve Longyhore, 2008; Hanif ve ark., 2010).

Son yıllarda, stresli ve gerçek anlamda rekabetçi yaşam tarzları ve yemek alışkanlıkları hipertansiyon problemlerini bir araya getirmiştir. Uzun süre devam eden ve giderek artan hipertansiyon; miyokard enfarktüsü, serebrovasküler olaylar, konjestif kalp yetmezliği, periferik arteriyel yetmezlik, erken mortalite ve glomerüloskleroz ve böbrek arter anevrizmasına neden olan böbrek fonksiyon bozukluğu gibi birçok bozukluğa yol açabilir (Hanif ve ark., 2010).

Birçok tedavi mevcuttur, ancak anjiotensin konverting enzim inhibitörleri, hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, sol ventrikül sistolik disfonksiyonu ve miyokard enfarktüsü için tercih edilen birinci basamak tedavi olmuştur. ACE inhibitörleri son yirmi yıldır kullanılmaktadır ve bunlara olan ilgi hala artmaktadır. Son zamanlarda, alan seçici ACE inhibitörlerinin ve renin-anjiotensin sisteminin (RAS) yeni üyelerinin keşfi yine araştırmacıların ilgisini artırmıştır. Bazı yeni çalışmalar ACE inhibitörlerinin etkileyici klinik profilini genişletmiştir (Bicket, 2002; Lonn ve ark., 2003).

ACE inhibitörleri hipertansiyon tedavisi için genellikle ilk kullanılan ilaçlardan biridir. Evre I hipertansiyonu olan hastalar (sistolik kan basıncı (KB): 140-159 veya diyastolik KB: 90-99 mmHg) ACE inhibitörleri ile tedavi edilmelidir. ACE inhibitörleri hipertansif hastalarda ve ayrıca tuz tüketen normotansif deneklerde ortalama, sistolik ve diyastolik basınçları azaltmada etkilidir. Kan basıncındaki keskin değişim, tedavi öncesi plazma renin aktivitesi ve anjiotensin seviyeleri ile ilişkilidir. Kan basıncındaki en büyük düşüşler plazma renin aktivitesinin en yüksek olduğu hastalarda görülür (Hanif ve ark., 2010).

Renin-anjiotensin-aldosteron sistemi (RAAS) ayrıca anjiotensin II'nin lokal sentezini destekleyen çok çeşitli organlarda (doku RAAS) mevcuttur. Bu lokal RAAS sistemi, hipertansif hedef organ hasarının gelişiminde önemli bir role sahiptir. ACE inhibitörleri kan basıncını azaltmanın yanı sıra, lokal RAAS'ı engeller ve hedef organ hasarına karşı korur. Deneysel çalışmalar, ACE inhibisyonunun ateroskleroz (damar sertliği) gelişimini geciktirebileceğini göstermektedir. Apolipoprotein E nakavt fareleri, Watanabe tavşanları ve kolesterol ile beslenen maymunlar dahil olmak üzere ateroskleroz için hayvan modellerinde, ACE inhibitörlerinin vasküler lezyonların boyutunu azalttığı gözlemlenmiştir (Hayek ve ark., 1995; Chobanian ve ark., 1990; Aberg ve Ferrer, 1990). Amenta ve arkadaşları kontrollü klinik çalışmaların çoğunu gözden geçirmiş ve ACE inhibitörleri ile tedavinin (perindopril, kaptopril ve lisinopril dahil) kan basıncını düşürücü etkilerinden bağımsız olarak bilişsel işlevi olumlu etkilediğini ve bu inhibitörler ile tedavi edilen hastaların diüretikler ve  $\beta$ -bloker kullananlara göre daha iyi sonuçlar gösterdiğini gözlemiştir (Amenta ve ark., 2002). ACE inhibitörlerinin bilişsel etkileri üzerine yapılan bir dizi hayvan çalışması da bu gözlemi doğrulamıştır. Örneğin; streptozotosin ile tedavi edilen ratlarda diyabet başlangıcından itibaren 14 hafta boyunca 24 mg / kg / gün enalapril ile tedavi, tedavi edilmeyen diyabetik ratlara kıyasla su labirentindeki hafıza performansını önemli ölçüde artırmıştır (Manschot ve ark., 2003)

#### **1.4. Hipertansiyon**

Hipertansiyon (sistemik arteriyel hipertansiyon), sistemik arterlerde sürekli yüksek kan basıncı (yüksek tansiyon) ile karakterizedir. Yüksek tansiyon yaygın olarak sistolik kan basıncı (yani, kalp kasıldığında kanın arteriyel duvarlara uyguladığı basınç) ve diyastolik kan basıncı (kalbin gevşediği basınç) oranı olarak ifade edilir. Hipertansiyonu tanımlayan yüksek kan basıncı eşikleri, ölçüm yöntemine bağlıdır. Birkaç etiyoloji hipertansiyonun temelini oluşturabilir. Hastaların çoğunda (% 90-95) çok faktörlü bir gen-çevre etiyolojisi ile oldukça heterojen bir esansiyel veya primer hipertansiyon vardır. Hipertansiyon başka bir durumdan (örneğin, birincil aldosteronizm, feokromositoma (böbreküstü bezlerinde oluşan bir tümör veya renal

arter stenozundan)) kaynaklanıyorsa ikincil hipertansiyon olarak adlandırılır (Lifton ve ark., 2001; Ehret ve Caulfield, 2013; Dominiczak ve ark., 2017).

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık (koroner kalp hastalığı, kalp yetmezliği, inme, miyokard enfarktüsü, atriyal fibrilasyon ve periferik arter hastalığı), kronik böbrek hastalığı (KBH) ve bilişsel bozukluk için en yaygın önlenabilir risk faktörüdür. Kan basıncı ve artmış kardiyovasküler hastalık riski arasındaki ilişki, 115/75 mmHg gibi düşük kan basınçlarından başlayarak, normotansif aralık olarak kabul edilen aralıkta derecelendirilir ve sürekli. Hipertansiyonun başarılı bir şekilde önlenmesi ve tedavisi, hastalık yükünü azaltmak ve dünya nüfusunda uzun ömürlülüğü teşvik etmek için anahtardır (Ehret ve Caulfield, 2013; Dominiczak ve ark., 2017; Oparil ve ark., 2018).

Renin anjotensin aldosteron sistemi (RAAS); kan basıncı regülasyonu, sodyum retansiyonu, basınç natriüresi, tuz duyarlılığı, vazokonstriksiyon, endotel disfonksiyonu ve vasküler hasar üzerinde geniş kapsamlı etkilere sahiptir ve hipertansiyon patogenezinde önemli bir rol oynar. RAAS birçok organda hücre düzeyinde bulunur, ancak en önemli rolü böbrekteki basınç-hacim homeostazını düzenlemeye yardımcı olmaktır. Burada hacim tükenmiş durumlarda perfüzyonu korur (yani, sodyum ve sıvı kaybının bir sonucu olarak hücre dışı sıvı hacminde bir azalma olduğunda) ve hacim genişletilmiş (sıvı aşırı yükü) koşullarında bastırılır. Renin ve öncüsü olan prorenin sentezlenir ve böbreğin jukstaklomerüler hücrelerinde depolanır ve çeşitli uyarıcılara yanıt olarak salınır. Renin bileşiğinin ana işlevi, anjiotensinojeni anjiotensin I oluşturmak için ayırmaktır. Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE), hipertansiyonda RAAS'ın patogenetik rolünün merkezinde olan anjiotensin II'yi oluşturmak için anjiotensin I'i hidrolize eder (Varagic ve ark., 2014; Oparil ve ark., 2018).

Antihipertansif farmakoterapi, çeşitli antihipertansif ilaç sınıflarının geliştirilmesiyle birkaç on yıl boyunca gelişmiştir. Klinisyenler şimdi farklı ilaç sınıflarından çok sayıda antihipertansif ilaç ve çeşitli sabit doz kombinasyonları ile karşı karşıyadır. Tipik olarak antihipertansif farmakoterapi, monoterapide veya kombinasyon halinde birinci basamak antihipertansif ilaçlarla başlar. Kombinasyon tedavisi, tedavi öncesi kan basıncının daha yüksek seviyelerine sahip olan hastalarda tercih edilebilir. Birinci basamak antihipertansif ilaçlar arasında ACE inhibitörleri, anjiotensin II reseptör blokerleri (sartanlar olarak da bilinir), dihidropiridin kalsiyum kanal blokerleri ve

tiyazid diüretikleri bulunur. Kan basıncı birçok hastada, özellikle ciddi hipertansiyonu olanlarda monoterapi ile kontrol edilemez. Antihipertansif ilaçları birleştirirken, ilaçların kan basıncı veya yan etkileri üzerinde ek etkilere sahip olup olmadığını düşünmek önemlidir. ACE inhibitörleri veya anjiotensin II reseptör blokerleri, tiazid diüretikleri ve dihidropiridin kalsiyum kanal blokerleri kan basıncının düşürülmesinde katkı maddesidir ve çift veya üçlü kombinasyon terapileri olarak kombine edilebilir (Ettehad ve ark., 2016; Garjon ve ark., 2017; Oparil ve ark., 2018).

### 1.5. Enzimler

Enzimler, biyolojik sistemlerde oluşan tepkimelerde etkili olan biyolojik katalizörler olarak tanımlanmaktadır. Katalizörler, termodinamik yönden oluşan bir tepkimenin hızını tepkimenin denge sabitini değiştirmeden  $10^{11}$  kat veya daha fazla artırmaktadır. Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilmektedir (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Onat ve ark., 2002).

İlk enzim çalışmaları, sindirime ilişkin enzimlerin araştırmaya başladığı 1760-1825 yılları arasındadır. İlk kez 1825 yılında Berzelius, nişastanın sindiriminde etkili bitkisel enzimler üzerinde çalışmıştır. 1860 yıllarında Pasteur fermantasyon enzimleri üzerinde araştırmalar yapmıştır. Fermentasyon ile ilişkisinden dolayı başlangıçta verilmiş olan ferment genel adı, Kühne tarafından 1878 yılında Yunanca'da "mayada" anlamına gelen enzim ile değiştirilmiştir. 1897 yılında ilk kez maya hücrelerinden fermentasyon enzimlerini elde eden Buchner, hiçbir canlı hücrenin olmadığı ortamda maya hücresi özütünün şekerleri mayaladığını göstermiştir. Soya fasulyesi özütünden saf ve kristalize üreaz elde edilmesi 1926 yılında Sumner, saf ve kristalize pepsin, tripsin ve kimotripsin elde edilmesi ise 1930 yılında Northop tarafından gerçekleştirilmiştir. Saf enzimlerin elde edildiği bu önemli gelişmeler sonunda enzimlerin yapısı ve özelliklerine ilişkin ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Günümüzde endüstride yaygın olarak birçok üretimde kullanılmakta olan enzimler, bilimsel araştırma konularının çoğunluğunu oluşturmaktadır. Biyolojik sıvı (kan plazması, serum, idrar) ve dokulardaki (karaciğer, kas, vb. doku biyopsi materyali gibi) enzim aktivitesinin ölçümü, tanı konması ve yönlendirilmesinde laboratuvar

analizlerinin büyük önemini ortaya koymaktadır. Bazı RNA yapısındaki enzim benzeri maddeler (ribozimler) dışında, enzimlerin tümü protein yapısındadırlar. Bu nedenle proteinlere ait tüm yapısal özellikleri göstermektedirler (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Onat ve ark., 2002; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

Enzim molekülü üzerinde substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgeye aktif merkez adı verilmektedir. Bu enzimin aktif merkezinde görev yapan amino asit ve gruplar arasında sistein ve SH grubu (oksirdoredüktaz enzimler), histidinin imidazol grubu, serinin hidroksit grubu (hidrolaz enzimleri), lizinin  $\epsilon$ -amino grubu bulunmaktadır. Birçok enzimin aktif merkezinde değişik amino asitler yer almaktadır. Tripsinde serin ve histidin, laktat dehidrogenazda tirozin, sistein ve histidin, fumarazda metiyonin ve histidin, L-malat dehidrogenazda ise tirozin aktif merkezde görev yapmaktadır (Gözükara, 1997; Nelson ve Cox, 2000; Onat ve ark., 2002).

Yapılan çalışmalar enzimlerin aktif merkezlerini oluşturan amino asitlerin primer yapıda uzak konumlarda oldukları halde, tersiyer yapıda aktif merkezi oluşturmak üzere yakın konumda yapılandıklarını göstermiştir. Örneğin; kimotripsinin aktif merkezinde aspartat-102, histidin-57 ve serin-195 bulunmaktadır. Substratın öncelikle serin-195 ile tepkimeye girmesi aspartat-102 ve histidin-57 tarafından kolaylaştırılmaktadır. Tepkimede yük aktarma sistemi ile serinden  $H^+$  çekilmektedir (Onat ve ark., 2002; Nelson ve Cox, 2000; Keha ve Küfrevioğlu, 2012).

## 2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Anjiotensin konverting enzim (ACE) torakotomide (göğüs kafesinin cerrahi girişimle açılması) elde edilen insan akciğer dokusundan yaklaşık 7000 kez saflaştırılmıştır. Triton X-100 ile çözündürme ve sonikasyondan sonra, iyon değişimi DEAE selüloz kromatografisi ve sepharose 4B jel filtrasyonu gerçekleştirilmiştir. Jel filtrasyonundan sonra proteinin nöraminidazla işlenmiştir ve DEAE selüloz üzerinde geri dönüşüm ile saflıkta, 5-6 kat artış sağlanmıştır. SDS elektroforezinde moleküler ağırlığı yaklaşık 150.000 Da olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan ACE, spesifik bir ACE inhibitörü olan Kaptopril® (Squibb 14,225) ile inhibe edilmiştir. Kaptoprilin IC<sub>50</sub> değeri 4.5 x 10<sup>-9</sup> mol/L olarak bulunmuştur. Sentetik substrat hippuril histidil-lösin için K<sub>M</sub> değeri 3.7 x 10<sup>-4</sup> mol/L olarak hesaplanmıştır (Grönhagen-Riska ve Fyhrquist, 1980).

Anjiotensin konverting enzim (ACE, peptidil-dipeptidaz A, EC 3.4.15.1), rat bağırsak mukozasının toplam hücre membran fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Lisinopril-sepharose ile afinite kromatografisi ve jel filtrasyonundan sonra 4.500 kat saflaştırma sağlanmıştır. SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 160 kDa olarak bulunmuştur. Saflaştırılmış protein, % 12 N-bağlı karbonhidrat içeren bir glikoenzimdir. Saflaştırılmış ACE enziminin spesifik aktivitesi, substrat olarak kullanılan benzoil-Gly-His-Leu ile 65 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Bir kinetik analiz, enzimin COOH terminal ucunda prolin içeren substratlarla maksimum hıza sahip olduğunu göstermiştir. İnhibitör çalışmaları, enzimin bir metaloprotein olduğunu göstermiştir. İnce bağırsağın proksimal-distal eksenini boyunca, ACE aktivitesi proksimalden orta kısımlara kadar en baskındır ve distal (merkezden uzak) uca doğru azalır (Erickson ve ark., 1992).

Lamango ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ACE yetişkin ev sineklerinden (*Musca domestica*) lisinopril-sepharose afinite kolon kromatografisiyle saflaştırılmıştır ve moleküler ağırlığı 67 kDa olarak belirlenmiştir. Benzoil-Gly-His-Leu bileşiğine karşı dipeptidil karboksipeptidaz aktivitesi, iki ACE inhibitörü olan kaptopril (IC<sub>50</sub>=50 nM) ve fosinoprilat (IC<sub>50</sub>=251 nM) ile inhibe edilmiştir (Lamango ve ark., 1996).

Anjiotensin konverting enzim domuz serumundan afinite kromatografisi ile epoxy-activated sepharose 6B kolon dolgu maddesi ile birkaç basamakta saflaştırılmıştır. Anyon değişim kromatografisinin iki basamağı farklı pH'larda (pH 9.0

ve pH 6.0) gerçekleştirilmiştir. FAPGG için  $K_M = 0.793 \pm 0.052$  mM ve  $K_{kat} = 5830$  s<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. İki spesifik ACE enzimi inhibitörü kaptopril ve lisinopril için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla  $5.7 \pm 0.67$  nM ve  $1.0 \pm 0.29$  nM olarak hesaplanmıştır (Quassinti ve ark., 1998).

ACE, lisinopril - afinite kromatografisi ile köpek testislerinden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Deterjanla ekstrakte edilmiş köpek testisleri, proteaz inhibitörleri varlığında parçalanmış ve ACE inhibitörü olan lisinopril ile afinite kolonuna yüklenmiştir. Başlangıç testis ekstraktlarındaki ACE spesifik aktivitesi  $3.53 \pm 0.99$  mU mg<sup>-1</sup> protein, lisinopril afinite kromatografisi sonrası ACE'nin spesifik aktivitesi  $4239 \pm 2600$  mU mg<sup>-1</sup> protein olarak belirlenmiş ve ACE 1588 kat saflaştırılmıştır. Deterjan ekstraktlarındaki ve saflaştırılan fraksiyonlardaki ACE enzim aktivitesi, spesifik bir ACE inhibitörü olan 10 µM kaptopril ile inhibe edilmiştir. ACE molekül ağırlığı 65-70 kDa'luk bir protein olarak tanımlanmıştır (Sabeur ve ark., 2001).

Anjiotensin konverting enzim Concanavalin-A Sepharose 4B ve Lisinopril Sepharose 6B afinite kromatografisi kullanılarak iki basamakta domuz akciğerinden 530 kat saflaştırılmıştır. ACE'nin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 170 kDa olarak belirlenmiştir. Aynı saflaştırma şeması, enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko (Zn<sup>+2</sup>) iyonunun kobalt iyonu (Kobalt-ACE) ile yer değiştirmesini sağlamak için kullanılmıştır. Kobalt-ACE görünür spektrumu 500 nm'den 600 nm'ye karakteristik geniş bir pik gösterir (Andújar Sánchez ve ark., 2003).

Anjiotensin konverting enzim kurbağa yumurtalıklarından afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Kolon dolgu maddesi olarak Sepharose 6B ve ligand olarak lisinopril kullanılmıştır. Kurbağa yumurtası deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilerek saflaştırılmıştır. Hem deterjanla ekstrakte edilen hem de tripsin ile ekstrakte edilen ACE için molekül ağırlığı 150 kDa olarak belirlenmiştir. Optimum pH aralığı 7-8.5 ve optimum sıcaklık 50 °C olarak bulunmuştur (Miano ve ark., 2003).

ACE domuz akciğerinden homojenat hazırlanarak çok aşamalı bir prosedürle saflaştırılmıştır. % 23.6 verimle saflaştırılan ACE'inin, spesifik aktivitesi 37 U mg<sup>-1</sup>, saflaştırma faktörü 308 olarak bulunmuştur. Saflaştırılan ACE sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve nativ-PAGE ile karakterize edilmiştir. Saflaştırılan glikozillenmiş ACE'inin monomer boyutu SDS-PAGE ile 175 kDa, yeni

bir aktivite boyama protokolü kullanılarak dimerik formu ise nativ-PAGE ile 330 kDa olarak bulunmuştur (Eisele ve ark., 2012).

Mojallal-Tabatabei ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, ACE devekuşu (*Struthio camelus*) akciğerinden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. ACE enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 200 kDa olarak bulunmuştur ve maksimum enzim aktivitesi pH 7.5 değerinde ölçülmüştür (Mojallal-Tabatabei ve ark., 2013).

ACE, insan plazmasından afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta 12860 kat saflaştırılmıştır ve spesifik aktivitesi 5080 EU / mg protein olarak bulunmuştur. ACE için optimum sıcaklık 35-40 °C iken optimum pH 7.4-7.5 olarak belirlenmiştir. ACE'nin saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiş ve enzimin jel üzerinde 60 ve 70 kDa'da iki bant gösterdiği gözlemlenmiştir. ACE'nin nativ moleküler ağırlığı, jel filtrasyon kromatografisi ile grafik denkleminde 260 kDa olarak hesaplanmıştır. Kolon kromatografisi yöntemi ile *Nigella sativa* bitkisinden doğal yağ asitleri izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları, NMR ve GC-MS kullanılarak belirlenmiştir. ACE aktivitesi üzerine izole edilen altı fraksiyonun (Fr 1-6) etkisi incelenmiştir. Fraksiyon 3, ACE aktivitesini arttırırken, diğer fraksiyonların ACE aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Enzimin aktivitesini inhibe eden fraksiyonların IC<sub>50</sub> değerleri; Fr1 için 1.597 mg / mL, Fr2 için 0.053 mg / mL, Fr4 için 0.527 mg / mL, Fr5 için 0.044 mg / mL ve Fr6 için 0.136 mg / mL olarak hesaplanmıştır (Basi ve Turkoglu, 2018).

Anjiotensin konverting enzim (EC 3.4.15.1), sığır akciğerinden afinite kromatografisi yöntemi ile 1748 kat saflaştırılmıştır Saflaştırılan ACE için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 35-40 °C ve 7.6 olarak belirlenmiştir. SDS-PAGE ile ACE'in 57 kDa, 66 kDa ve 190 kDa molekül ağırlığında üç alt birime sahip olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra jel filtrasyon kromatografisi yöntemi ile ACE'nin molekül ağırlığı 303 kDa olarak hesaplanmıştır. ACE inhibitörleri; lisinopril, kaptopril, fosinopril, beta blokerler; atenolol, propranolol ve diüretikler; triamteren, spironolakton ve indapamidin ACE aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. ACE inhibitörleri lisinopril, kaptopril, fosinopril ve diüretik olan triamteren, ACE aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken beta blokerleri herhangi bir etki göstermemiştir. Lisinopril, kaptopril, fosinopril ve triamteren gibi etken maddeler ACE aktivitesi üzerine yarışmasız inhibisyon etkisi göstermiştir ve grafik denkleminde bu bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 4.085 nM, 0.835 nM, 1.159 µM ve 227 µM olarak belirlenmiştir.

Aynı zamanda lisinopril, kaptopril, fosinopril ve triamteren için  $K_i$  sabitleri, sırasıyla 6.449 nM, 1.057 nM, 1.675  $\mu$ M ve 419.5  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır. Kaptopril, 0.835 nM  $IC_{50}$  değeri ile en yüksek inhibitör aktivitesini göstermiştir (Karahan ve Türkoğlu, 2019).

Anjiotensin konverting enzim (ACE, peptidildipeptidaz A, EC 3.4.15.1) kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu çalışmada, ACE tek basamakta afinite kromatografisi ile insan plazmasından saflaştırılmıştır. ACE insan plazmasından 5367 kat saflaştırılmıştır ve spesifik aktivite 1208 EU/mg protein olarak belirlenmiştir. ACE'nin saflığı ve moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile belirlenmiştir ve jelde 60 kDa ve 70 kDa olarak iki bant belirlenmiştir. Oksitlenmiş glutatyon (GSSG) peptidi ve indirgenmiş glutatyon (GSH) peptidinin saflaştırılmış ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Lisinopril referans inhibitörü olarak kullanılmıştır. GSSG, ACE aktivitesi üzerinde aktivasyon etkisi gösterirken GSH, inhibisyon etkisi göstermiştir. GSH ve lisinopril için  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 16.2  $\mu$ M ve 0.781 nM olarak bulunmuştur. Lineweaver-Burk grafiğinden GSH ve lisinopril için inhibisyon tipi geri dönüşümlü olmayan non-kompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir. GSH ve lisinopril için  $K_i$  sabitleri sırasıyla 11.7  $\mu$ M ve 0.662 nM olarak hesaplanmıştır (Basi ve Turkoglu, 2019).

*Stichopus horrens*, sayısız tıbbi özelliği nedeniyle en popüler deniz salatalık türüdür. Forghani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, alkalaz kullanılarak enzimatik hidroliz yoluyla *Stichopus horrens*'in ACE inhibitör peptidleri izole edilmiştir. EVSQGRP, CRQNTLGHNTQTSLAQ ve VSRHFASYAN olmak üzere üç peptid izole edilmiştir ve sırasıyla  $IC_{50}$  değerleri 0.05, 0.08 ve 0.21 mM olarak bulunmuştur. *In vivo* ACE inhibisyon çalışmaları, 400 mg/kg alkalaz tarafından üretilen proteolizatin, normotansif ratlarda kan basıncını stabilize ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar *Stichopus horrens*'in hidrolize protein bileşenlerinin hipertansiyona karşı fonksiyonel gıda bileşenleri olarak kullanılabilen biyoaktif peptitlere sahip olduğunu düşündürmektedir (Forghani ve ark., 2016).

Zengin bir amino asit bileşimi ile yüksek protein içeren denizanasının (*Rhopilema esculentum Kishinouye*) gonadı, biyolojik olarak aktif peptidlerin hazırlanması için uygundur. Denizanası gonadı, protein hidrolizatı elde etmek için nötral proteaz ile hidrolize edilmiştir ve daha sonra bu protein hidrolizatından sırayla ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve RP-HPLC ile bir dipeptid

saflaştırılmıştır. Peptitler, HPLC-MS/MS ile karakterize edilmiştir ve amino asit dizisi Ser-Tyr (SY) olarak tanımlanmıştır. Bu dipeptid önemli ölçüde ACE inhibitör aktivitesi ve antioksidan aktivite göstermiştir. DPPH,  $\cdot\text{OH}$ , süperoksijen anyon temizleme aktivitesi ve ACE inhibitör aktivitesi üzerine bu peptidin  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 84.623  $\mu\text{M}$ , 1177.632  $\mu\text{M}$ , 456.663  $\mu\text{M}$  ve 1164.179  $\mu\text{M}$  olarak hesaplanmıştır (Zhang ve ark., 2018).

Kazein hidrolizatları çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir ve sorumlu fonksiyonel peptitler sürekli olarak bu hidrolizatlardan tanımlanır. Bu çalışmada, triptik kazein hidrolizat, bir ultrafiltrasyon membran (3 kDa) ile fraksiyonlanmıştır ve peptidler kapiler - elektroforez - kuadropol - ışık zamanı - tandem kütle spektrometresi ile tanımlanmıştır. Silis yöntemleri toksisiteyi, çözünürlüğü, kararlılığı, stabiliteyi, peptidler ve anjiotensin konverting enzim arasındaki afiniteyi analiz etmek için kullanılmıştır. Aynı zamanda,  $\alpha_{s1}$ -kazeinden (fragment 35–42) ACE inhibitör peptidi (EKVNELSK) elde edilmiştir. Bu peptidin yüksek performanslı bir sıvı kromatografi yöntemi (HPLC) ile yarı maksimum inhibitör konsantrasyon değeri ( $\text{IC}_{50}$ ) 5.998 mM olarak hesaplanmıştır. Lineweaver Burk grafiği ile bu peptidin ACE'ye karşı inhibisyon tipi karışık tip bir inhibitör olduğunu göstermiştir (Tu ve ark., 2018).

*Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) alglerinden anjiotensin konverting enzim inhibitör peptidleri araştırılmıştır. *Chlorella vulgaris* proteinleri, siliko içerisinde gastrointestinal olarak sindirildikten sonra sonra, C-terminal triptofan ile bir kaç ACE inhibe edici peptidi taranmıştır. Bunlar arasında, iki yeni nonkompetitif olan ACE inhibitörü, Thr-Thr-Trp (TTW) ve Val-His-Trp (VHW) belirlenmiş ve bu inhibitörler sırasıyla  $0.61 \pm 0.12$  ve  $0.91 \pm 0.31$   $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleri ile en yüksek inhibitör aktivitesi göstermiştir. Her iki peptidin de gastrointestinal sindirim ve ACE hidrolizine karşı stabil olduğu gösterilmiştir. Peptidler, 5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda kendiliğinden hipertansif ratlara (SHR'ler) uygulanmıştır ve VHW peptidi, SHR'lerin sistolik kan basıncını 50 mmHg azaltabildiği gözlemlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Moleküler doking (yerleştirme), hem TTW peptidi hem de VHW peptidinin aktif ACE alan cepleri ile altı hidrojen bağı oluşturduğunu göstermiştir. Ayrıca, izotermal titrasyon kalorimetrisi analizi, VHW peptidinin ACE ile TTW peptidinden daha stabil bir kompleks oluşturabileceğini keşfetmiştir (Xie ve ark., 2018).

Bhaskar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, alkalaz ile hidrolizden sonra at gramından (kulthi fasülyesi) yeni anjiotensin I konverting enzim (ACE) inhibe edici peptidleri tanımlanmıştır. At gram hidrolizatındaki ACE inhibe edici peptidler, ultrafiltrasyon ve farklı kromatografi teknikleriyle saflaştırıldıktan sonra nano sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (nano LC-MS / MS) kullanılarak tanımlanmıştır. Ayrıca, siliko analizine dayanarak, at gram hidrolizatından on iki potansiyel ACE inhibe edici peptid sentezlenmiştir ve ACE inhibe edici aktiviteleri için test edilmiştir. İki peptid TVGMTAKF ve QLLLQQ en yüksek ACE inhibitör aktivitesini göstermiştir ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 30.3 µM ve 75.0 µM ve K<sub>i</sub> değerleri 0.01 µM ve 0.18 µM olarak belirlenmiştir. Ek olarak, bu iki yeni peptid, yarışmalı inhibisyon etkisi göstermiştir ve aynı zamanda gastrointestinal proteazlarla (pepsin, tripsin ve kimotripsin) inkübasyonun ardından ACE inhibe edici aktivitesini korumuştur. Bu sonuçlar at gramından tanımlanan ACE inhibe edici peptidlerin hipertansiyonu kontrol etmek için fonksiyonel bir gıda maddesi olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır (Bhaskar ve ark., 2019).

Yapılan başka bir çalışmada ise brokoli proteini hidrolizatlarından peptidler saflaştırılmıştır. Bu peptidlerin *in vitro* anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitesi ve *in vivo* hipotansif etkileri değerlendirilmiştir. IPPAYTK, LVLPGELAK ve TFQGGPPHGIQVER olarak tanımlanan üç ACE inhibitör peptidi izole edilmiştir ve bu inhibitörlerin IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 23.5, 184.0 ve 3.4 µM olarak belirlenmiştir. Daha sonra gastrointestinal sindirimin ACE inhibitör aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Simüle edilmiş sindirimi takiben, sindirim öncesine göre LVLPGELAK peptidinin ACE inhibitör aktivitesinin neredeyse iki katı olduğu tespit edilmiştir. Yüksek ACE inhibitör aktivitesi gösteren iki yeni peptit olan LVLPGE ve LAK, sindirimi takiben keşfedilmiş ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 13.5 ve 48.0 µM olarak bulunmuştur. Peptidlerin hipotansif etkisi, spontan hipertansif ratlara (SHR) oral uygulamadan sonra değerlendirilmiştir. LVLPGE ve LAK'ın *in vivo* önemli bir hipotansif etki gösterdiği saptanmıştır. Brokoli proteininin potansiyel bir antihipertansif peptit kaynağı oluşturabileceği sonucuna varılmıştır (Dang ve ark., 2019).

İnci istiridye (*Pinctada fucata*) kabuğu deniz yan ürünüdür. Yapılan bir çalışmada, inci istiridye kabuğu protein hidrolizatından fonksiyonel peptidlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İnci istiridye kabuğu proteini; iki tip proteaz, Nükleik ve Orientase 22 BF kullanılarak hidroliz edilmiştir. Orientase 22 BF (reaksiyon

süresinin 6 saati) ile hidrolizat, % 26.0 protein hidrolizi derecesi ile en yüksek anjiotensin I konverting enzim (ACE) inhibitör aktivitesi göstermiştir. Ham hidrolizat, su ile ekstrakte edilmiştir ve bir Sephadex G-25 kolonu üzerinde jel kromatografisiyle iki parçaya (F1 ve F2 olarak adlandırılmıştır) fraksiyonlanmıştır. F1'in yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle (HPLC) iki kez bir ODS (oktadesil silika) kolonu üzerinde art arda saflaştırılmasından sonra, amino asit sekansına göre Gly-Val-Gly-Ser-Pro-Tyr (MW: 578.7 Da) dizilimine sahip bir hekzapeptid tanımlanmıştır. Saflaştırılmış hekzapeptid, ACE aktivitesi üzerine 5.82 µg/mL IC<sub>50</sub> değeri ile inhibitör aktivitesi göstermiştir. Ayrıca, Lineweaver-Burk grafikleri, saflaştırılmış peptidin ACE enzimine karşı kompetitif bir inhibitör olarak davrandığını göstermiştir (Sasaki ve ark., 2019).

Bal arısı pupa hidrolizatlarından ACE inhibitör aktivitesine sahip peptidler tanımlanmıştır. Ek olarak, gastrointestinal sindirimi simüle edilmiş ve tanımlanan peptidlerin potansiyel bölünme yerleri tahmin edilmiştir. Bal arısı pupalarından türetilen peptidler; pepsin, tripsin ve kimotripsin ile silikonda bölünmüştür. Bal arısı pupaları dört farklı proteaz (alkalaz, nötraz, tripsin ve papain) kullanılarak hidrolize edilmiştir ve ACE inhibe edici aktiviteleri ve moleküler ağırlık dağılımı belirlenmiştir. Nötraz hidrolizatları en yüksek ACE inhibitör aktivitesini göstermiştir. Daha sonra hidrolizatlar; ultrafiltrasyon, jel filtrasyon kromatografisi ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. En yeni ACE inhibitör aktivitesini sergileyen üç yeni peptid LC-MS/MS, ile AVFPSIVGR, PPVLVFFV ve PGKVHIT olarak tanımlanmıştır ve sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 6.64, 47.7859 ve 223.869 µM olarak hesaplanmıştır. Siliko gastrointestinal sindirimde simüle edildiğinde, AVFPSIVGR ve PGKVHIT peptidleri; pepsin, kimotripsin ve tripsin ile bölünme yerleri konumuna sahiptir ve PPVLVFFV, pepsin ve kimotripsin ile ayrılmıştır (Yang ve ark., 2019).

Anjiotensin konverting enzim (ACE), kan basıncını düzenlemede önemli bir rol oynar ve ACE inhibitörleri, hipertansiyon tedavisinde ilk basamak ilaçlardır. ACE inhibitör aktivitesine sahip gıda proteininden türetilmiş peptidler, hipertansiyonun önlenmesi ve tedavisi için doğal ve güvenli alternatiflerdir. İkinci en bol peynir altı suyu proteini olan α-laktalbümin (ALA), doğal bir bitki olan *Bromelia antiacantha* Bertol.'dan proteazlarla hidrolize edilmiştir. Güçlü ACE inhibitör aktivitesine sahip iki yeni peptid: TTFHTSGY (IC<sub>50</sub>=142 µM) ve GYDTQAIQVQ (IC<sub>50</sub>=1.0 mM), afinite

kromatografisiyle saflaştırılmıştır ve sekanslar (sıra) kütle spektrometrisi ile belirlenmiştir. Siliko analizinde bu peptidlerin hiçbirinin toksik olmadığı görülmüştür (ToxinPred). İnhibisyon kinetik analizi, TTFHTSGY peptidinin tamamen işlevsel bir ACE kompetitif inhibitörü olduğunu göstermiştir, GYDTQAIVQ ise sadece kısmi ACE inhibisyonuna neden olmuştur (Villadóniga ve Cantera, 2019).

Küçük biyoaktif peptidlerin karmaşık biyolojik numunelerden saflaştırılması konsantre büyük biyomoleküllerin etkileşimi nedeniyle zor bir iştir. Yapılan bir çalışmada, poli (etilen glikol) metil eter (IMACM @ mPEG) ile modifiye edilmiş manyetik immobilize metal afinite kromatografi matrisi hazırlanmıştır ve kazein hidrolizattan ACE inhibitör peptidlerinin hızlı saflaştırılması için uygulanmıştır. Önerilen IMACM @ mPEG, büyük proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu önemli ölçüde azaltmıştır ve ACE inhibitör peptidlerine karşı gelişmiş saflaştırma etkinliği göstermiştir. ACE inhibitör aktivitesine sahip yeni bir peptid LLYQEPVLGPVR ( $IC_{50}$  değeri  $274 \pm 5 \mu M$ ) tanımlanmıştır. Lineweaver-Burk grafiği ile LLYQEPVLGPVR peptidinin inhibisyon tipinin non-kompetitif inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılmış peptid, simüle edilmiş gastrointestinal sindirimden sonra sindirilmiştir ve daha uzun ACE inhibitör aktivitesine katkıda bulunan daha kısa peptidler üretmiştir. Bu sonuçlar IMACM @ mPEG'in ACE inhibitör peptidinin ön saflaştırılması için etkili bir yöntem olduğunu ve saflaştırılmış peptid LLYQEPVLGPVR'nin hipertansiyon tedavileri için fonksiyonel gıdalarda nutrasötik bileşen potansiyeline sahip olabileceğini göstermiştir (Liu ve ark., 2020).

Sentetik anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörlerinin yan etkileri vardır ve bu nedenle doğal ACE inhibitörlerine yönelik talepler artmaktadır. *Zizyphus jujuba* meyvelerinden elde edilen doğal ACE inhibitörleri saflaştırılmıştır. *Zizyphus jujuba* proteinleri tripsin, papain ve bunların kombinasyonu ile parçalanmıştır. Parçalanmış proteinlerden peptidler saflaştırılmıştır ve ACE inhibitör aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. İnhibitör aktivitesine sahip peptid fraksiyonları, tandem kütle spektrometresi kullanılarak sıralanmıştır. ACE enzimine peptid bağlanma modunu açıklamak için homoloji modelleme, moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyonu yapılmıştır. En aktif hidrolizatlar olan F2 ve F4 peptidlerinin amino asit dizisinin IER ve IGK olduğu belirlenmiştir ve  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 0.050 ve 0.072 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Memarpoor-Yazdi ve ark., 2020).

Fan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Larimichthys crocea* titin proteininden yeni ACE inhibitör peptidleri tanımlanmış ve moleküler etkileşim mekanizması açıklanmıştır. Titinin hidrolize peptidleri, AHTPDB ve BIOPEP-UWM veritabanındaki bilinen ACEI peptidleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca peptidler; çözünürlükleri,  $\Delta G$  (kcal / mol) değerleri ve *in vitro* ACE inhibitör aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. ACE-peptidinin moleküler mekanizması; moleküler etkileşimler ve bağlama yönlendirme çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Bu protein hidrolizatından Trp-Ala-Arg (WAR) ve Trp Gln-Arg (WQR) peptidleri tanımlanmıştır ve bu peptidler ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi göstermiştir.  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla  $31.2 \pm 0.8$  ve  $231.33 \pm 0.02$   $\mu M$  olarak belirlenmiştir (Fan ve ark., 2020).

Tilapia balığı deri jelatin hidrolizatından elde edilen Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Pro (LSGYGP) peptidinin anjiyotensin-I-konverting enzim (ACE) aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkisi araştırılmıştır. Moleküler yerleştirme kullanılarak kaptopril ile karşılaştırmalı analizle ACE inhibitörlerinin minimal yan etkilerinin gelişmesinin farmakolojik bir temeli belirlenmiştir. Protein açısından zengin atıklardan elde edilen bu peptid, ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi göstermiştir ve  $IC_{50}$  değeri  $2.577$   $\mu mol L^{-1}$  olarak belirlenmiştir. İnhibisyon tipi Lineweaver-Burk grafiklerinden non-kompetitif inhibisyon olarak belirlenmiştir. Ayrıca, LSGYGP ve kaptopril gruplarının her ikisi de 6 saat sonra kan basıncında önemli düşüşler göstermiştir ve 4 saat boyunca iyi sindirim stabilitesini korumuştur. Moleküler bağ etkileşimleri; hidrojen bağ etkileşimleri ve Zn (II) etkileşimi üzerine yarışmalı kaptoprili ayırt eder. C-terminal Pro, peptid içinde üç etkileşim (hidrojen bağları, hidrofilik etkileşimler ve Van der Waals etkileşimleri) üretir ve ACE'nin S1 ve S2 cepleriyle etkili bir şekilde etkileşir.  $2.577$   $\mu mol L^{-1}$   $IC_{50}$  değerine sahip olan LSGYGP peptidi spontan hipertansif ratlarda antihipertansif etkiye sahiptir. Bu çalışma, kaptopril ile karşılaştırıldığında, LSGYGP peptidinin potansiyel gıda kaynaklı bir ACE inhibitör peptidi olabileceğini ve hipertansiyonu önlemek için fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kullanılabilceğini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2020).



### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Mezbahannede yeni kesilmiş koyun akciğeri laboratuvara getirilerek akciğerin değişik bölgelerinden 50 g kadar kesilerek alındı. Bu alınan kısım bir bistüri yardımıyla küçük kübik parçalara ayrıldı. Parçalanmış akciğere 250 mL lik hacimde Tris (50 mM, pH 7.4) tamponu içine ilave edildi. Bu karışım mikser yardımıyla 3 dakika parçalanmaya maruz bırakıldı. Bu esnada mikserin etrafına buz konularak ısınması önleildi. Elde edilen homojenat daha ileri bir parçalanma için ultrasonik homojenizatörde 10-15 dakika homojenizasyon işlemi uygulandı.

#### **3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler**

Çalışmalarımızda kullanılan NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, HepesNa (2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit sodyum), FAPGG (N-[3-(2-Furil) akrilolil]-Fenil-Glisil-Glisin), ZnCl<sub>2</sub> (çinko klorür), sodyum tetra borat, serum albumin, trihidroksimetil aminometan (Tris), β-merkapt etanol, lisinopril Sigma Chemical Comp.'den temin edildi. N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, bromfenol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, AppliChem GmbH'den temin edildi. Sodyum klorür, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum azid, gliserin, etanol, metanol, asetik asit, Coomassie brilliant blue G-250, E. Merck AG'den satın alındı. Elektroferez markırı SM0671 fermentas Life Science Thermo Fisher Scientific'ten temin edildi.

#### **3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar**

Spektrofotometre: Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800

İnkübatör: G24 Enviromental Incubatur Shaker

Soğutmalı klinik santrifüj: Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Klinik santrifüj:Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Elektroferez tankı: P8DS Vertical Electrophoresis System (dikey)

Peristaltik pompa: Eyela Micro Tube Pump MP-3

Peristaltik pompa: Easy-load master flex model 7518-10

Güç kaynağı: Thermo scientific

pH metre: Inolab WTW series pH 720

Karıştırıcı (Vorteks): Mixer VM 20

Hassas terazi: Gec Avery

Hassas terazi: Shimadzu Uni Bloc AUW 220D

Afinite Kromatografisi kolonu: Sigma 1 cm x 10 cm

Otomatik pipetler: Eppendorf, Volac (5-50 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)

Homojenizatör: Wiggen Hauser 220-240 volt 50-60 Hz

Parçalayıcı mikser: Warning Commercial Laboratory Blender. Country of origin U.S.A.

Sabit sıcaklık banyosu: Julabo Labortechnik GMBH D-7633

Sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu: Grand Technical. Specification LTD 6G-20 to 100°C

### **3.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

Bütün çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlandı.

#### **3.1.3.1. Protein tayininde kullanılan çözeltiler**

1.) Coomassie brilliant blue G-250 renk reaktifi (Protein tayininde kullanılan stok çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL % 95'lik ortofosforik asitten yavaşça eklendi. Hazırlanan çözeltinin hacmi bidistile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2.) Standart serum albumin çözeltisi (Protein tayininde kullanılan standart çözelti): 10 mg sığır serum albumininden alınıp bir miktar destile suda köpürtülmeden yavaşça çözüldü ve hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

### 3.1.3.2. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler

- 1.) 50 mM HepesNa/0.3 M NaCl/10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> pH 7.5: 3.254 g HepesNa, 4.38 gNaCl ve 0.00034 g ZnCl<sub>2</sub> alınarak 200 mLbidistile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 7.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 250 mL'ye tamamlandı.
- 2.) 1 mM FAPGG çözeltisi: 0.01 g FAPGG alınarak % 5'lik 1250  $\mu$ L metanol içinde çözüldü ve hacmi bidistile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

### 3.1.3.3. Kolon dolgu maddesi için kullanılan çözeltiler

- 1.) 1 mM HCl: 0.041 mL HCl alınarakbir miktar bidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 2.) 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>/ 0.5 M NaCl/ 5mM Lisinopril pH=8.3 (Kolon dolgu maddesini ligandla birleştirmek için kullanılan tampon): 0.804 g NAHCO<sub>3</sub> ve 1.461 g NaCl alınarak 40 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı. Çözeltiye 0.1104 g lisinopril eklendi ve çözelti 1 gece 4 °C de bekletildi.
- 3.) 0.1 M Tris-HCl pH=8,5 (Kolon dolgu maddesini yıkamak için kullanılan tampon): 6.057 g Tris alınarak 450 mL bidistile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- 4.) 0.1 M K-asetat /0.5 M NaCl pH=4,5 (Kolon dolgu maddesini yıkamak için kullanılan tampon): 4.907 g K-asetat ve 14.61 g NaCl alınarak 450 mL bidistile suda çözüldü. pH 4.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

### 3.1.3.4. Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler

- 1.) 20 mM Tris/0.3M NaCl pH=8.0 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 2.423 g Tris ve 17.532 g NaCl alınarak 950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1L'ye tamamlandı.
- 2.) 20 mM Tris/0.3M NaCl pH=8.0 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 2.423 g Tris ve 17.532 g NaCl alınarak

950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1L'ye tamamlandı.

3.) 50 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Sodyum borat) pH'sı 9.0 (Afinite jeline tutunmuş olan anjiotensin konverting enzimin elüsyonu için kullanılan tampon): 1.907 g Sodyum borat 90 mL bidistile suda çözüldü. pH 9.0'a ayarlandı ve daha sonra toplam hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

4.) % 0.02'lik  $\text{NaN}_3$  (Sodyum azid) çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg  $\text{NaN}_3$  alınarak 50 mL bidistile suda çözüldü.

### 3.1.3.5. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler

1.) 1.5 M Tris-HCl (pH= 8.8): 18.17 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mL bidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.) 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8): 6.057 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mL bidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.) % 30 Akrilamid - % 2.7 Bisakrilamid çözeltisi: 14.6 g akrilamid, 0.4 g bisakrilamid 40 mL bidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4.) % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak bidistile su ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

5.) % 10'luk SDS: 1 g SDS tartılarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

6.) Yürütme tamponu: 3.028 g Tris ve 14.410 g glisin tartılarak 950 mL bidistile suda çözüldü, % 10'luk SDS'den 10 mL ilave edildi, pH= 8.3'e ayarlandı ve toplam hacim bidistile su ile 1 L'ye tamamlandı.

7.) Numune tamponu: 1.5 M Tris-HCl (pH= 6.8)'den 2.5 mL, % 10'luk SDS'den 4 mL, % 100'lük gliserinden 2 mL ve  $\beta$ -merkaptetanolden 1 mL alınarak hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

8.) Jel boyama çözeltisi: 40 mL metanol, 7 mL asetik asit içinde 0.025 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifi çözümlenerek hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı

9.) I. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol - 10 mL asetik asit - 40 mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

10.) II. Jel yıkama çözeltisi: 5 mL metanol - 7 mL asetik asit - 88 mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

11.) Su ile doydurulmuş n-bütanol: 10 mL n-bütanol ve 1mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

12.) % 0.1'lik brom timol mavisi çözeltisi: 0.01 g indikatör, 1 mL bidistile su içerisinde çözüldü ve toplam hacim bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

## **3.2.Yöntem**

### **3.2.1. Protein tayini**

#### **3.2.1.1. Kalitatif protein tayini**

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kalitatif protein tayinleri yapıldı. 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanılarak kalitatif protein tayini yapılmaktadır (Carlberg ve Mannervik, 1981). Koyun akciğerinden elde edilen enzim numunelerinde kalitatif protein tayini bu yöntemle göre belirlendi. Fraksiyonlar kuvars küvetlere alınarak absorbandsları köre karşı okundu. Köz olarak elüsyon tamponu kullanıldı.

#### **3.2.1.2. Bradford yöntemiyle kantitatif protein tayini**

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu yöntemde o-fosforik asitli ortamda proteinler Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturmakta ve bu kompleks 595 nm'de maksimum absorbands göstermektedir. Negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanılır ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (maksimum dalga boyu 465 nm) ve mavi (maksimum dalga boyu 596 nm) formu mevcuttur. Proteinin boya üzerindeki negatif yüke bağlanmasıyla kırmızı form mavi forma dönüşür. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg dır. Reaksiyon çok fazla tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde oluşur. Reaksiyon yaklaşık olarak iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi yaklaşık iki saatin üzerinde devam etmektedir. Renk oluşumunda proteinin amino asit bileşiminin

(özellikle arginin gibi bazik aminoasitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. (Bradford, 1976).

Ölçüm şu şekilde yapıldı; 1 mL’inde 1mg protein içeren standart sığır albumin çözeltisinde tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Tüm tüplerin hacmi bidistile su ile 0.1 mL’ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi tüplere ilave edilerek vorteks mikser ile karıştırıldı. 10 dk inkubasyondan sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan çözelti kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart grafik çizildi.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden (her bir fraksiyondan) ayrı ayrı 0.1 mL alındı. 5 mL Coomassie reaktifi ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak 10 dk inkübasyona bırakıldı. Yine kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan çözelti kullanılarak 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Her bir fraksiyon için bulunan absorbans değerleri standart grafikten µg.protein değerine çevrildi.

### 3.2.2. Afinite kolonunun hazırlanması

Afinite kromatografisi yöntemi, önceden aktive edilmiş kolon dolgu maddesiyle biyospesifik ligandları birleştirerek saflaştırılma yapılmasına dayanan başarılı bir yöntemdir. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, mevcut kimyasallarla bağlanma seçimini artıran önceden aktive edilmiş agaroz bir matriksidir. NHS (N-hidroksisüksinimid), primer amino grupları içeren ligandlarla kimyasal olarak stabil bir amid bağı oluşturur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, bir aralayıcı kol sağlar ve bu nedenle özellikle küçük protein ve peptid ligandlarının immobilize edilmesi için uygundur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow; 6-amino hekzanoik asit aralayıcı kol ve sepharose 4 fast flow maddesinin birleştirilmesi ile hazırlanmış yüksek derecede çapraz bağlı (boncuk şekillendirilmiş) bir pre-aktif matrikstir. Terminal karboksil grup N- hidroksisüksinimid ile esterleşerek aktive edilmiştir. Primer amino grubu içeren ligandlar kimyasal açıdan çok kararlı bir amid bağı oluşturmak için bu aktif maddeye doğrudan bağlanmaktadır. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow yüksek aktivitesini korumak için kullanılmadan önce uzaklaştırılması gereken % 100 izopropanol içinde bir

süspansiyon olarak temin edilir. Kolon dolgu maddesinden izopropanolün uzaklaştırılması için talimatlar ve ligand ile birleştirmek için aşağıdaki işlemler yapıldı. Birleştirme basamağından önce ön-aktive edilmiş kolon dolgu maddesinin bağlanma kapasitesini maksimum seviyede tutmak için çözeltiler soğukta (0°C'den 4°C'ye) kullanıldı, tüm yıkama basamaklarının zaman aralığı azaltıldı ve ligandla birleştirilmeden önce tüm çözeltiler hazırlandı.

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (25 mL) önce 1 mM soğuk HCl ile yıkandı. Daha sonra kolon dolgu maddesinin üzerine birleştirme tamponu (0.2 M NaHCO<sub>3</sub> / 0.5 M, NaCl / 5mM Lisinopril) eklendi. Reaksiyon 4 °C'de bir gecede gerçekleştirildi. Birleştirme tamamlandıktan sonra, ortamdaki reaksiyona girmemiş grupların bloke edilmesi için 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) çözeltisi içinde birkaç saat bekletildi. Birleştirmeden sonra kolon dolgu maddesi iki farklı tampon (sırasıyla yüksek ve düşük pH) ile yıkandı. İlk yıkama için yaklaşık 250 mL 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.5) kullanıldı ve yıkama 3-6 kez tekrarlandı. Daha sonra ikinci yıkama için yaklaşık 250 mL 0.1 M asetat tamponu (pH 4.5) kullanıldı ve bu yıkama da 3-6 kez tekrarlandı. Bu işlemlerden sonra NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow üzerine dengeleme tamponu (20 mM Tris/0.3M NaCl, pH=8.0) eklenerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1 cm x 10 cm'lik kolona yerleştirilerek paketlenildi. Kolona eklenen jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile 3 gün boyunca dengelendi. Eluat ile dengeleme tamponununun 280 nm'de absorbanlarının birbirine eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğu belirlendi. Bu şekilde afinite kolonu saflaştırma yapmak için hazır hale getirilmiş oldu.

### **3.2.3. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enziminin saflaştırılması**

#### **3.2.3.1. Koyun akciğeri eldesi**

Mezbahannede yeni kesilmiş taze koyun akciğerleri laboratuvara getirildi. Akciğerlerin sağlıklı görünen birkaçının değişik bölgelerinden 50 g kadar doku kesilerek alındı. Bu alınan kısım bir bistüri yardımıyla küçük kübik parçalara ayrıldı. Parçalanmış akciğer 250 mL'lik hacimde Tris (50 mM, pH 7.4), tamponu içine eklendi. Bu karışım mikser yardımıyla 3 dakika parçalanmaya maruz bırakıldı. Bu esnada

mikserin etrafına buz konularak ısınması önlenildi. Elde edilen homojenat daha ileri bir parçalanma için ultrasonik homojenizatörde 10-15 dakika uygulandı.

Karıştırma sırasında beherin etrafına buz bırakıldı ve daha sonra beherdeki karışım santrifüj tüplerine konup soğutmalı santrifüj cihazında 8500 devirde +4 °C'de 1 saat boyunca santrifüj edildi. Bu işlem birkaç kez yapıldı. Santrifüjden sonra tüpün üst kısmındaki sıvı alınarak saflaştırma işleminde kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

### **3.2.3.2. Koyun akciğerinin afinite kolonuna uygulanması ve enzim elüsyonu**

1 cm x 10 cm boyutlarındaki afinite kolonuna NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi tris tamponu ile yüklendi. Kolon aynı tampon ile 20 mL/saat akış hızı ile 4 gün boyunca dengelendi. Koyun akciğeri homojenatı tris tamponu ile dengelenmiş olan NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow afinite kolonuna peristaltik pompa kullanılarak uygulandı. Akciğer homojenat çözeltisinin tamamı kolondan geçtikten sonra kırmızı renk tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirilmeye devam edildi ve bu şekilde kolonun yıkanması sağlandı. Daha sonra kolondan 20 mM Tris / 0.3 M NaCl (pH=8.0) geçirilerek yıkandı. Yıkama ise spektrofotometrik okumada absorbans değerinin 0.1 olmasıyla tamamlandı. Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu (50 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, pH= 9.0) ile elüe edildi. Bu işlemlerin tümünde peristaltik pompanın akış hızı 20 mL/saat olarak ayarlandı. Bu yöntem Pantaliano metodundan modifiye edilmiştir (Pantaliano, 1984; Sabeur ve ark., 2001).

Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE ile çalışılırken literatürde kullanılan optimum şartlar uygulandı. Elüsyonlar 3'er mL olacak şekilde tüplere alındı, her birinde aktivite değerleri okundu. Yüksek enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen bu tüplerden oluşan stok enzim çözeltisinin son aktivitesi belirlendi. Tüpler daha sonra gerek jel elektroforezi ve gerekse enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere küçük porsiyonlar halinde derin dondurucuda saklandı.

### 3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ACE'nin saflığının kontrolü

ACE saflaştırıldıktan sonra % 4-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970). Öncelikle elektroforez plakaları su ile ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaların her iki kenarında aralık oluşturucu çubuklar kullanılarak plakalar üst üste getirildi ve kısıkaçlarla tutturuldu. Plakalar sabitleştirildikten sonra içerisinde sızdırmayı engelleyen sünger içeren jel hazırlama kabine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0.3 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Bu jelin donması beklenirken üzerine ince bir n-bütanol tabakası dökülerek jelin pürüzsüz olması sağlandı (dökme işlemi yana eğilerek yapılır). Bir saat ayırma jelinin donması beklenip ayırma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığma jeli, ayırma jelinin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarını oluşturmak için tarak jelin içine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Tarak uçlarında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi (hava kabarcığı oluşur ise oksijen, polimerizasyonu inhibe edecek ve kuyucukların alt tarafındaki jel yüzeyinde bozukluğa neden olacaktır). Yığma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve jelin üst kısmının çok kuruması engellendi. Yığma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak numune kuyuları belirlendi. Her bir kuyucuk saf su ile yıkandı, daha sonra kuyucuklar yürütme tamponu ile dolduruldu ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örneklerine numune tamponu eklendikten sonra üzerine takip boyası olarak % 0.1 bromtimol mavisi damlatıldı. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi ve bu karışım 65 °C'de su banyosunda 90 saniye bekletildi. Her bir kuyucuğa 20, 30, 40 ve 50 µL enzim örneği ilave edildi. Numuneler ince bir enjektör ile jeldeki kuyulara enjekte edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 60 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelerek burada birikti. Sonra akım 80 volt'a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütme işlemine devam edildi. Numune tamponuna katılan brom timol mavisi ile numune bantları takip edildi ve takip boyası

aşağıya ulaştığında akım kesildi. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel boyama çözeltisine bırakıldı ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletilerek boyanması sağlandı. Jel boyandıktan sonra çözeltiden çıkarılarak I. yıkama çözeltisine bırakıldı. Daha sonra bantların daha iyi belirginleşmesi için jel II. yıkama çözeltisine bırakıldı. Jelin rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).

Ayırma jeli: 5 mL 1.5M Tris-HCl (pH= 8.8), 6.6 mL % 30 akrilamid- % 2.7 bisakrilamid, 0.2 mL % 10'luk SDS, 6.6 µL TEMED, 100 µL % 10'luk amonyum persülfat (APS) ve 8 mL bidistile su karıştırıldı.

Yığıma jeli: 2.5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8), 1.33 mL % 30 akrilamid % 2.7 bisakrilamid, 0.1 mL % 10'luk SDS, 5 µL TEMED, 50 µL % 10'luk APS ve 6.1 mL bidistile su karıştırıldı. APS çözeltisi taze hazırlandı ve jel çözeltisi karıştırılırken hemen APS eklendi.

Çizelge 3.1.SDS-PAGE elektroforezi için ayırma jeli ve yığıma jeli konsantrasyon değerleri

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
Tris-HCl (pH= 8.8)	5 mL	-
Tris-HCl (pH= 6.8)	-	2.5 mL
% 30 akrilamid - % 2.7 bisakrilamid	6.6 mL	1.33 mL
% 10'luk SDS	0.2 mL	0.1 mL
TEMED	6.6 µL	5 µL
% 10'luk APS	100 µL	50 µL
Bidistile su	8 mL	6.1 mL

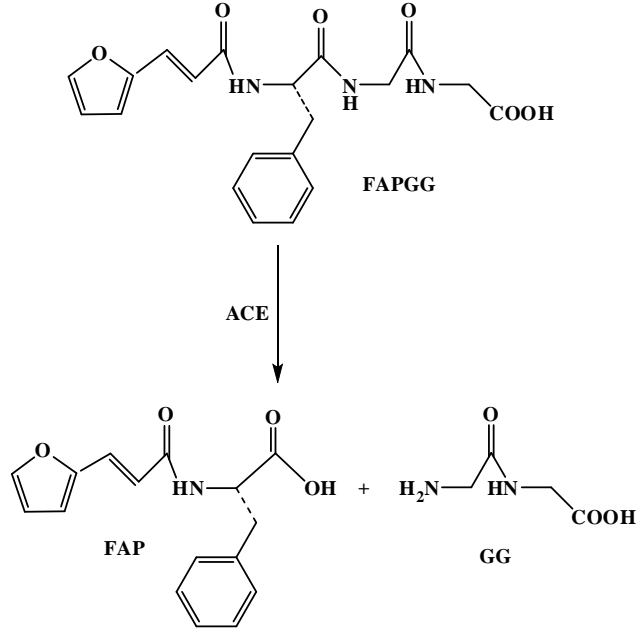
### 3.2.5. Koyun akciğeri ACE'nin alt birimlerinin SDS-PAGE ile moleköl ağırlıklarının belirlenmesi

Koyun akciğeri ACE enziminin alt birimlerinin moleköl ağırlığını belirlemek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. SDS proteinleri denatüre ederek alt birimlerine ayırır. Elektroforez resminde gözlenen bant toplam moleköl kütlesi değil, alt birimlerinin moleköl ağırlığıdır. Bu amaçla yapılan elektroforez 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Enzimin alt birimlerinin moleköl ağırlığını belirlemek için standart protein karışımında (protein markırı) elektroforez jelinden yürütölmesi gereklidir. Bu nedenle moleköl ağırlıkları 40 kDa ile 500 kDa aralığında değişen standart proteinlerden oluşan ticari belirteç Fermentas SM0671 kullanıldı. Jel hazırlanıp elektroforez tankına yerleştirildikten sonra kuyulardan birine 5 µL standart markır çözelti yüklendi. Diğer kuyulara ise enzim numuneleri tatbik edilerek yürütölüdü. Yürütme işleminin bittikten sonra jel boyama ve yıkama işleminin ardından jelin fotoğrafı çekildi. Enzim ve standartların  $R_f$  değerleri  $R_f = \frac{\text{enzimin yürütölme mesafesi}}{\text{boyanın yürütölme mesafesi}}$  formölünden hesaplanarak  $R_f = \log M_A$  standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten ve grafiğin denkleminin yararlanarak  $R_f$  değeri hesaplanan koyun akciğeri anjiotensin konvertin enziminin moleköl ağırlığı hesaplandı (Şekil 4.4) (Laemmli, 1970).

### 3.2.6. Enzim aktivitesinin ölçölümü

Aktivite ölçölümü için; kontrol (kör) ve numune olmak üzere iki tüp alındı ve tüplerin her birine 100 µL uygun saf enzim (veya homojenat) eklendi. Daha sonra kontrol tüpüne 900 µL HEPES tamponu eklendi ve karıştırdı. Spektrofotometre kontrol küveti ile sıfırlandı. Numune tüpüne ise 700 µL 50 mM (pH 7.5) HEPES tamponu ve 200 µL 1 mM'lık substrat (FAPGG) eklendi ve karıştırdı ve 345 nm'de absorban ölçölüdü. Numune tüpü 30 dakika 35°C'de inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonra tüplerin 345 nm'deki absorbanları tekrar ölçölerek absorbanlarındaki azalış miktarı bulundu.





Şekil 3.1. ACE enziminin FAPGG substratı ile reaksiyonu.

Yukarıdaki reaksiyonda reaksiyona giren FAPGG 345 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan ACE enzimi FAPGG’nin azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 345 nm’de takip edilmektedir. Bu yöntem Holmquist metodundan modifiye edilmiştir (Holmquist ve ark., 1979; Andújar Sánchez ve ark., 2003).

Enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki “Eş.3.1” kullanıldı.

$$A = \frac{\Delta OD}{0.517} \times \frac{V_c}{V_e} \times f \quad (3.1)$$

A: mL başına enzim ünitesi (EU/mL)

$\Delta OD$ : Bir dakikadaki absorbans değişimi

$V_c$ : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

$V_e$ : Ölçümün yapıldığı küvete eklenen enzim numunesinin hacmi

f: Seyreltme faktörü

0.517  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ : Ekstinksiyon katsayısı

Çizelge 3.2. Koyun akciğeri ACE'nin aktivite ölçüm küvet içeriği

	<u>Kontrol Küveti</u>	<u>Numune Küveti</u>
50 mM HepsNa/0.3 M NaCl/10 µM ZnCl <sub>2</sub>	900 µL	700 µL
1 mM FAPGG	-	200 µL
Koyun akciğeri	100 µL	100 µL
35 °C'de 30 dakika inkübasyon		

### 3.2.7. ACE ile yapılan kinetik çalışmalar

#### 3.2.7.1. Koyun akciğeri ACE aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE'nin optimum sıcaklığı, sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu kullanılarak belirlendi. Aktivite ölçümü için kullanılacak olan HEPES tamponu, ACE ve FAPGG substratı küvet içerisine eklendi, bir vorteks yardımı ile karıştırıldı ve spektrofotometrede ilk absorbans alındı. Daha sonra numune sıcaklığı ayarlanan sabit sıcaklık sirkülasyon banyosuna bırakıldı. Otuz dakika sonunda tekrar sabit sıcaklık sirkülasyon banyosundan çıkarılıp spektrofotometrede son absorbans okunarak aktiviteler hesaplandı. Ölçümler 20-60 °C arasında 5'er °C aralıklarla yapıldı.

#### 3.2.7.2. Koyun akciğeri ACE aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE'nin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.2 olan HEPES tamponları hazırlandı. Bu pH'daki tamponlar kullanılarak tek tek ACE aktiviteleri ölçüldü. Aktivite ölçümü için aynı yöntem uygulandı. Aktivite ölçümü 0.2 birim aralıkta olmak üzere 6.8-8.2 pH değerleri arasında gerçekleştirildi. 6.8-8.2 pH değerleri arasında 0.2 birim aralıklarla ölçümler yapıldı.

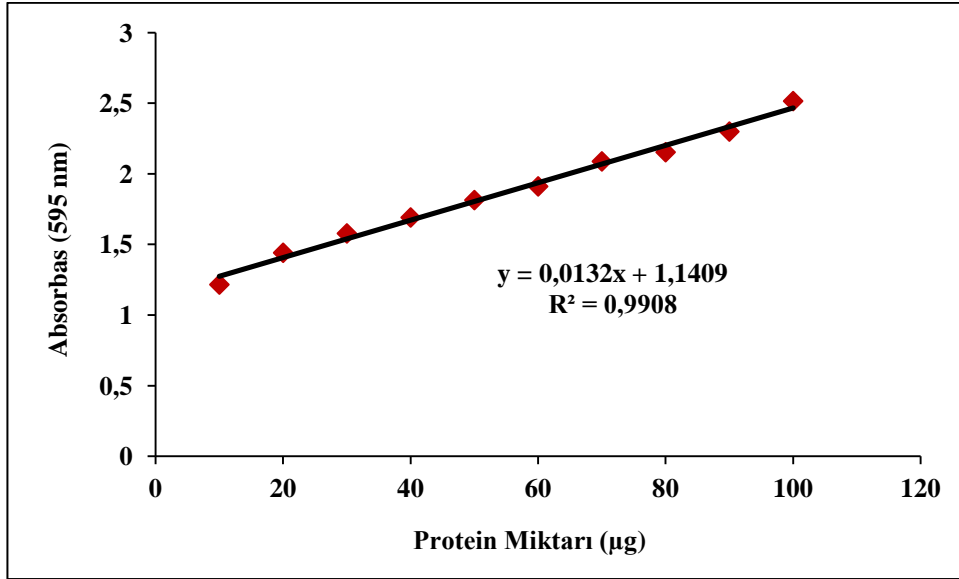


## 4. BULGULAR

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Yöntemle tayin yapabilmek için önceden standart bir grafik hazırlandı. Bu grafik bilgisayar ortamında Microsoft Excel 2010 programı kullanılarak çizildi. 10-100 µg protein/mL konsantrasyon aralığındaki protein çözeltileri ile bu çözeltilerin 595 nm'deki absorbansları arasında çizilen bu standart grafik çizildi. Bu standart grafik yardımıyla hem homojenat hem de saf enzim çözeltilerindeki protein miktarı belirlendi.

Standart grafik çiziminde kullanılan protein çözeltilerinin konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen 595 nm'deki absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.

### 4.2. Koyun Akciğeri Anjiotensin Konverting Enziminin Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Yapılan çalışmada koyun akciğeri afinitive kromatografisi ile saflaştırılan

anjiotensin konverting enzim numuneleri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de verilmiştir.

#### 4.2.1. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enzimi için saflaştırma sonuçları

Akciğer homojenatı için mL’deki enzim ünitesi 64.475 EU/mL, mL’deki protein miktarı da 24.477 mg protein/mL olarak bulundu.

Akciğer homojenatı için spesifik aktivite “Eş.4.1” deki gibi hesaplandı.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{64.475}{24.477} = 2.634 \quad (4.1)$$

Koyun akciğerinden saflaştırılan enzim çözeltisinin Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini yapıldı. Ayrıca enzimin aktivitesi belirlenerek enzim ünitesi EU/mL cinsinden hesaplandı. Anjiotensin konverting enzimin enzim ünitesi hem homojenatta hem de saflaştırma sonucunda elde edilen elüsyonlarda belirlendi. Koyun akciğerinden saflaştırılan enzim çözeltisi için mL’deki enzim ünitesi 65.120 EU/mL, mL’deki protein miktarı da 0.00386 mg/mL olarak hesaplandı.

Saflaştırılan akciğer anjiotensin konverting için spesifik aktivite aşağıdaki gibi bulunmuştur.

$$\frac{\text{EU / mL}}{\text{mg protein / mL}} = \frac{65.120}{0.00386} = 16870.466 \quad (4.2)$$

Saflaştırma oranı ise;

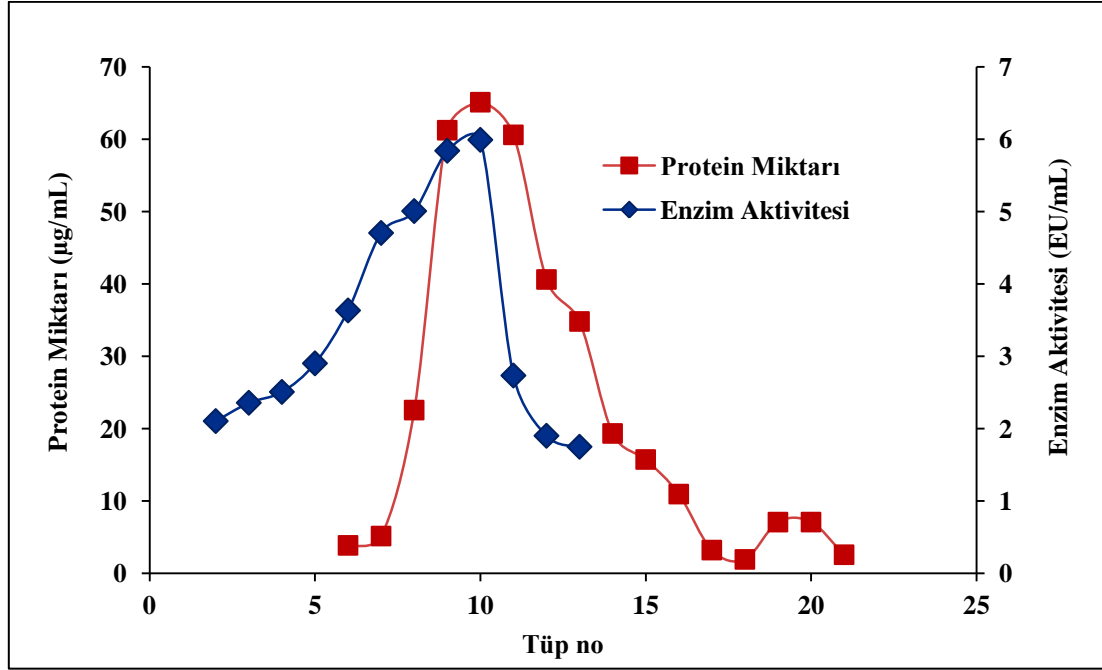
$$\frac{\text{Spesifik Aktivite1}}{\text{Spesifik Aktivite2}} = \frac{16870.466}{2.634} = 6405 \quad (4.3)$$

olarak hesaplandı.

Bu değere göre homojenatın doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucunda enzim homojenattan 6405 kat saflaştırıldı.

Saflaştırılan fraksiyonlardaki protein miktarı 595 nm’de verilen standart eğrinin

regresyon denkleminde her bir fraksiyon için  $\mu\text{g/mL}$  protein miktarları belirlendi. Grafikten de anlaşılacağı üzere yaklaşık 8-15 nolu fraksiyonların hem yüksek protein miktarı ve hem de yüksek enzim aktivitesi gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.2).



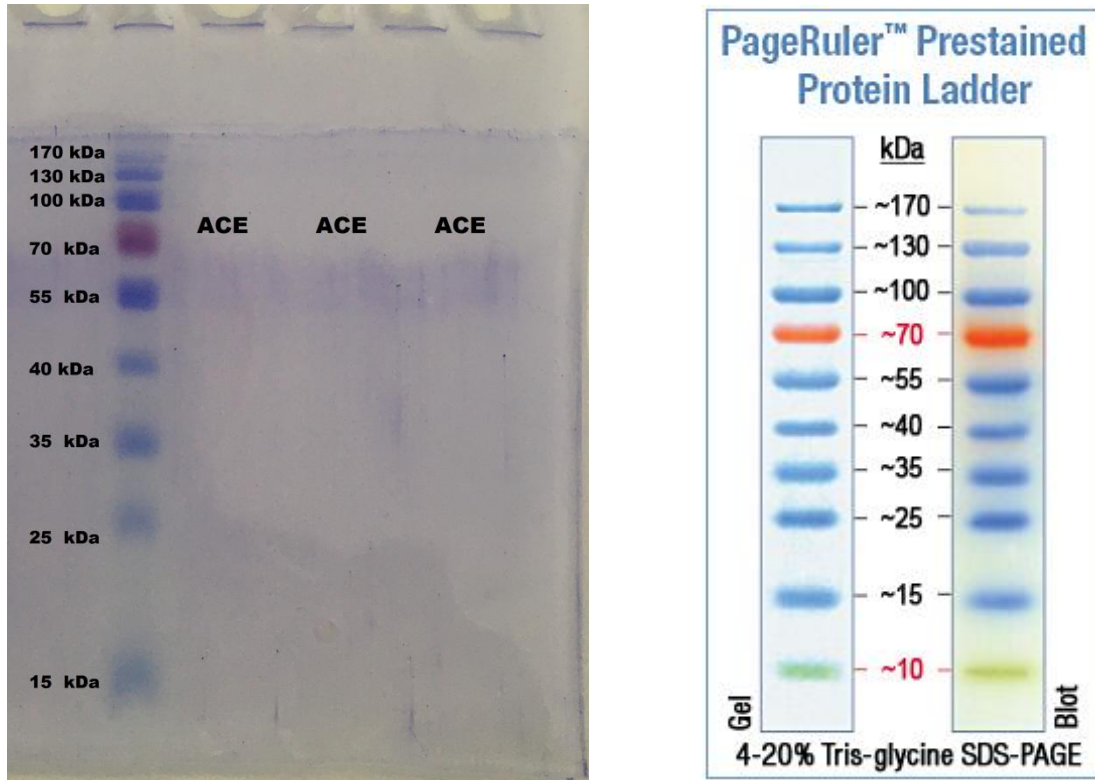
Şekil 4.2. Afinite kolonundan alınan koyun akciğeri fraksiyonlarının kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.

Çizelge 4.1. Koyun akciğeri ACE'nin saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite(EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Koyun akciğeri	64.475	50	24.477	1223.85	3223.75	2.634	100	1.0
NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow Kromatografisi	65.120	15	0.00386	0.0579	976.8	16870.466	30	6405

### 4.3. Koyun akciğeri ACE'nin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

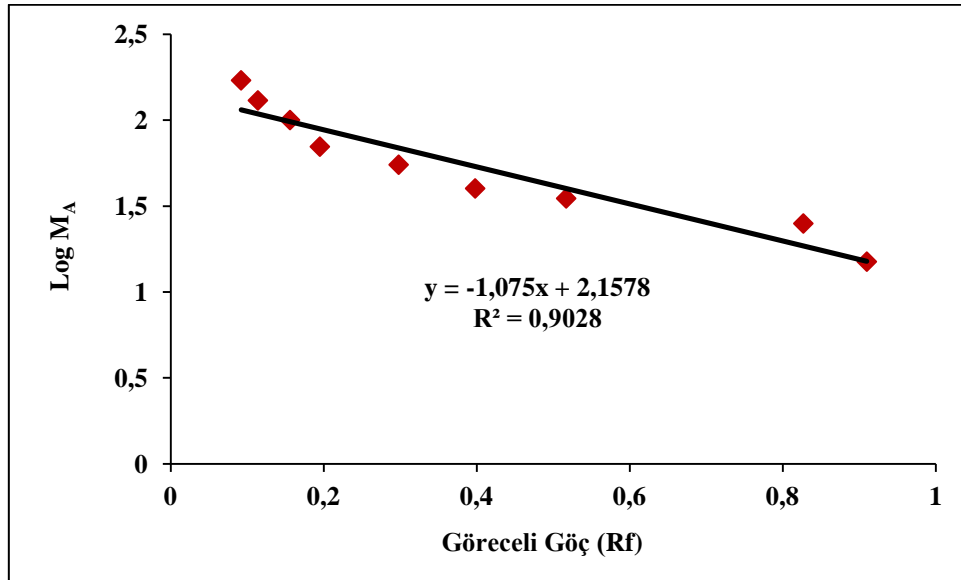
Koyun akciğerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzimin (ACE) saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlığını belirlemek için SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla % 4-10 kesikli dikey SDS-PAGE elektroforez sistemi uygulanarak birkaç kuyucuğa saf enzim, en uçtaki iki kuyucuğada protein markırı doldurularak proteinler yürütüldü. Elektroforez jeli üzerinde elde edilen bantları gösteren fotoğraf şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE'nin jel elektroforez fotoğrafı ve standart markırın (belirteç) orjinal göstergesi.

#### 4.4. Koyun akciğeri ACE'nin Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Moleköl Ağırlığının Belirlenmesine Ait Sonuçlar

Koyun akciğeri ACE'nin alt birimlerinin moleköl ağırlıklarının belirlenmesi bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Enzim numuneleri SDS-PAGE'de yürütüldü. Elde edilen bantların fotoğrafları çekildi. Yürütölen standartların ve enzimlerin  $R_f$  değerleri ölçölüp hesaplanarak Göreceli Göç ( $R_f$ ) –  $\log M_A$  standart grafiği çizildi. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enzimin alt birimlerinden birinin moleköl ağırlığı çizilen grafik denkleminde 60 kDa ve diğerinin 70 kDa olarak hesaplandı.



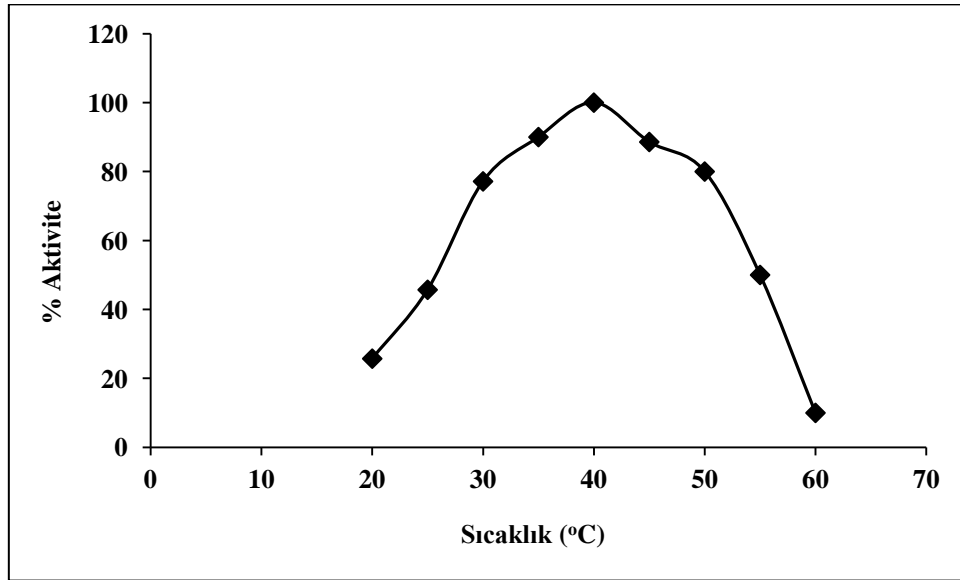
Şekil 4.4. Koyun akciğeri anjiotensin konverting enziminin SDS-PAGE ile altbirimlerinin moleköl ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik.

### 4.3. Koyun Akciğeri ACE'nin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları

Koyun akciğeri ACE' nin optimum sıcaklığını belirlemek üzere optimum pH'ya sahip tampon çözelti kullanıldı. 20 °C ile 60 °C arasında her 5 °C'de bir olmak üzere bölüm 3.2.7.1'de anlatıldığı gibi aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler çizelge 4.2 ve şekil 4.5'te gösterildi.

Çizelge 4.2. Koyun akciğeri ACE'nin sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri

(°C)	20	25	30	35	40	45	50	55	60
<b>EU</b>	11.61	20.63	34.82	40.62	45.13	39.98	36.11	22.57	4.513
<b>%Akt.</b>	25.73	45.71	77.16	90.01	100	88.59	80.01	50.01	10



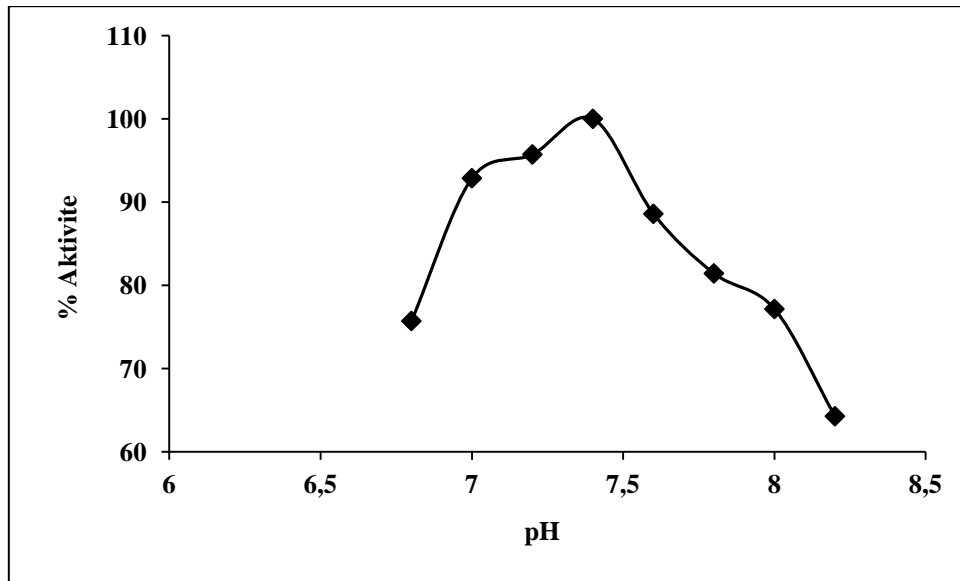
Şekil 4.5. Koyun akciğeri ACE'nin Sıcaklık-% Aktivite grafiği.

#### 4.4. Koyun Akciğeri ACE'nin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları

Koyun akciğeri ACE'nin optimum pH'sını belirlemek için bölüm 3.2.7.2'de anlatıldığı gibi pH değeri 6.8 ile 8.2 arasında değışen tamponda ölçüm yapıldı. Bu amaçla tamponun pH'sı her seferinde 0.2 birim değıştirilerek 6.8 - 8.2 değeri arasında 8 farklı pH'da aktivite ölçümleri yapılarak elde edilen değeri çizelge 4.3 ve şekil 4.6'de gösterildi.

Çizelge 4.3. Koyun akciğeri ACE'nin pH, aktivite ve % aktivite değeri

pH	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
EU	34.17	41.91	43.20	45.13	39.98	36.75	34.82	29.01
%Akt.	75.72	92.87	95.72	100	88.59	81.43	77.16	64.28



Şekil 4.6. Koyun akciğeri ACE'nin pH - % Aktivite grafiği.



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hipertansiyon, hastaları yüksek tansiyon yoluyla etkileyen ve insan sağlığına zarar veren kronik bir sağlık sorunu olarak bilinir. Hipertansiyon; kalp hastalığı, felç, anevrizma ve böbrek yetmezliği gibi diğer birçok durumda bir risk faktörü olabilir. Obezite, stres veya hareketsiz yaşam tarzı dahil olmak üzere birçok faktör hipertansiyonu tetikleyebilir. Arteriyel vazokonstriksiyonu ve hücre dışı hacmi etkileyebilen renin-anjiotensin sistemi (RAS) ile kan basıncı düzenlenirken anjiotensin konverting enzimin (ACE, EC.3.4.15.1) oynadığı hayati bir rol vardır. ACE, dekapeptid anjiotensin I'i güçlü vazokonstriktör anjiotensin II'ye dönüştürmede bir katalizör görevi görürken, buna ek olarak bradikinin bileşiğide inhibe olur, bu da arterlerin sistemik genişlemesine ve dolayısıyla arteriyel kan basıncında bir azalmaya neden olur. Bu nedenle ACE, bir vazodilatatör olan bradikinin bileşiğini inhibe ederken güçlü bir vazokonstriktör olan anjiotensin II bileşiğinin üretimini desteklemesi açısından damar sisteminde doğrudan ikili bir role sahiptir. Hipertansiyon tedavisinde ACE inhibitörleri uygulandığında, anjiotensin II oluşumunda bir düşüş ve buna bağlı olarak kan basıncında bir azalma meydana gelir. Hipertansiyon hastalarında genellikle kaptopril, lisinopril ve enalapril gibi ACE inhibitörleri kullanılır (Sayer ve Bhat 2014; Bhagani ve ark., 2018).

Bu çalışmada ACE koyun akciğerinden saflaştırıldı ve karakterize edildi. Afinite kromatografisi yönteminde kolon dolgu maddesi olarak NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kullanıldı. ACE afinite kromatografisi yöntemi ile tek basamakta 6405 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 16871 EU/mg protein olarak belirlendi. Yapılan bir çalışmada, anjiotensin konverting enzim (ACE) insan akciğer dokusundan yaklaşık 7000 kat saflaştırılmıştır (Grönhagen-Riska ve Fyhrquist, 1980). Erickson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ACE, rat bağırsak mukozasından lisinopril-sepharose ile afinite kromatografisi ve jel filtrasyonundan sonra 4500 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış ACE enziminin spesifik aktivitesi, substrat olarak kullanılan benzoil-Gly-His-Leu ile 65 U/mg protein olarak hesaplanmıştır (Erickson ve ark., 1992).

Yapılan çalışmalarda anjiotensin konverting enzimin iki formu olduğu belirlenmiştir. Birincisi akciğer ve böbrek gibi somatik dokularda bulunan somatik ACE (130-180 kDa) ve ikincisi ise somatik ACE'nin C-terminal alanıyla aynı olan yalnızca bir katalitik alan içeren testis ACE (90-110kDa) olmak üzere iki izoenzimi mevcuttur (Howard ve ark., 1990; Bernstein ve ark., 2018). Örneğin; yetişkin ev sineklerinden (*Musca domestica*) saflaştırılan ACE enziminin molekül ağırlığı, SDS-PAGE ile 67 kDa olarak belirlenmiştir (Lamango ve ark., 1996). ACE enzimi, kurbağa yumurtalıklarından afinite kromatografisi yöntemiyle deterjan ve tripsin ile ekstrakte edilerek saflaştırılmıştır. Hem deterjanla ekstrakte edilen hem de tripsin ile ekstrakte edilen ACE enziminin molekül ağırlığı 150 kDa olarak belirlenmiştir (Miano ve ark., 2003). Rat bağırsak mukozasından saflaştırılan ACE enziminin SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 160 kDa olarak bulunmuştur (Erickson ve ark., 1992). El-Dorry ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise tavşan testislerinden saflaştırılan ACE enziminin molekül ağırlığı 100 kDa olarak belirlenmiştir (El-Dorry ve ark., 1982). Çalışmamızda koyun akciğerinden saflaştırılan ACE enziminin saflığı ve moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile belirlendi ve jelin üzerinde 60 kDa ve 70 kDa olmak üzere iki bant gözlemlendi. Bu da saflaştırdığımız enzimin farklı iki alt birime sahip olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda koyun akciğerinden saflaştırılan anjiotensin konverting enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu optimum pH ve optimum sıcaklık aralığı belirlendi. Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE için optimum pH 7.4 ve optimum sıcaklık 40 °C olarak bulundu. Çalışmamıza benzer şekilde insan plazmasından saflaştırılan ACE enziminin optimum pH değeri 7.4 ve optimum sıcaklık 35-40 °C arasında bulunmuştur (Basi ve Turkoglu, 2018). Başka bir çalışmada ise tavşan akciğerinden ACE saflaştırılmıştır ve optimum sıcaklık 37 °C ve optimum pH 8.0-8.3 olarak belirlenmiştir (Abdulazeez Mansurah ve ark., 2013).

Anjiotensin konverting enzim (ACE) epitel veya nöroepitelyal hücrelerde, endotelyal hücrelerde, kalp, akciğer, beyin, böbrek ve testislerde membrana bağlı bir formda; kan, serum, plazma, seminal ve lenf sıvısı, beyin omurilik sıvısı ve çok sayıda vücut sıvısında ise çözünür bir formda mevcut olan iki değerli bir dipeptidil karboksil metaloproteidazdır (Bell ve Madri, 1990; Danser ve ark., 1994). Yapılan çalışmaların

çoğunda membrana bağlı ACE enzimi ile saflaştırma yapılırken membrandan enzimi izole edebilmek için deterjan gibi kimyasallar kullanılmıştır. Ancak saflaştırmanın sonraki adımlarında deterjanı uzaklaştırmak gibi ilave işlemlere gerek duyulmaktadır. Bu da fazladan iş ve maliyet demektir. Örneğin; ACE enzimi insan akciğer dokusundan saflaştırılırken Triton X-100 ile çözündürme yapılmıştır (Grönhagen-Riska ve Fyhrquist, 1980). Köpek testislerindeki ACE enzimi saflaştırılırken deterjan ve proteaz inhibitörleri kullanılmıştır (Sabeur ve ark., 2001). Devekuşu (*Struthio camelus*) akciğerinden ACE enzimi saflaştırılırken Triton X-100 kullanılmıştır (Mojallal-Tabatabaei ve ark., 2013). Çalışmamızda koyun akciğer homojenatı tris tamponu (pH 7.4) ile hazırlandı. Sonuç olarak, akciğer homojenatı hazırlanırken ACE enziminin çözünebilir formları çözelti ortamına geçti. Koyun akciğer homojenatından çözünebilir ACE formları afinite kromatografisiyle saflaştırıldı. Bu yüzden Nonidet P-40, Triton X-100 gibi deterjanlar, tripsin ve proteaz inhibitörleri kullanılmadan tek basamakta başarılı bir saflaştırma gerçekleştirildi. Bu durumda saflaştırma yapılırken hem zaman hem de maliyet açısından bize büyük bir avantaj oluşturdu.

Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri, kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarının tedavisinde genellikle birinci basamak tedavi ilaçları olarak kullanılmıştır. Bu inhibitörlerin hipertansiyon tedavisinde etkili oldukları ve miyokard enfarktüsü sonrası konjestif kalp yetmezliği ve sol ventrikül disfonksiyonunda mortaliteyi azalttığı kanıtlanmıştır. ACE inhibitörleri vazokonstriktif tuz tutucu ve hipertrofiye neden olan peptid anjiotensin II ile vazodilatör ve natriüretik bir peptid olan bradikinin arasındaki dengeyi yeniden sağlar. ACE karmaşık bir enzim olduğu için, ACE inhibitörleri bir dizi diğer vazoaktif maddenin metabolizmasını değiştirir. ACE inhibitörleri, kalp atış hızını artırmadan sistemik vasküler direnci azaltır ve natriürezi teşvik eder. İskemik olayları inhibe eder ve plakları stabilize ederler. Aynı zamanda, diyabetik nefropati ve nöropatinin ilerlemesini geciktirir ve antioksidan görevi görürler. Devam eden çalışmalarda, ACE inhibitörlerinin hem hafızayla ilgili bozukluklarda hem de kanserde koruyucu etkisi olduğu gözlemlenmiştir (Hanif ve ark., 2010).

Bununla birlikte kaptopril, lisinopril ve fosinopril gibi sentetik ACE inhibitörlerinin birçok yan etkisi bulunmaktadır. Tüm antihipertansif ajanlar gibi, ACE inhibitörleri özellikle plazma renin aktivitesi yüksek olan hastalarda hipotansiyona

neden olabilir. ACE inhibitörleri, özellikle böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda veya potasyum takviyeleri veya potasyum tutucu diüretikler alan hastalarda aldosteronda azalma nedeniyle hiperkalemiye neden olabilir. Öksürük ve anjiyoödem de ACE inhibitörlerinin sık görülen yan etkileridir. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalarda yan etkisi daha az olduğu belirlenen bitkiler, antioksidan bileşikler ve peptidler gibi doğal bileşiklerin ACE aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Örneğin; brokoli proteini hidrolizatlarından IPPAYTK, LVLPGELAK ve TFQGPPHGIQVER peptidleri saflaştırılmıştır. Bu peptidler ACE aktivitesi üzerine sırasıyla 23.5, 184.0 ve 3.4  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$  değerleri ile önemli ölçüde inhibisyon etkisi göstermiştir (Dang ve ark., 2019). Başka bir çalışmada doğal bir bitki olan *Bromelia antiacantha* Bertol.'dan güçlü ACE inhibitör aktivitesine sahip iki yeni peptit; TTFHTSGY ve GYDTQAIQV izole edilmiştir ve  $\text{IC}_{50}$  değerleri sırasıyla 142  $\mu\text{M}$  ve 1.0 mM olarak belirlenmiştir (Villadóniga ve Cantera, 2019). Tilapia balığı deri jelatin hidrolizatından elde edilen Leu-Ser-Gly-Tyr-Gly-Pro (LSGYGP) peptidinin ACE aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* etkisi araştırılmıştır. 2.577  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{IC}_{50}$  değerine sahip olan LSGYGP peptidinin spontan hipertansif ratlarda antihipertansif etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Chen ve ark., 2020).

Bu çalışmada, anjiyotensin konverting enzim (ACE) koyun akciğerinden afinite kromatografisi yöntemiyle ilk kez saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saflaştırılan ACE enziminin molekül ağırlığı, saflığı ve optimum koşulları belirlendi. ACE, NHS-activated Sepharose 4 fast flow kolon dolgu maddesiyle deterjan, ultrafiltrasyon, nötral tuzlarla çöktürme, diyaliz gibi yöntemler kullanılmadan tek basamakta başarılı bir şekilde 6405 kat saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin saflığı ve molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile doğrulandı. Bu yöntemde proteinler SDS deterjanı ile denatüre olduğu alt birimlerine ayrılır. Koyun akciğerinden saflaştırılan ACE enziminin SDS-PAGE ile 60 ve 70 kDa olan iki alt birime ayrıldığı gözlemlendi. Bu da ACE enziminin iki alt monomere sahip dimer yapıda bir enzim olduğunu gösterdi.

Anjiyotensin konverting enzim (ACE), hücre zarının lümen yüzeyinde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı (150 kDa) glikozile edilmiş integral bir zar proteinidir. ACE, dekapeptid anjiyotensin I'in güçlü bir baskı hormonu olan oktapeptid anjiyotensin II'ye dönüşümünü ve bradikininin hidrolizini katalize ederek kardiyovasküler homeostazda

önemli bir rol oynayan dipeptidil karboksipeptidazdır. ACE ayrıca P maddesi, enkefalinler ve endorfinler gibi diğer peptitleri de etkisiz hale getirir. Konuma yönelik ACE inhibitörleri, sistemik hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde etkilidir. ACE; beyin, testis, akciğer, plazma, proksimal renal tübüler hücreler, intestinal epitel hücreleri, uyarılmış makrofajlar, vasküler endotelyum ve kan damarı duvarlarının orta ve adventif katmanları dahil olmak üzere çok çeşitli hücrelerde, dokularda ve biyolojik sıvılarda bulunur (Cushman ve Cheung, 1971; Meng ve Oparil, 1996).

Vasküler endotel ile ilişkili ACE, kısmen normal deneklerde kan basıncının korunmasına ve hayvan modellerinde ve insanda sistemik hipertansiyonun patogenezinin katkısı nedeniyle hem *in vivo* hem de *in vitro* en yoğun çalışılan enzimlerden biridir. ACE bol miktarda bir zar proteini olmasına rağmen, izole edilmesi ve saflaştırılması zor olmuştur (Cushman ve Cheung, 1971; Meng ve Oparil, 1996). Bu yüzden çalışmamızda ACE enzimi etkili ve spesifik bir yöntem olan afinite kromatografisi yöntemiyle tek basamakta başarılı bir şekilde saflaştırıldı. Afinite kromatografisi yöntemi ile binlerce bileşiğin bulunduğu kompleks bir karışımdan tek bir enzim spesifik bir şekilde tek basamakta saflaştırılabilir ve tek bir enzim üzerine çalışmak çok daha etkili sonuçlar verebilir. ACE enzimi kan basıncını düzenleyen önemli bir enzimdir ve hipertansiyon tedavisinde genellikle ACE inhibitörleri kullanılır. Bu yüzden saf ACE aktivitesi üzerine inhibitör araştırması yapmak daha doğru sonuçlar verir. Bundan sonraki çalışmalarda da saf ACE enzimi ile bu inhibitörler üzerine birçok araştırma yapılabilir.



## KAYNAKLAR

- Abdulazeez Mansurah, A., Aimola, I. A., Annette R. O., Abdullahi, S., 2013. Isolation, partial purification and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) lungs. *American Journal of Drug Discovery and Development*, **3**: 120-129.
- Aberg, G., Ferrer, P., 1990. Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *J Cardiovasc Pharmacol*, **15**: S65–S72.
- Aluko, R. E., 2015. Structure and Function of Plant Protein-Derived Antihypertensive Peptides. *Curr. Opin. Food Sci*, **4**: 44–50.
- Amenta, F., Mignini, F., Rabbia, F., Tomassoni, D., Veglio, F., 2002. Protective effect of antihypertensive treatment on cognitive function in essential hypertension: analysis of published clinical data. *J. Neurol. Sci.*, **203–204**: 147–151.
- Ames, M. K., Atkins, C. E., Pitt, B., 2019. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression Journal of veterinary. *Internal Medicine*, **33**: 363–382.
- Andújar-Sánchez, M., Cámara-Artigas, A., Jara-Pérez, V., 2003. Purification of angiotensin I converting enzyme from pig lung using concanavalin-A sepharose chromatography. *Journal of Chromatography B*, **783**: 247-252.
- Aurelie, N. D. C., Touyz, R. M., 2011. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides*, **32**: 2141-50.
- Bader, M., 2013. ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch*, **465**: 79-85.
- Basi, Z., Turkoglu, V., 2018. Purification of angiotensin –converting enzyme from human plasma and investigation of the effect of some active ingredients isolated from *Nigella sativa* L.extract on the enzyme activity. *Biomedical Chromatography*, **32**: 1-8.
- Basi, Z., Turkoglu, V., 2019. *In vitro* effect of oxidized and reduced glutathione peptides on angiotensin converting enzyme purified from human plasma. *Journal of Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*, **1104**: 190-195.
- Bell, L., Madri, J., 1990. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *The American Journal of Pathology*, **137**: 7-12.
- Bernstein, K. E., Khan, Z., Giani, J. F., Cao, D. Y., Bernstein, E. A., Shen, X. Z., 2018. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nature reviews. Nephrology*, **14**: 325–336.
- Beuschlein, F., 2013 Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. *J Endocrinol.*, **168**: R85-R93.
- Bhagani, S., Kapil, V., Lobo, M.D., 2018. Hypertension. *Medicine (Baltimore)*, **46**: 509–515.
- Bhaskar, B., Ananthanarayan, L., Jamdar, S., 2019. Purification, identification, and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from alcalase digested horse gram flour. *LWT*, **103**: 155-161.
- Bicket, D. P., 2002. Using ACE inhibitors appropriately. *Am. Fam. Physician*, **66**: 461–468.

- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-54.
- Brown, N. J., Vaughan, DE., 1998 Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*, **97**: 1411-1420.
- Carey, R. M., Siragy, H. M., 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endoc Rev.*, **24**: 261-71.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1981. Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose-4B. *Analytical Biochemistry*, **116**: 531-536.
- Chen, J. L., Ryu, B., Zhang, Y. Y., Liang, P., Li, C. Y., Zhou, C. X., Yang, P., Hong, P. Z., Qian, Z. J., 2020. Comparison of an angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide from tilapia (*Oreochromis niloticus*) with captopril: inhibition kinetics, in vivo effect, simulated gastrointestinal digestion and a molecular docking study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **100**: 315-324.
- Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., Drago, R., 1990. Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension*, **15**: 327-331.
- Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Hebert, P., Fiebach, N. H., Eberlein, K. A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J. O., Hennekens, CH., 1990. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet*, **335**: 827-38.
- Cushman, D. W., Cheung, H.S., 1971. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, **250**: 261-265.
- Dang, Y. L., Zhou, T. Y., Hao, L., Cao, J. X., Sun, Y. Y., Pan, D. D., 2019. In Vitro and in Vivo Studies on the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity Peptides Isolated From Broccoli Protein Hydrolysate. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, **67**:6757-6764.
- Danser, A. H., vanKats, J. P., Admiraal, P. J., Derkx, F. H., Lamers, J. M., Verdouw, P. D., Saxena, P. R., Schalekamp, M. A., 1994. Cardiac renin and angiotensin : uptake from plasma versus in situsynthesis. *Hypertension*, **24**: 37-48.
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., Ozcelik, B., 2017. Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients*, **9**: pii: E316.
- De, Mello., W. C., Frohlich, ED., 2014. Clinical perspectives and fundamental aspects of local cardiovascular and renal Renin-Angiotensin systems. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **5**: 16.
- Deddish, P. A., Wang, J., Michel, B., Morris, P.W., Davidson, N. O., Skidgel, R. A., Erdös, E. G., 1994. Naturally Occurring Active N-Domain of Human Angiotensin I-Converting Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 7807-7811.
- Dominiczak, A., Delles, C., Padmanabhan, S., 2017. Genomics and precision medicine for clinicians and scientists in hypertension. *Hypertension*, **69**: e10-e13.
- Ehret, G. B., Caulfield, M. J., 2013. Genes for blood pressure: an opportunity to understand hypertension. *Eur. Heart J*, **34**: 951-961.

- Eisele, T., Stressler, T., Kranz, B., Fischer, L., 2012. Automated multi-step purification protocol for Angiotensin-I-Converting-Enzyme (ACE). *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **911**: 64-70.
- El-Dorry, H. A., Bull, H. G., Iwata, K., Thornberry, E. H., Soffer, R. L., 1982. Molecular and catalytic properties of rabbit testicular dipeptidyl carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, **257**: 14128-14133.
- Erickson, R. H., Suzuki, Y., Sedlmayer, A., Song, I. S., Kim, Y. S., 1992. Rat intestinal angiotensin-converting enzyme: purification, properties, expression, and function. *The American Journal of Physiology*, **263**: G466-73
- Ettehad, D., Emdin, C. A., Kiran, A., Anderson, S. G., Callender, T., Emberson, J., Chalmers, J., Rodgers, A., Rahimi, K., 2016. Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **387**: 957–967
- Fan, Y., Yu, Z., Zhao, W., Ding, L., Zheng, F., Li, J., Liu, J., 2020. Identification and molecular mechanism of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Larimichthys crocea* titin. *Food Science and Human Wellness*, **9**: 257-263.
- Ferrario, C. M., 2010. New physiological concepts of the renin–angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. *Hypertension*, **55**: 445–52.
- Forghani, B., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Philip, R., Bakar, J., Hamid, A. A., Saari, N., 2016. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from *Stichopus horrens*: Stability study against the ACE and inhibition kinetics. *Journal of Functional Foods*, **20**: 276-290.
- Ganong., W. F., 1996. *Ganong Tibbi Fizyoloji* (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Ankara, çeviri). Barış Kitabevi, İstanbul. 506.
- Garjon, J., Saiz, L. C., Azparren, A., Elizondo, J. J., Gaminde, I., Ariz, M. J., Erviti, J., 2017. First-line combination therapy versus first-line monotherapy for primary hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.* **1**:CD010316
- Gözükara, M.E., 1997. *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Grönhagen-Riska, C., Fyhrquist, F., 1980. Purification of human lung angiotensin-converting enzyme. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, **40** (8): 711-9
- Hall, J. E., Guyton, A. C., 2010. Role of the kidneys in long-term control of arterial pressure and in hypertension: the integrated system for arterial pressure regulation. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. *Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences*, 213-228.
- Hanif, K., Bid, H. K., Konwar, R., 2010. Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertens Res.*, **33**: 11-21.
- Hayek, T., Keidar, S., Mei, Y., Oiknine, J., Breslow, J., 1995. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on LDL lipid peroxidation and atherosclerosis progression in apo E deficient mice. *Circulation*, **92**: I-625.
- Heeneman, S., Sluimer, J. C., Daemen, M. J., 2007. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circ Res.*, **101**: 441–54.
- Holmquist, B., Bünning, P., Riordan, J. F., 1979. A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, **95** (2): 540-548.


- Howard, T. E., Shai, S. Y., Langford, K. G., Martin, B. M., Bernstein, K. E., 1990. Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 4294–4302.
- Karahan, F., 2019. *Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Sığır Akciğerinden Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim Üzerine Hipertansiyonu Önleyici Bazı Etken Maddelerin İn Vitro Etkilerinin Araştırılması* (doktora tezi, basılmamış). Van YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tuşba, Van.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2012. *Biyokimya*. 9. baskı. Aktif Yayınevi, Erzurum. 643.
- Khong, T. K., Adeyeye, E., 2019. First-line drugs for hypertension. *Drug Therapeut. Bull*, **57**: 135–136.
- Kitt, J., Fox, R., Tucker, K. L., McManus, R. J., 2019. New Approaches in Hypertension Management: a Review of Current and Developing Technologies and Their Potential Impact on Hypertension Care. *Current hypertension reports*, **21**: 44.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lamango, N. S., Sajid, M., Isaac, R. E., 1996. The endopeptidase activity and the activation by Cl<sup>-</sup> of angiotensin-converting enzyme is evolutionarily conserved: purification and properties of an an angiotensin-converting enzyme from the housefly, *Musca domestica*. *Biochemical Journal*, **314**: 639–646.
- Law, M. R., Morris, J. K., Wald, N. J., 2009. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*, **338**: b1665.
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G., Geller, D. S., 2001. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, **104**: 545–556.
- Liu, P. R., Lan, X. D., Yaseen, M., Chai, K. G., Zhou, L. Q., Sun, JH., Lan, P., Tong, Z. F., Liao, D. K., Sun, L. X., 2020. Immobilized metal affinity chromatography matrix modified by poly (ethylene glycol) methyl ether for purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from casein hydrolysate. *Journal of Chromatography B*, **1143**: 122042.
- Lonn, E., Gerstein, H. C., Smieja, M., Mann, J. F. E., Yusuf, S., 2003. Mechanisms of cardiovascular risk reductions with ramipril: insights from HOPE and HOPE substudies. *Eur. Heart J.*, **5**: A43–A48.
- Manschot, S. M., Biessels, G. J., Cameron, N. E., Cotter, M. A., Kamal, A., Kappelle, L. J., Gispen, W. H., 2003. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.*, **966**: 274–282.
- Memarpoor-Yazdi, M., Zare-Zardini, H., Mogharrab, N., Navapour, L., 2020. Purification, Characterization and Mechanistic Evaluation of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Zizyphus Jujuba Fruit. *Scientific Reports*, **10**: 3976
- Meng, Q. C., Oparil, S., 1996. Purification and assay methods for angiotensin-converting enzyme. *Journal of Chromatography A*, **743**: 105-122.
- Miano, A., Quassinti, L., Maccari, E., Murri, O., Amici, D., Bramucci, M., 2003. Purified angiotensin converting enzyme from *Rana esculenta* ovary influences

- ovarian steroidogenesis *in vitro*. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **59** (4): 269-76.
- Mojallal-Tabatabaei, Z., Asoodeha, A., Housaindokhta, M. R., Chamani, J., 2013. Purification and biochemical characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) from ostrich lung: The effect of 2,2,2-trifluoroethanol on ACE conformation and activity. *Process Biochemistry*, **48**: 1091–1098.
- Murray, B. A., FitzGerald, R. J., 2007. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Food Proteins: Biochemistry, Bioactivity and Production. *Curr. Pharm. Des.*, **13**: 773–791.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. Worth Publishers, USA. 743.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E., 2002. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık, Ankara. 813.
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifkova, R., Dominiczak, A. F., Grassi, G., Jordan, J., Poulter, N. R., Rodgers, A., Whelton, P. K., 2018. Hypertension. *Nature reviews. Disease primers*, **4**: 18014.
- Pantoliano, M. W., Holmquist, B., Riordan, J. F., 1984. Affinity chromatographic purification of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry*, **23** (5):1037-1042.
- Quassinti, L., Miano, A., Bramucci, M., Maccari, E., Amici, D., 1998. Purification of swine serum angiotensin converting enzyme with high recovery of activity using lisinopril coupled to epoxy activated sepharose 6B. *Biochemistry and Molecular Biology for Life Scientists*, **44** (5): 887-895.
- Sabeur, K., Vo, A. T., Ball, B. A., 2001. Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. *Reproduction*, **122** (1): 139-146.
- Sasaki, C., Tamura, S., Tohse, R., Fujita, S., Kikuchi, M., Asada, C., Nakamura, Y., 2019. Isolation and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from pearl oyster (*Pinctada fucata*) shell protein hydrolysate. *Process Biochemistry*, **77**: 137-142.
- Sayer, G., Bhat, G., 2014. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiology clinics*, **32**(1): 21-32.
- Seelinger, E., Wronski, T., Ladwig, M., Rebeschke, T., Persson, P. B., Reinhardt, H. W., 2005. The “body fluid pressure control system” relies on the renin-angiotensin-aldosterone system:balance studies in freely moving dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, **32**: 394-399.
- Singer, P. S., 2019. Updates on hypertension and new guidelines. *Adv. Pediatr.*, **66**: 177–187.
- Singh, M., Mensah, G. A., Bakris, G., 2010. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin.*, **28**: 545–59.
- Skidgel, R. A., Erdos, E., 1993. Biochemistry of angiotensin I-converting enzyme. In: Robertson JIS, Nicholls MG (eds). The Renin-Angiotensin System. *Raven Press Ltd: New York*, Pp: 1.01–10.10.
- Solski, L. V., Longyhore, D. S., 2008. Prevention of type 2 diabetes mellitus with angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **65**: 935-940.
- Tu, M. L., Liu, H. X., Zhang, R., Chen, H., Mao, F. J., Cheng, S. Z., Lu, W. H., Du, M., 2018. Analysis and evaluation of the inhibitory mechanism of a novel

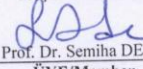
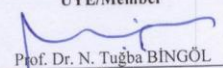
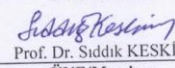
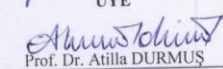
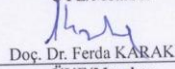
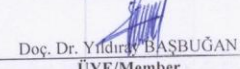
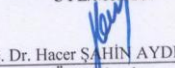

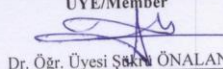
- angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide derived from casein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66** (16): 4139-4144
- Varagic, J., Ahmad, S., Nagata, S., Ferrario, C. M., 2014. ACE2: angiotensin II/angiotensin-(1-7) balance in cardiac and renal injury. *Curr. Hypertens. Rep.*, **16**: 420.
- Villadóniga, C., Cantera, A. M. B., 2019. New ACE-inhibitory peptides derived from  $\alpha$ -lactalbumin produced by hydrolysis with *Bromelia antiacantha* peptidases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **20**: 101258.
- Waanders, F., De, Vries., L. V., Van., Goor, H., Hillebrands, J. L., Laverman, G. D., Bakker, S. J. L., Navis, G., 2011. Aldosterone, from (patho)physiology to treatment in cardiovascular and renal damage. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **9**: 594-605.
- Wolf-Maier, K., Cooper, R. S., Kramer, H., Banegas, J. R., Giampaoli, S., Joffres, M. R., Poulter, N., Primatesta, P., Stegmayr, B., Thamm, M., 2004. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada and the United States. *Hypertension*, **43**: 10-7.
- Xie, J. L., Chen, X. J., Wu, J. J., Zhang, Y. Y., Zhou, Y., Zhang, L. J., Tang, Y. J., Wei, D. Z., 2018. Antihypertensive effects, molecular docking study, and isothermal titration calorimetry assay of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66** (6): 1359-1368.
- Yang, X., Chen, K., Liu, H., Zhang, Y., Luo, Y., 2019. Purification and identification of peptides with high angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity from honeybee pupae (*Apis mellifera*) hydrolysates with in silico gastrointestinal digestion. *European Food Research and Technology*, **245**: 535-544.
- Zhang, Q., Song, C. C., Zhao, J., Shi, X. M., Sun, M. L., Liu, J., Fu, Y. H., Jin, W. G., Zhu, B. W., 2018. Separation and Characterization of Antioxidative and Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Jellyfish Gonad Hydrolysate. *Molecules*, **23**(1): 94.

## **ÖZ GEÇMİŞ**

1990 yılında Van'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Van'da tamamladı. 2008 yılında Van Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar Bölümü'nü kazandı ve 2010 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2011 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2015 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2017 yılı güz döneminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında Van Devlet Hastanesi'ne Sağlık Memuru olarak atandı ve halen göreve devam etmektedir.

		<b>VAN YÜHADYEK</b> <b>VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ</b> Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu
<b>ÇALIŞMA ONAY BELGESİ</b>		
VAN YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY) ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE APPROVAL CERTIFICATE		
Araştırmanın Adı:	Anjiotensin Konverting Enzimin (ACE, E.C.3.4.15.1) Afinite Kromotografisi Yöntemiyle Koyun Akciğerinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	
Research Title:	Purification and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE, E.C.3.4.15.1) from sheep lung	
Araştırmacı(lar):	Yürütücü / Chief investigator: Prof. Dr. Vedat TÜRKÖĞLU	
Investigator(s):	Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Yük. Lis. Öğr. Fatih AYDIN	
Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research:		
Tür / species: -	Sayı / Numbers: -	
Yaş /Age:-	Cinsiyet / Sex:-	
Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 10.10.2019		
Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: 10.10.2021		

**Karar:**  
 Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleeri Etik Kurul Onayı gerekmemektedir.  
 Tarih: 03/10/2019 Karar No: 2019/09  
**Decision:**  
 The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval.  
 Date: 03/10/2019 Decision number: 2019/09

	<b>BASKAN/CHAIR</b>  Prof. Dr. Semiha DEDE	
<b>ÜYE/Member</b>  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL <b>ÜYE</b>	<b>ÜYE/Member</b>  Prof. Dr. Siddik KESKİN <b>ÜYE/Member</b>	<b>ÜYE/Member</b> Prof. Dr. Nalan ÖZDAL <b>ÜYE/Member</b>
 Prof. Dr. Atilla DURMUŞ <b>ÜYE/Member</b>	 Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ <b>ÜYE/Member</b>	 Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN <b>ÜYE/Member</b>
Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR <b>ÜYE/Member</b>	 Doç. Dr. Hacer ŞAHİN AYDINYURT <b>ÜYE/Member</b>	 Dr. Öğr. Üyesi Oruç YUNUSOĞLU <b>ÜYE/Member</b>
 Dr. Öğr. Üyesi Şakir ÖNALAN	Vet. Hek. Kerem OĞRAK <b>ÜYE/Member</b>	Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET
	Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	

T.C  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 14/12/2020

Tez Başlığı / Konusu:

**Anjiotensin Konverting Enzimin (ACE, E.C. 3.4.15.1) Afinite Kromatografisi Yöntemiyle Koyun Akciğerinden Saffaştırılması ve Karakterizasyonu**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 82 sayfalık kısmına ilişkin, 14/12/2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 (Dört)'dür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayımlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

14/12/2020  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Fatih AYDIN

Öğrenci No: 17910002074

Anabilim Dalı: Kimya

Program: Biyokimya

Statüsü: Y. Lisans Doktora 

**DANIŞMAN ONAYI**  
UYGUNDUR

*(Handwritten Signature)*

Prof. Dr. Vedat TÜRKÖĞLU  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR

