

**KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN KOYUN
MİDESİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU
VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

NAMIK KILINÇ

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

2011

Her hakkı saklıdır.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN KOYUN
MİDESİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BAZI İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Namık KILINÇ

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN KOYUN MİDESİNDEN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Doç.Dr.Şükrü BEYDEMİR danışmanlığında, Namık KILINÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 07/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Doç.Dr.İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Doç.Dr. Orhan ERDOĞAN

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek lisans Tezi

KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN KOYUN MİDESİNDEN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Namık KILINÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Bu tez kapsamında karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) I ve II izoenzimleri(CA I ve CA II), koyun midesinden saflaştırıldı. Saflaştırma; afinite kromatografisi yöntemi ile gerçekleştirildi. Saflaştırılan izoenzimlerin verimi ve saflaştırma katsayıları CA I için %51,9 ve 529,4 CA II için %78 ve 615,2 kat olarak hesaplandı. Enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı ve her iki izoenzim için alt birim molekül kütlesi 26,7 kDa olarak belirlendi. Ayrıca, koyun midesi karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerine hidrataz ve esteraz aktivitesi kullanılarak bazı ilaçların etkileri araştırıldı. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan enrofloksasin, tylosin, ampisilin sodyum, amikasin sülfat ve kanamisin sülfat için IC₅₀ değerleri ve amikasin sülfat, kanamisin sülfat ve enrofloksasin ilaçları için K_i sabitleri hesaplandı.

2011, 101 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik Anhidraz, izoenzim, koyun midesi, ilaç, inhibisyon

ABSTRACT

Master Thesis

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOZYMES FROM SHEEP STOMACH, INVESTIGATION EFFECTS OF SOME DRUGS ON THE ENZYME ACTIVITY

Namık KILINÇ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

In the present study, CA I and CA II isoenzymes were purified from sheep stomach with a specific activity of 4864.8 EU/mg, 5652.02 EU/mg and yield of 51.9%, 78% using Sepharose 4B-L-Tyrosine sulfanilamide affinity gel chromatography, respectively. The over all purifications from sheep stomach CA I and CA II were approximately 529.4 and 615.2 fold respectively. To check the purify of enzymes, Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed and a single band was observed. In addition, effects of some drugs on sheep stomach CA I and CA II isoenzymes activities were investigated. IC_{50} and K_i values calculated for the drugs which show inhibition effects.

2011, 101 pages

Keywords: Carbonic anhydrase, isoenzyme, sheep stomach, drug, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bütün çalışmalarım süresince yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı Fen Fakültesi Dekanı hocam Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na sonsuz şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen biyokimya çalışma grubu hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof. Dr. Hasan ÖZDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. İlhami GÜLÇİN'e, değerli arkadaşlarım Sayın Arş. Gör. Zuhal ALIM'a, Sayın Musa AKKUŞ'a, Sayın Arş. Gör. Mahinur ÇAM'a, Sayın Mustafa İŞGÖR'e, Sayın Bülent ŞENGÜL'e, Sayın Büşra KONCUK'a, Sayın Çetin BAYRAK'a, Sayın Süleyman YILMAZ'a, Sayın Salih TUNCAY'a ve Sayın Hülya GÖÇER'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Çalışmalarımın tüm aşamalarını yürüttüğüm Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nde çalışan tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın her aşamasında maddi manevi desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı aileme ve dualarıyla desteğini çok yakından hissettiğim sevgili anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Namık KILINÇ

Haziran, 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzim İnhibisyonu	3
1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi	6
1.3. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri	11
1.3.1. Sülfonamidler	11
1.3.2. Sülfamatlar	12
1.4. Deneysel Çalışmada Kullanılan ilaçlar	13
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
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 çözeltiler ve hazırlanması	23
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Koyun midesinde saflaştırılan CA I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler	27
3.2.1.a. Sepharose-4B afinite kolonunun hazırlanması	27
3.2.1.b. Koyun midesinin temini ve homojenat hazırlanması	28
3.2.1.c. Koyun midesi homojenatının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu	29
3.2.1.d. Diyaliz	29
3.2.1.e. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü	30
3.2.1.f. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini	31

3.3. Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini	32
3.3.1. CO ₂ -hidrataz aktivitesi	32
3.2.2. Esteraz aktivitesi	34
3.4. Protein tayini	35
3.4.1. Kalitatif protein tayini	35
3.4.2. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini.....	35
3.5. Koyun midesi dokusundan saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimleri ile ilgili yapılan kinetik çalışmalar.....	36
3.5.1. Koyun midesinden saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar.....	36
3.5.2. p-Nitrofenilasetat substratı için K _M ve V _{max} 'ın bulunmasına yönelik çalışmalar.....	37
3.5.3. Koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaç etkilerinin belirlenmesi	37
3.5.4. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	55
4.2. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması Sonuçları	56
4.2.1. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri.....	56
4.2.2. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü	57
4.2.3. Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin optimum sıcaklıklarının belirlenmesine ait sonuçlar	58
4.2.4. p-Nitrofenilasetat substratı için K _M ve V _{max} değerlerinin belirlenmesi.....	61
4.3. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine Bazı İlaçların Belirlenmesine Ait çalışma sonuçları	63
4.5.Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine İnhibitör Etkisi gösteren Bazı İlaçlar İçin K _i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların sonuçları.....	76

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	88
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	104

SİMGELER DİZİNİ

Ar	2,4-Dinitrofenil
CA	Karbonik anhidraz enzimi
CNBr	Siyanojen bromür
Da	Dalton
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Enzim
E.C.	Enzim kod numarası
E.U	Enzim ünitesi
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi
Glu	Glutasyon
I	İnhibitör
IC ₅₀	Enzimatik aktiviteyi yarıya indiren inhibitör konsantrasyonu
K _i	İnhibitörün enzime ilgisini gösteren sabit
K _M	Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
M _k	Molekül kütlesi
NADPH	Nikotinamidadenin dinükleotit fosfat (indirgenmiş form)
P	Ürün
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum peroksidisülfat
Ph	Fenil
R	Metil
S	Substrat
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	Trihidroksimetil aminometan
V _{max}	Maksimum hız
λ	Dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	CA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi.....	9
Şekil 1.2.	Ampisilin molekülünün yapısal formülü	13
Şekil 1.3.	Gentamisin molekülünün yapısal formülü.....	14
Şekil 1.4.	Amikasin molekülünün yapısal formülü.....	15
Şekil 1.5.	Kanamisin sülfat molekülünün yapısal formülü	15
Şekil 1.6.	Tylosin molekülünün yapısal formülü	16
Şekil 1.7.	Enrofloksasin molekülünün yapısal formülü	17
Şekil 3.1.	CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri	28
Şekil 4.1.	Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik	55
Şekil 4.2.	Afinite kromatografisiyle saflaştırılan koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı	57
Şekil 4.3.	SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle koyun midesi CA I ve CA II enzimlerinin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik	58
Şekil 4.4.	Koyun midesi CA I enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği	60
Şekil 4.5.	Koyun midesi CA II enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği	60
Şekil 4.6.	Koyun midesi CA I enzimi için 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	61
Şekil 4.7.	Koyun midesi CA II enzimi için 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği.....	62
Şekil 4.8.	Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği	71
Şekil 4.9.	Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği	71
Şekil 4.10.	Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	72
Şekil 4.11.	Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	72
Şekil 4.12.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	73
Şekil 4.13.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	73
Şekil 4.14.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	74
Şekil 4.15.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	74
Şekil 4.16.	Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	75

Şekil 4.17. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	75
Şekil 4.18. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	76
Şekil 4.19. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	76
Şekil 4.20. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	77
Şekil 4.21. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	77
Şekil 4.22. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	78
Şekil 4.23. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	78
Şekil 4.24. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	79
Şekil 4.25. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	79
Şekil 4.26. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	80
Şekil 4.27. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği.....	80
Şekil 4.28. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	81
Şekil 4.29. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği	81
Şekil 4.30. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerine kanamisin sülfat'ın etkisi	84
Şekil 4.31. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerine kanamisin sülfat'ın etkisi.....	84
Şekil 4.32. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi	85
Şekil 4.33. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi.....	85
Şekil 4.34. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerine enrofloksasin'in etkisi.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Karbonik anhidrazın saflaştırılmasında kullanılan bazı önemli afinite jelleri.....	19
Çizelge 3.1.	Hidrataz aktivitesinde kullanılan maddelerin katılma sırası ve miktarları	33
Çizelge 3.2.	Esteraz aktivitesinde kullanılan maddelerin katılma sırası ve miktarları	34
Çizelge 3.3.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	39
Çizelge 3.4.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	39
Çizelge 3.5.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	40
Çizelge 3.6.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	40
Çizelge 3.7.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	41
Çizelge 3.8.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	41
Çizelge 3.9.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	42
Çizelge 3.10.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	42
Çizelge 3.11.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	43

Çizelge 3.12. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	43
Çizelge 3.13. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	44
Çizelge 3.14. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	44
Çizelge 3.15. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	45
Çizelge 3.16. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	45
Çizelge 3.17. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	46
Çizelge 3.18. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	46
Çizelge 3.19. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	47
Çizelge 3.20. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	47
Çizelge 3.21. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde tylosin'in IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	48
Çizelge 3.22. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde tylosin'in IC ₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	48
Çizelge 3.23. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde tylosin'in IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	49

Çizelge 3.24.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde tylosin'in IC ₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları.....	49
Çizelge 3.25.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	50
Çizelge 3.26.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	51
Çizelge 3.27.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	52
Çizelge 3.28.	Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	53
Çizelge 3.29.	Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in K _i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	54
Çizelge.4.1.	Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması basamakları.....	56
Çizelge 4.2.	Koyun midesi CA I izoenzimi için değişik sıcaklıklarda yapılan aktivite değerleri.....	59
Çizelge 4.3.	Koyun midesi CA II izoenzimi için değişik sıcaklıklarda yapılan aktivite değerleri.....	59
Çizelge 4.4.	Koyun midesi CA I ve CA II izoenzimleri için p-nitrofenilasetat substratı ile K _M , ve V _{max} çalışmaları sonuçları.....	62
Çizelge 4.5.	Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	63
Çizelge 4.6.	Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	63
Çizelge 4.7.	Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	64
Çizelge 4.8.	Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	64
Çizelge 4.9.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	64
Çizelge 4.10.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	65
Çizelge 4.11.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	65
Çizelge 4.12.	Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	65
Çizelge 4.13.	Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	66
Çizelge 4.14.	Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	66

Çizelge 4.15. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	66
Çizelge 4.16. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	67
Çizelge 4.17. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	67
Çizelge 4.18. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	67
Çizelge 4.19. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	68
Çizelge 4.20. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	68
Çizelge 4.21. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçlar.....	68
Çizelge 4.22. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	69
Çizelge 4.23. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	69
Çizelge 4.24. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları.....	69
Çizelge 4.25. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	70
Çizelge 4.26. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları.....	70
Çizelge 4.27. Koyun midesi karbonik anhidraz I izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların hidrataz aktivitesiyle belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	82
Çizelge 4.28. Koyun midesi karbonik anhidraz II izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların hidrataz aktivitesiyle belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	82
Çizelge 4.29. Koyun midesi karbonik anhidraz I izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların esteraz aktivitesiyle belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	82
Çizelge 4.30. Koyun midesi karbonik anhidraz II izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların esteraz aktivitesiyle belirlenen IC ₅₀ değerleri.....	83
Çizelge 4.31. Koyun midesi CA I izoenzimi için bulunan K _i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	86
Çizelge 4.32. Koyun midesi CA II izoenzimi için bulunan K _i değerleri ve inhibisyon tipleri.....	87
Çizelge 4.33. Koyun midesi CA I ve CA II için yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları.....	97
Çizelge 4.34. Koyun midesi CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktivitesiyle bulunan IC ₅₀ değerlerinin toplu gösterilişi.....	97
Çizelge 4.35. Koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesiyle bulunan inhibisyonun toplu görüşleri.....	98

1.GİRİŞ

Biyokimya alanında yer alan çalışmaların büyük çoğunluğunu enzim çalışmaları oluşturmaktadır (Lehninger 2005). Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan %100 lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Örneğin, karbondioksit'in (CO₂) su ile reaksiyona girmesiyle karbonik asit meydana gelir ve fizyolojik pH'da meydana gelen karbonik asitin bir kısmı hemen bikarbonat iyonuna dönüşmektedir. İyonizasyon süreci enzim gerektirmez ve asit özelliğine bağlıdır. Canlı vücudunda ise bikarbonat iyonu oluşması karbonik anhidraz enziminin katalizörlüğünde meydana gelir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapısındadır. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile tanımlanır. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, 40.000.000 s⁻¹ ile katalazdır (Fresht 1999).

Enzimlerin genel özellikleri şu şekilde açıklanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Benzer tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima tek çeşit veya aynı tip reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltırlar.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye gelmesini sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev alırlar.

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre son derece spesifiklerdir. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı oldukça spesifiklerdir, hatta bazı enzimlerin substrat özgüllükleri mutlaklıdır. Birçok biyo-katalizörün stereospesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D-formunu ürüne çevirirlerken, bazıları da

L-formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedirler. Ayrıca, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen fakat farklı kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olan enzimler de vardır. Bu tip enzimler izoenzim olarak adlandırılırlar. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri değişiktir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da görülebilirler. İzoenzimlere örnek olarak bu tez kapsamında çalışılan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri verilebilir (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Enzimlerin etki ederek ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimler genelde ya substrat adının sonuna “-az” eki getirilerek ya da ilk keşfedenlerin koydukları isimlerle tanınmaktadırlar. Örneğin, fosfataz, üreaz, lipaz, tripsin ve pepsin gibi. Bu isimler çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiği için Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her bir enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörülmüştür (Yüreğir 1981). Bundan dolayı enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmışlardır;

Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup enzimler dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar olarak da anılan enzimlerdir.

Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu gruptandır.

Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu gruba dahildir.

Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

Ligazlar: Enerjice zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

Enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir süreçtir. Enzimlerin oldukça büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan değişen şartlara karşı çok hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltildeki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu meydana gelen ürün veya enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar, inhibitör veya aktivatörler sayılabilir. Her enzim için aktivite maksimum olduğu pH değerleri mevcuttur. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite azalır.

1.1 Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması hatta tamamen giderilmesi olayına inhibisyon denir. Bu olayı gerçekleştiren bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, çoğunlukla düşük mol kütlelerine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, canlı sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu nedenle enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu şekilde gerçekleştirirler.

Enzim etki mekanizmalarının araştırılmasında da inhibisyon olayından faydalanılır (Gözükara 1997). Enzimatik inhibisyon iki grupta incelenir;

a) Dönüşümsüz inhibisyon

b) Dönüşümlü inhibisyon

Dönüşümsüz inhibisyon'da inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna güzel bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat, enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek, inaktif diizopropilfosfo-enzim oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir (Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri artar (Segel 1975; Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir: Enzim-İnhibitör kompleksi (EI) ve Enzim-Substrat-İnhibitör kompleksi (ESI) (Telefoncu 1986; Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır.

ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla; ES kompleksi ortamdan sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür (Segel 1975; Telefoncu 1986).

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tür inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır (Segel 1975; Gilbert 1992).

Birçok multienzim sistemi, net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında; sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma

merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde; substrat, bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde ise; enzim, substratlardan başka bileşikler tarafından etkilenmektedir. Bazı allosterik enzimler homotropik-heterotropik karakterde olup, modülatörlerden birisi o enzimin substratı, diğerleri başka bileşiklerdir. Allosterik enzimlerin kinetiği, Michaelis-Menten kinetiğinden farklılık gösterir (Stryer 1988).

İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde $1/V$ ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilir. Kesim noktalarından değerlendirmeler yapılır. K_i sabitlerinin bulunmasının ikinci yöntemi Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır (Telefoncu 1986).

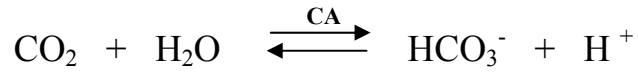
1.2 Karbonik Anhidraz Enzimi

Canlı metabolizmasının önemli bir metaboliti olan CO_2 'in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ayrıca CO_2 , karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde yüksek bir çözünürlüğe sahip olmasına rağmen, lipitlerde çözünürlüğü çok azdır. CO_2 'in ise hem sulu çözeltilerde hem de lipitlerde çözünürlüğü yüksektir. Bu nedenle CO_2 çok kolay şekilde hücre içine ve dışına difüze olurken, bikarbonatın hücre membranından geçmesi için taşınması gerekmektedir. pH 6,3'ün üzerinde, CO_2 ve HCO_3^- arasındaki denge HCO_3^- 'a doğru kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO_2 ve HCO_3^- konsantrasyonlarının sürdürülebilmesinde problemler oluşur. Fizyolojik pH'da CO_2 'in HCO_3^- 'a dönüşümü çok yavaştır ve enzim tarafından katalizlenmesi gerekir. CO_2 'in HCO_3^- 'a çevrimi CO_2 'in hücre içinde tutulmasında önemli iken, HCO_3^- 'ın CO_2 'e çevrimi ise bikarbonatın hücre içine girişini kolaylaştırır. Böylece, enzimatik olarak CO_2 ve HCO_3^- 'ın çevrilmesi yalnızca hücresel enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin CO_2 miktarını artırmasında değil, ayrıca hücresel proseslerin başarılabilmesi için uygun hücre içi CO_2

ve HCO_3^- seviyelerinin devamında da hücreye yardım eder. İşte, CO_2 ve HCO_3^- 'ın birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen 'karbonik anhidraz' enzimidir (Smith and Ferry 2000).

İlk olarak, 1933 yılında sığır eritrositlerinde tanımlanan karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1), bu tarihten sonra tüm memeli dokularında, prokaryot, ökaryot ve *archaea*'da yaygın olarak bulunan ve yapısında Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimidir (Supuran and Scozzafava 2001, Nuti 2007).

Karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'ın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



İlk defa memeli eritrositlerinden izole edilen CA, daha sonraki yıllarda, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

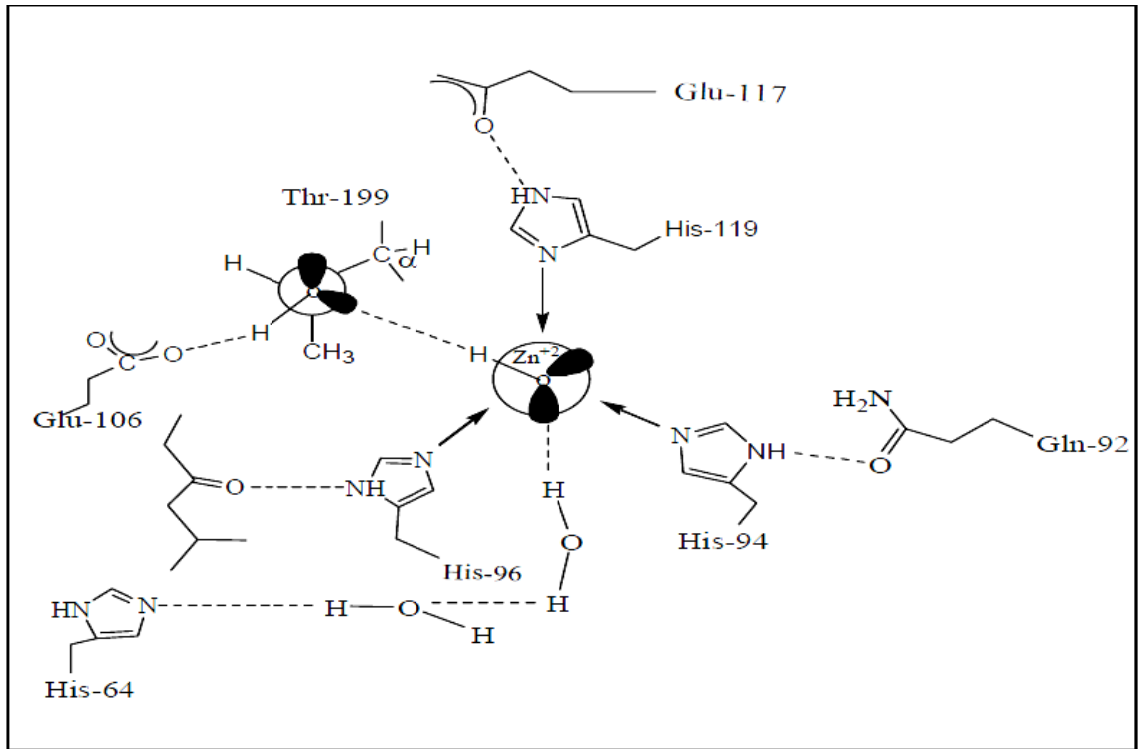
CA enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynamaktadır. Doku/organlar ile akciğer arasındaki CO_2 /bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev alır (Chegwidden *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000).

Karbonik Anhidraz izoenzimleri α -, β -, γ -, δ ve ϵ -CA olmak üzere evrimsel olarak bağımsız beş ayrı gen ailesi tarafından kodlanır. Bu gen aileleri aminoasit dizilişleri açısından önemli sayılabilecek bir benzerlik göstermemektedir. Bunlar, omurgalılar, bakteriler, algler ve sitoplazmalı yeşil bitkilerde bulunan α -CA'lar, çoğunlukla bakteriler, algler ile tek ve iki kotiledon'lu bitkilerin kloroplastlarında bulunan β -CA'lar başlıca archea ve bazı bakterilerde bulunan γ -CA'lar, bazı deniz diatomlarında bulunan δ -CA'lardır. Memelilerde, değişik katalitik aktiviteleri, hücre içi yerleşim ve organ üretim şekilleri olan α -CA izoenzimlerinden Zn^{+2} iyonu taşıyanlar dikkate alınmalıdır (Maren 1997).

Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkataliktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2003; Supuran *et al.* 2004). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004; Hilvo *et al.* 2005).

Üç boyutlu yapılardan ilki α -CA olup, insan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formlu bir sığır CA-V'i ve E. coli de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bir yapı da Hindistan bufalosunun CA-II 'sinde bulunmuştur. Molekülün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında, α -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer β şeritleri anti paralel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nispetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir (Boriack-Sjodin *et al.* 1995).

Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyuğun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi H_2O veya OH^- ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Ligandlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Şekil 1.1); (Lesburg and Christianson 1995).



Şekil 1.1. CA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi

Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması; son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre CA enziminin; metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Enzim kinetiği hakkında insan HCA-II izoenzimi üzerinde yapılan spesifik bölgenin mutasyonu ve X-ray kristalografisi çalışmalarında da, katalitik mekanizma oldukça ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmıştır. Diğer

izoenzimlerin mekanizmaları genellikle bu mekanizma ile aynı olmasına rağmen, bazı spesifik detaylarda farklı olabilmektedir. Bu çalışmalar sonucunda, CA'nın yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir.

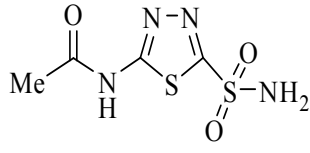
Zn^{+2} iyonuna OH^- iyonunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. Enzimin aktif formu güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır. Bu da Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Stams *et al.* 1988). Tekrar bazik formu olan A formuna geçmek için aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu reaksiyonun gerçekleşmesine His-64 gibi proton yakalayan aktif bölgeler ve ortamdaki tampon bölgeler yardımcı olurlar (Lindskog and Silverman 2000; Supuran and Scozzafava 2001).

Karbonik anhidraz izoenzimleri, şeker hastalığı, yağ, üre, tümör oluşumuna yol açan etkenler ve çok zehirli çeşitli patojenlerin gelişmesini içine alan fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilgili olan geniş bir enzim ailesidir. Diüretikler ve antiglokom ilaçlarının yanı sıra, CA inhibitörlerinin, yeni anti-obezite, anti-kanser ve antienfeksiyon ilaçları olarak kullanımındaki önemi son yıllarda yaygın bir biçimde vurgulanmaktadır (Supuran 2008). Bunlara ek olarak, yeni çalışmalarda CA aktivasyonunun Alzheimer hastalığı için yeni bir tedavi olanağı sağlayabileceği ileri sürülmektedir (Supuran 2008).

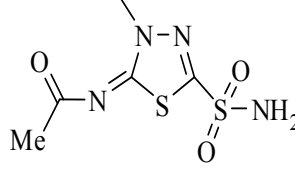
1.3. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri

1.3.1. Sülfonamidler

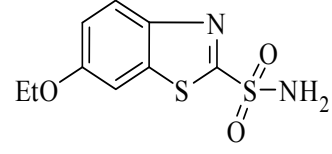
CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik veya hetero aromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler $-SO_2NH_2$ fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Sülfonamidlerin genelde CA-II için K_i değerleri 10^{-5} ile 10^{-10} M arasında değişir. Glokom hastalığı tedavisinde CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmaktadır. Oral yoldan verilen bu ilacın oldukça fazla yan etkileri vardır. Bu yan etkileri azaltmak ve daha etkili bir ilaç molekülü bulmak amacıyla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan CA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır (Supuran and Scozzafava, 2001; Bülbül *et al.* 2002). Günümüzde sülfonamidler glokom hastalığı tedavisi dışında diüretik, anti bakteriyel ve antifungal ilaç olarak yaygın kullanıma sahiptirler. Bu sebepten dünyanın birçok yerinde farklı gruplar tarafından yeni sülfonamid türevleri sentezlenmektedir. Asetazolamid, metazolamid, etazolamid, diklofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi bazı önemli sülfonamid türevleri aşağıda verilmiştir. Sülfonamidler antiglokom ilacı kullanımının yanı sıra CA-IX ile kanser dokularının direk ilişkisi olması sebebiyle kanser teşhisinde kullanılabilir. Ayrıca CA enzimi inhibitörü olan bu moleküllerin yapılan birçok çalışma sonucunda antiobezite, antifungal, antibakteriyel, diüretik ilaç olarakta kullanılabileceği belirtilmiştir (Supuran, 2003).



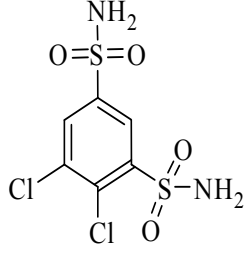
Acetazolamide



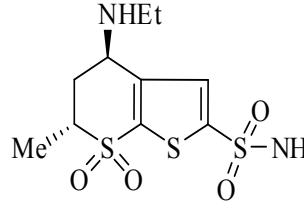
Methazolamide



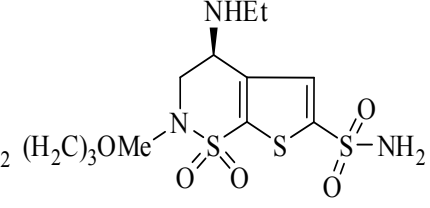
Ethoxzolamide



Diclorophenamide



Dorzolamide



Brinzolamide

1.3.2. Sülfamatlar

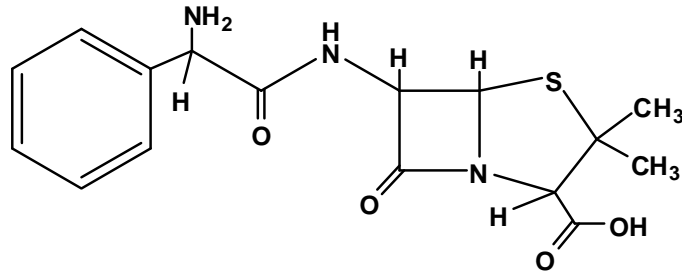
Sülfamatlar $-OSO_2NH_2$ fonksiyonel grubuna sahip bileşiklerdir. Önceleri sülfonamidler sınıfına dahil edilen bu bileşikler daha sonra ayrı bir alt grup olarak adlandırılmıştır. Sülfamatlar günümüzde karbonik anhidraz inhibitörü olmalarının yanı sıra antibiyotik, antiviral, antikanser, antikonvulsant, antiobezite, anti-artrit ajanı, anti-osteoporoz ajanıdır. Sülfamatlar hiperlipidemi ve ateroskleroz tedavisinde de kullanılmaktadır.

Karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde en basit yapılu sülfamat olan sülfamik asittir. Briganti ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Sonraki çalışmalarda çeşitli aromatik sülfamat türevleri sentezlenerek karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir (Abbate *et al.* 2002; Ahmed *et al.* 2001).

1.4 Deneysel Çalışmada kullanılan İlaçlar

Koyun midesi karbonik anhidraz I (CA I) ve karbonik anhidraz II (CA II) izoenzimleri üzerine etkileri incelenen ilaçların özellikleri şöyledir:

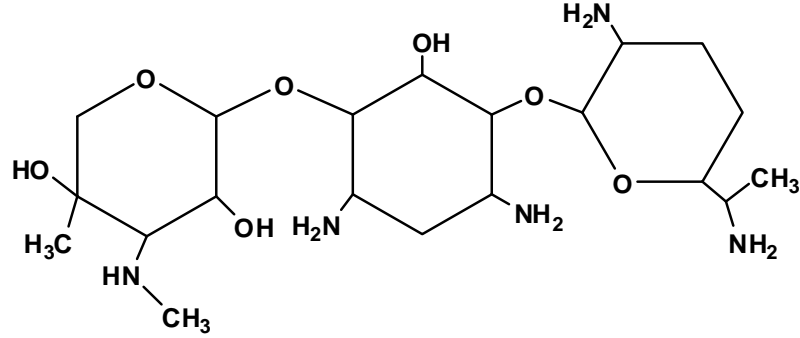
Ampisilin sodyum: Ampisilin mide-bağırsak kanalından kısmen (ortalama %40) absorbe edilir. Absorbsiyonu besinler tarafından kısmen azaltılır. Plazma proteinlerine çok az (%20) bağlanır. Absorbe edilen dozun yaklaşık yarısı böbreklerden esas olarak tübüler salgılanma suretiyle itrah edilir; idrardaki konsantrasyonu yüksektir. Kalan kısmının büyük bölümü karaciğerde safra içine itrah edilir ve az bir kısmı metabolize edilir. Tıkanıklık olmadığı takdirde safradaki konsantrasyonu plazmadakinin 300 katına çıkabilir. Ampisilin yarılanma ömrü 80 dakika kadardır. Ampisilin, *E.coli* ve duyarlı diğer bakterilere (*P. Mirabilis* ve *Enterococcus*'lar gibi) bağlı üriner enfeksiyonlarda kullanılır (Kayaalp 2002).



Şekil 1.2: Ampisilin molekülünün açık yapısı

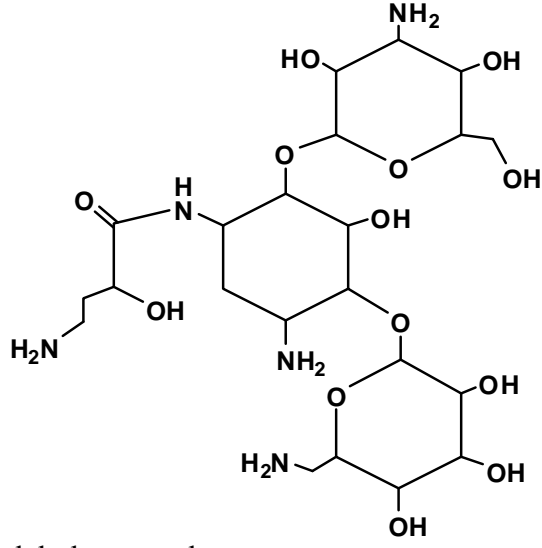
Gentamisin sülfat: Aminoglikozid bir antibiyotik olan gentamisin, özellikle gram negatif organizmaların sebep olduğu birçok enfeksiyon tipinde tedavi edici olarak kullanılır. Ancak *E. coli* gram negatif bir bakteri olmasına rağmen gentamisine direnç göstermiştir. Ayrıca ototoksik ve nefrotoksik etkilerinden dolayı klinik kullanımında problemler oluşmaktadır. Çevrede (su ve toprak) çokça bulunan, gram pozitif bir bakteri olan, *Micromonospora Purpurea*'dan elde edilir. Gerçekte yapıcı birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün (gentamisin C₁, C_{1a} ve C₂) karışımından ibarettir. Kütlesine göre

kanamisin ve amikasinden güçlüdür. Aminoglikozid ilaçlar içerisinde, amikasinden sonra, spektrumu en geniş ve antibakteriyel gücü en yüksek olanıdır. Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz. Kanda yaklaşık %10 oranında alyuvarlara bağlanır.vücutta biyotransformasyona uğramadan böbreklerden itrah edilir ve idrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Gentamisin, bakteriyel ribozomun 30S alt birimine bağlanarak protein sentezini durdurur. Bütün aminoglikozidler gibi oral olarak verildiğinde sistematik olarak aktif olmaz. Bu yüzden ince bağırsaktan emilimi oldukça zordur (Kayaalp 2002).



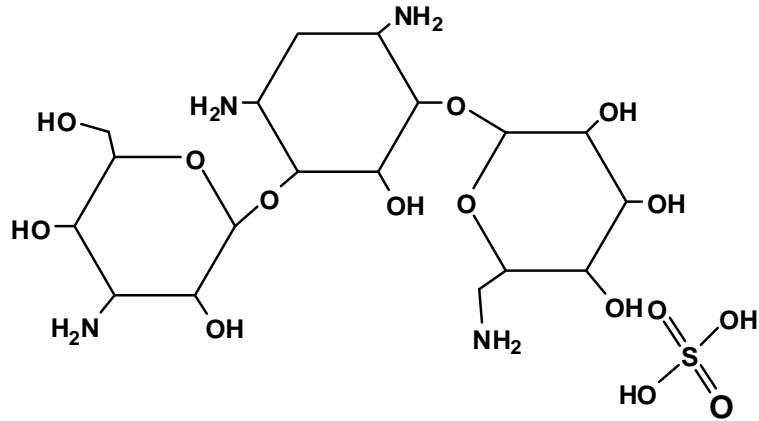
Şekil 1.3: Gentamisin molekülünün açık yapısı

Amikasin Sülfat: Aminoglikozidler arasında yarı-sentetik olarak yapılan ilk türevidir. Doğal bir ilaç olan kanamisin A'dan asilleme suretiyle elde edilir. Yapısı ile ilgili bu özelliğinden dolayı; gentamisin, kanamisin ve tobramisin gibi doğal aminoglikozidleri inaktive eden bakteriyel enzimlere dayanıklıdır ve bundan dolayı en geniş spektrumlu antibiyotiktir. Farmakolojik ve farmakokinetik özellikleri yönünden kanamisin ile amikasin arasında yakın bir benzerlik vardır. Kanamisin gibi amikasin de iç kulakta özellikle işitme fonksiyonunu bozar. Nefrotoksik ve ototoksik etki gösterir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.4: Amikasin molekülünün açık yapısı

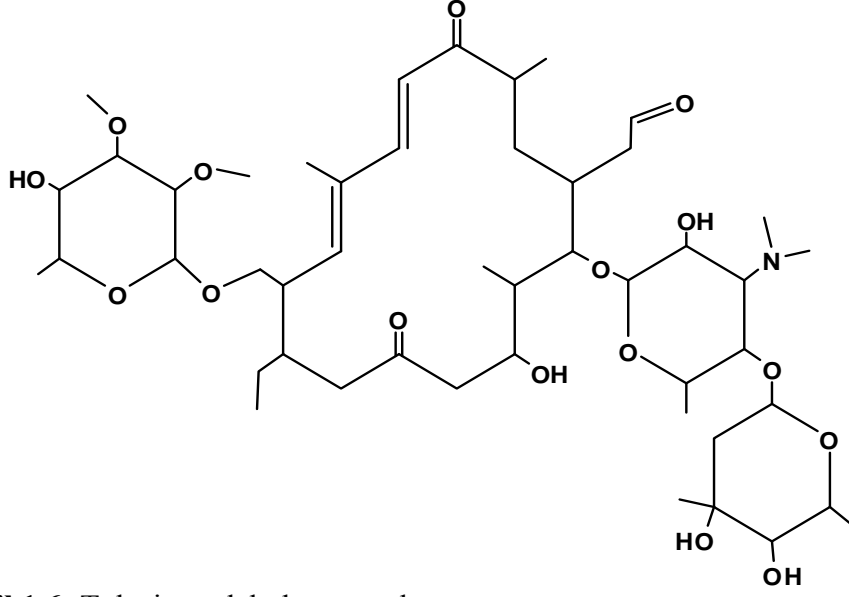
Kanamisin sülfat: Aminoglikozid bir antibiyotik olan kanamisin sülfat mevcut oral, damariçi ve intramusküler formlarında bulunur. Çok çeşitli enfeksiyon türlerinde kullanılan kanamisin, *Streptomyces kanamyceticus*'dan izole edilir. Geniş spektrumlu aminoglikozid bir antibiyotik olan amikasin gibi işitme fonksiyonunu bozabilir. Ayrıca böbreklerde toksisiteye ve alerjik etkilere de sebep olabilir (Kayaalp 2002).



Şekil 1.5: Kanamisin sülfat molekülünün açık yapısı

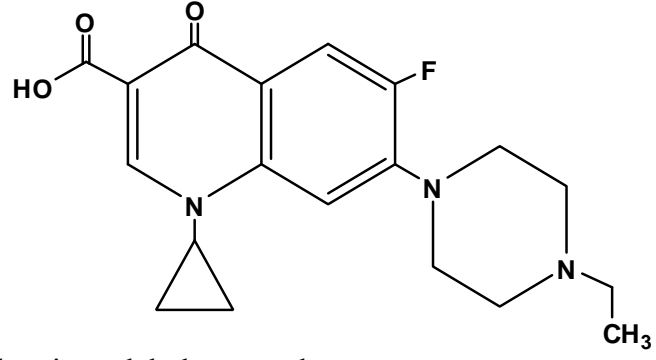
Tylosin: Makrolid sınıfı bir antibiyotik olan tylosin, gram pozitif organizmalara karşı geniş bir antibiyotik etkiye sahip olsa da gram negatif organizmalara karşı sınırlı bir etkinliğe sahiptir. *Streptomyces fradiae*'nin doğal fermantasyon ürünü olarak elde edilir (marvistavet.com). Tylosin, veterinerlikte, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde çok

yaygın olarak kullanılır ve oldukça güvenilir bir marja sahiptir. Koyun, keçi, sığır ve domuzlarda potansiyel bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi, solunum yolu enfeksiyonları ve yumuşak doku enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılır.



Şekil 1.6: Tylosin molekülünün açık yapısı

Enrofloksasin: Florokinolon bir antibiyotik olan enrofloksasin, bakterisit bir ajandır. Enrofloksasin'in bakterisit aktivitesi, konsantrasyonuna bağlı olarak, bakteri hücrelerini 20-30 dakika içerisinde öldürür. Enrofloksasin hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler için antibiyotik etki gösteren önemli bir bileşiktir. Mekanizması ve hareket şekli tam olarak bilinmese de bakteri DNA sarmalının oluşumunun önüne geçerek DNA sentezini durdurduğuna inanılıyor. *E.coli*, *Enterobacter*, *Compylobacter*, *Shiqella*, *Salmonella*, *Brucella* vb. gibi bakteri türlerine karşı oldukça etkilidir. *Streptococcus* türüne karşı değişken etki gösterebilir. Anaerobik bakterilere karşı etkili değildir (Plumb DC. *Enrofloxacin*. Veterinary Drug Handbook, Fifth edition).



Şekil 1.7: Enrofloksasin molekülünün açık yapısı

2.KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden ayrı olarak keşfedilmiştir. Meldrum and Roughton *et al.*(1933) insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında ancak gerçekleştirebilmiştir. Keilin and Martin (1944) ise CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede çok özel bir rolü olduğunu bulmuşlardır. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir. Daha sonra CA enzimi, suda yaşayan canlılarda da olmak üzere birçok bitki, mantar, böcek, sığır ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı topluluğunda tespit edilmiştir (Burt *et al.* 1992; Bottcher *et al.* 1994; Krungkrai *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2005, Yu *et al.* 2006). Enzim göz, ciğer ve merkezi sinir sistemi gibi çoğu dokuda dağılmıştır (Beydemir and Gülçin 2004).

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet CA izoenzimi belirlenmiş ve bu izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmış ve hala bu konuda çalışmalar sürdürülmektedir (Lönnerholm *et al.* 1985; Okuyama *et al.* 1995; Parkkila and Parkkila 1996; Christie *et al.* 1997; Raisanen *et al.*1999).

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan metod afinite kromatografisidir. Karbonik anhidraz enzimi ilk kez 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından bir afinite jeli kullanılarak saflaştırılmış, daha sonra 1975 yılında Whitney'in, 1976'da Chanpagnol'un, 1980 yılında Wistrand ve arkadaşlarının ve 1996'da Arslan ve arkadaşlarının, 2004'te Özensoy ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda farklı afinite jelleri sentezlenmiştir.

Çizelge 2.1. Karbonik anhidrazın saflaştırılmasında kullanılan bazı önemli afinite jelleri

Matriks	Ligand	Uzantı Kolu	CA Kapasitesi	Uygulandığı Canlı ve Dokular
Sephadex G-150 Sepharose 2B, 4B, 6B	p-Aminobenzen sülfonamide	Yok	3-4 mg/ml jel	İnsan eritrositleri, Bakteri
Sepharose-4B	p-Aminobenzen sülfonamide	Yok	5 mg/ml jel	İnsan eritrosit izoenzimleri
Sepharose-6B	p-Aminobenzen sülfonamide	$\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{O}-(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CHO}$	Belirtilmemiş	İnsan böbreği, sığır göz lensi
CM-Sephadex G-150	p-Aminobenzen sülfonamide	$\text{NH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NHCOCH}_2-$	17-23 mg/ml jel	İnsan, kedi ve maymun eritrositleri
Sepharose-4B	2-Amino- 1,3,4-tiyadizol-5 sülfonamid	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Belirtilmemiş	Bitki fotosentetik hücreleri
CM-Bio-jel A	p-Aminobenzen sülfonamide	$-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2-$	15-20 mg/ml jel	İnsan eritrositleri
CM-Sephadex	p-Aminobenzen sülfonamide	L-Tirozin	503 mg/ml jel	İnsan ve sığır eritrositleri
Sepharose-4B	p-Aminobenzen sülfonamide	L-Tirozin	301-317 mg/g jel	İnsan ve sığır eritrositleri

Karbonik anhidraz enzimleri pek çok dokudan saflaştırılmış ve molekül kütleleri belirlenmiştir. Burt ve arkadaşlarının 1992’de yaptıkları bir çalışmada literatürde yüz sineği olarak ifade edilen *Musca autumnalis* larvalarından CA saflaştırılmış SDS-PAGE yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiş ve molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir. Daha sonra enzimin doğal molekül kütlelerini belirlemek amacıyla jel filtrasyon kromatografisi yapılmış ve 31.000 Da olarak tespit edilmiştir. Böylece enzimin aktif formunun monomerik yapıda olduğu gösterilmiştir. Krungkrai ve arkadaşlarının (2001), yaptıkları bir araştırmada, *Plasmodium falciparum*’dan saflaştırılan CA’nın molekül kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının bir çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül *et al.* 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002; Gülçin *et al.* 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan Sepharose-4B, p-nitrofenilasetat, standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin (TEMED), diyaliz torbası ve L-tirozin Sigma Chemical Comp.'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfirik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, metanol, aseton, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Sephadex G-200, coomassie brilliant blue G-250, R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk AG'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj: MSE Mistral 2000

Spektrofotometre: CHEBİOS s.r.l. (Optimum-one/UV-VIS)

pH metre: Schott pH-Meter CG840

Elektroforez tankı: BIO RAD (dikey)

Peristaltik pompa: İsmatec

Karıştırıcı(Vortex): Fisons whırlı-mixer

Karıştırıcı (Shaker): GFL 3025

Hassas terazi: Gecavery (UK)

Afinite kolonu: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)

Kronometre: Hanhard, Electronische Digital-stopphur Germany

Magnetik karıştırıcı: Chiltan Hotplate Magmetic Stirrer HSBI

Saf su cihazı: Barnstead Easy Pure UV/UF

Su banyosu: Clifton

Kar makinesi: Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)

Buzdolapları: Arçelik

Derin dondurucu (-20°C'ye kadar): Sanyo Medical Freezer

Derin dondurucu (-85°C'ye kadar): Sanyo Ultra Low

Güç kaynağı: 1-Bio Rad Power Pac 3000

Otomatik pipetler:Eppendorf

Çalkalayıcı: GFL

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1. 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃, 950 ml destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/0,1M Na₂SO₄, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

4. 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH=6,3 (kolona tutunmuş CA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, 200 ml saf suda çözüldü. pH 6,3'e titre edildikten sonra destile su ile toplam hacim 250 ml'ye tamamlandı.
5. 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄, pH=5,6 (kolona tutunmuş CA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH₃COO.3H₂O ve 9,187 g NaClO₄ 120 ml destile su ile çözülerek, 1 N HCl ile pH = 5,6'ya getirildikten sonra destile su ile hacim 150 ml'ye tamamlandı.
6. %0,9'luk NaCl (Homojenatın yıkanması için kullanılan çözelti): 4,5 g NaCl alınıp hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. 0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
8. %0,02'lik NaN₃ çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN₃ alınarak hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.
9. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) 1 ml %10'luk SDS ve 1 ml %100'lük gliserin, 1 ml %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptotanol ilave edildi.
10. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 ml %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

- 11.** Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 12.** Yıkama çözeltisi (elektroforez jelinin yıkanması için kullanılan çözelti): %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 13.** Sabitleştirme çözeltisi (elektroforez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 14.** Coomassie brilliant blue G-250, reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- 15.** 0,025 M veronal tamponu: 0,025 mol sodyum barbitalin 900 ml suda çözülüp pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.
- 16.** CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C' de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.
- 17.** %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde indikatör olarak kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacminin saf suyla 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- 18.** 1 M Tris-HCl pH=8,8: 12,1 g Tris 90 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

19. 1 M Tris-HCl pH=6,8: 2,42 g Tris 5 ml suda çözülüp 1 M HCl ile istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile 20 ml'ye tamamlandı.

20. %30'luk Akrilamid-%0,8 bisakrilamid çözeltisi: 6 g akrilamid, 0,16 g bisakrilamid alınıp 13,84 ml suda çözüldü.

21. %10'luk SDS çözeltisi: 0,5 g SDS alınıp 4,5 ml suda çözüldü.

22. Standart serum albumin çözeltisi (1 mg/ml; protein tayini için kullanılan çözelti): 25 mg standart serum albuminin 25 ml saf suda çözülmesiyle hazırlandı.

Kullanılan ilaçların stok çözeltileri:

Enrofloksasin: 200 mg enrofloksasin'in 2 ml saf suda çözülmesiyle elde edildi (0,278 M)

Gentamisin sülfat: 80 mg gentamisin sülfat'ın 2 ml saf suda çözülmesiyle elde edildi (0,084 M)

Amikasin sülfat: 500 mg amikasin sülfat'ın 2 ml saf suda çözülmesiyle elde edildi (0,320 M)

Kanamisin sülfat: 500 mg kanamisin sülfat'ın 2 ml saf suda çözülmesiyle elde edildi (0,429 M)

Tylosin: 400 mg tylosin'in 2 ml saf suda çözülmesiyle elde edildi (0,343 M)

Ampisilin sodyum: 1 g ampisilin sodyum'un 3 ml saf suda çözülmesiyle elde edildi (0,879 M)

3.2. Yöntem

3.2.1. Koyun midyesinden saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları ile ilgili yöntemler

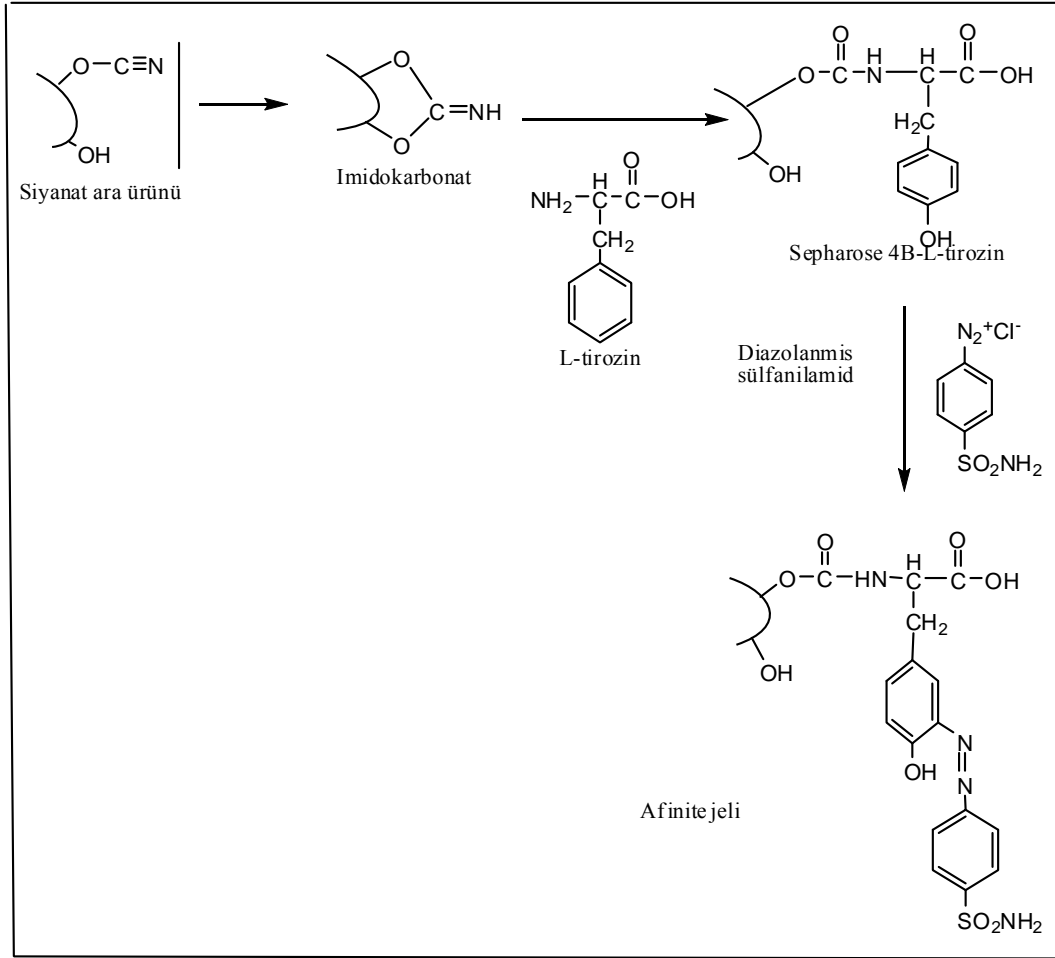
3.2.1.a. Sepharose-4B afinite kolonunun hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-Tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Arslan *et al.* 1996). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:

a) CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırma, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandı ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı ve böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 ml 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH =8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.

b) Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile

pH=9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı. Daha sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Arslan *et al.* 1996). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. CNBr Sepharose 4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların açık formülleri

3.2.1.b. Koyun midesinin temini ve homojenat hazırlanması

Deneylerde kullanılan koyun mideleri piyasadan taze olarak temin edildi. Alınan koyun mideleri buz içerisinde muhafaza edilerek laboratuara getirildi. 20 g'lık parçalar halinde kesilerek -80°C'de, daha sonra kullanılmak üzere, muhafaza edildi. Daha sonra doku

örneği, kan ve diğer kirlilikleri elimine etmek için %0,9'luk NaCl ile 3 defa yıkandı. Doku homojenatını hazırlamak için, numune bir bıçak yardımıyla çok küçük parçalar halinde kesildi. Daha sonra sıvı azot içinde parçalanarak, 3 ml/g olacak şekilde 25 mM Tris HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH= 8,7) tampon çözeltisinin içinde homojenize edildi. Bu süspansiyon 30 dakika 15 000 xg'de santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve 100 000 xg'de ultrasantrifüj yapıldı. Süpernatant analizler için kullanıldı.

3.2.1.c. Koyun midesi homojenatının afinite kolonuna tatbiki ve elüsyonu

Koyun midesinden elde edilen homojenatın pH'sı 8,7'ye ayarlandı. Homojenat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH=8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH=6,3) tamponu kolona tatbik edilerek CA-I enzimi elüsyonlar halinde alındı. Daha sonra 0,1 M NaCH₃COO.3H₂O/0,5 M NaClO₄ (pH=5,6) çözeltisi kolona tatbik edilip CA-II enzimi elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat'e ayarlandı. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 1,5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı.

3.2.1.d. Diyaliz

Afinite kolonundan elde edilen ve 280 nm'de yüksek absorban gösteren tüpler ayrı ayrı birleştirilerek diyaliz torbalarına yerleştirildi ve iki saat süreyle diyaliz tamponuna (1mM β-merkaptolanol içeren, 0,05 M Tris-SO₄ pH=7,4) karşı diyaliz edildi. Diyaliz işlemi, soğuk ortamda gerçekleştirildi.

3.2.1.e. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzim saflığının kontrolü

Koyun midesi dokusundan Sepharose 4B afinite kolonu ile CA enzimlerinin saflaştırılmasından sonra %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından belirtildiği gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflığı kontrol edildi. Bunun için elektroforez plakaları su ve alkolle iyice yıkandı. İki cam plaka birbiri üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kıskaçlarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Ortamda hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşıncaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstündeki %0,1'lik SDS alındı. Daha sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak yaklaşık yarım saat bekletildi. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi.

Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutulularak, jel kuyularına çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (Anot), üstten (-) kablo (Katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. Yaklaşık 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine

alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözeltilerde çalkalandı. Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi ; %0,1 Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf su ile hazırlandı. Yıkama çözeltisi ise; %50 metanol, %10 asetik asit, %40 saf sudan ibarettir. Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 ml %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %1'lik SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'luk amonyum persülfat (NH₄)₂SO₈ (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı. Yığıma jeli hazırlanması sırasında 1M'lik Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1ml, %1'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ilave edildi. Jel hazırlandıktan sonra standart proteinler ve gökkuşuğu alabalığı dokularından saflaştırılan enzim jele tatbik edildi. Deney sonunda jelin fotoğrafı çekildi.

3.2.1.f. Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesi tayini

Laemmli (1970), metoduna göre molekül kütlesi tayini şu şekilde yapıldı; standart protein olarak tavşan fosforilazı B 97 kDa, sığır serum albumini 66 kDa, ovalbumini 45 kDa, sığır eritrosit karbonik anhidrazı 29 kDa kullanıldı. Her bir doku için gerçekleştirilen elektroforez işlemlerinden sonra standart proteinlerin R_f değerleri hesaplanarak log MK-R_f standart grafikleri çizildi. Daha sonra mide dokusundan elde edilen CA enzimlerinin ayrı ayrı R_f değerleri hesaplandı ve standart grafikte yerine konularak CA-I ve CA-II izoenzimlerinin log MK'sı belirlendi. Bu değerlerin antilogaritması alınarak numunelerin molekül kütleleri tespit edildi. Proteinlerin R_f değerleri;

$$R_f = \frac{X_{\text{protein}}}{X_{\text{boya}}}$$

formülü kullanılarak belirlendi.

X_{protein} = Proteinin yürüme mesafesi, X_{boya} = Boyanın yürüme mesafesi

3.3. Karbonik anhidraz enziminin aktivite tayini

CA enziminin aktivitesi iki şekilde ölçülebilmektedir; birincisi, CA'nın fizyolojik aktivitesi olan CO₂-hidrataz aktivitesidir, ikincisi ise *in vitro* şartlarda gerçekleştirdiği spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesidir.

3.3.1 CO₂-hidrataz aktivitesi

Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). CO₂'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı:

Çizelge 3.1. Hidrataz aktivitesinde kullanılan maddelerin katılma sırası ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü (µl)
0,025 M veronal tamponu (pH=8,2)	1000	1000
%0,04'lük brom timol Mavisi	100	100
Saf su	600	550
Enzim Çözeltisi	-	50
CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti	2500	2500
Toplam Hacim	4200	4200

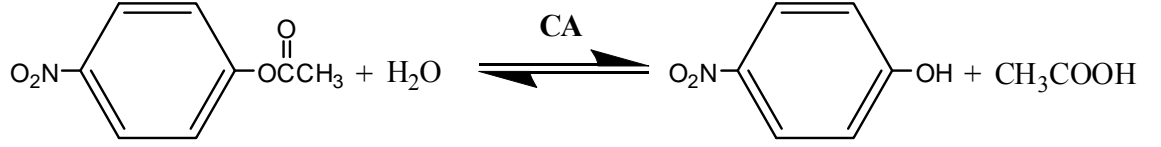
Daha sonra bir kronometre yardımıyla CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH =6,3) için geçen süre (t₀) belirlendi. İndikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH=6,3) için geçen süre (t_c) bir kronometre vasıtasıyla belirlendi. Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO₂ hidrasyonu süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın t_c'ye bölünmesi ile belirlendi ve

$$EU = \frac{t_0 - t_c}{t_c}$$

formülüne göre hesaplandı (Maren 1960). Alabalık doku homojenatları ve saf enzimin aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı ve saflaştırma tablolarında sunulan aktivite değerleri bu metoda göre hesaplandı.

3.3.2 Esteraz aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat’a hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir:



348 nm’de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967; Armstrong *et al.* 1966). Bu dalga boyunda p-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. 1 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre şu prosedür uygulandı:

Çizelge 3.2. Esteraz aktivitesinde kullanılan maddelerin katılma sırası ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (µl)	Numune Tüpü (µl)
1 M Tris-SO ₄ tamponu (pH=7,4)	500	500
p-Nitrofenilasetat	333	333
Saf su	167	117
Enzim çözeltisi	-	50
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan ve başlangıçtaki değer okunduktan sonraki her dakikada bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Kör olarak saf su kullanıldı. Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg p-nitrofenilasetat, 1 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml saf suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte and Mehta 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.4. Protein Tayini

3.4.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1975). Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemlerinden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün tüplerde kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbansları 280 nm'de köre karşı okundu. Sephadex G-200 ile yapılan jel filtrasyon kromatografisinde de proteinlerin kalitatif tayini aynı metodla belirlendi.

3.4.2. Bradford yöntemi ile kantitatif protein tayini

Koyun midesi numunesinden hazırlanan homojenat Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilerindeki kantitatif protein miktarı bu yöntemle belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır.

Boyanın kırmızı ($\lambda_{\max}=465$ nm) ve mavi ($\lambda_{\max}=595$ nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere girişimi oldukça azdır ve hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cerayan eder, iki dakikada tamamlanır. renk stabilitesi iki saat'in üzerinde devam edebilir (Bradford 1976). Bu yöntem ile protein tayini yapabilmek için standart bir grafiğe ihtiyaç vardır. bu amaçla 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 μl konuldu. Saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika inkübe edildikten sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbens değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml enzim numunesinin içinde bulunduğu tampondan ve 5 ml Coomassie brilliant blue G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbens değerlerine karşılık gelen μg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Tüplere koyun midesinden elde edilen homojenattan ve adı geçen saflaştırma basamaklarından elde edilen enzim numunelerinden 0,1 er ml konularak üzerine 5'er ml Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra 595 nm'de absorbens değerleri okundu. Her bir numuneden üçer adet deneme yapılarak bu üç değer aritmetik ortalamasından gerçek değer tespit edildi. Elde edilen bu değerlere göre standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlendi. Bu metodla saflaştırılan enzim çözeltilerinde ve homojenatta protein tayini yapıldı.

3.5. Koyun Midesi Dokusundan Saflaştırılan CA I ve CA II İzoenzimleri ile İlgili Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.5.1. Koyun midesi dokusundan saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesi ile ilgili çalışmalar

Koyun midesinden saflaştırılan CA enzimlerinin aktivitelerinin optimum olduğu sıcaklıkların, değerlerinin belirlenmesi amacıyla dijital su banyosu kullanılarak 20°C ile

80°C arasında 10'ar °C sıcaklık farkı oluşturularak, spektrofotometrik olarak esteraz aktivitesi ölçülerek Sıcaklık-Aktivite (EU/ml) grafiği çizildi.

3.5.2. p-Nitrofenilasetat substratı için K_M ve V_{max} 'ın bulunmasına yönelik çalışmalar

p-Nitrofenilasetat substratı için koyun midesinden saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı ve Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Lehninger 2005).

3.5.3. Koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaç etkilerinin belirlenmesi

Koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla küvet ortamına değişik konsantrasyonlarda ilaç ilave edilerek aktivite değerleri okundu. Kullanılan ilacın farklı konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözeltiler seyreltildi. Kullanılan stok çözelti hacmi gereken derişimi sağlamadığı zaman küvete katılan tampon hacmi azaltılarak ilaç konsantrasyonu artırıldı. Bu şekilde gereken konsantrasyon ayarlanmış oldu.

3.5.4. İnhibitör etkisi gösteren ilaçlar için IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar

İnhibitör çalışmalarıyla ilgili farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapılarak inhibitör etkisi gösteren ilaçlar belirlendi. Bu ilaçlardan inhibisyon etkisi yüksek olanların %Aktivite-[I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı.

IC₅₀ değerleri hesaplanan bazı ilaçların K_i değerlerini belirlemek amacıyla koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerinin aktivitelelerini yarıya dūřüren ilaç konsantrasyonu ile bu değerin altında ve ւstünde iki sabit ilaç konsantrasyonlarında uygun beř substrat konsantrasyonu ile aktivite olimleri yapıldı. Çalışmalarda uygun beř farklı substrat konsantrasyonu stok çözelti kullanılarak ön deneme ile belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarı yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon için $V_{max} = V_{max}^I (1 + [I]/K_i)$ formülünden yararlanılarak K_i değerleri belirlendi.

Çizelge 3.3. Koyun midesi CA I izoenzimi ւzerinde enrofloksasin'in IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan özeltilelerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris- Sulfat (pH=7,4)	p-Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	215	50	2	0,69	1
400	333	214	50	3	0,83	1
400	333	213	50	4	1,11	1
400	333	212	50	5	1,39	1
400	333	192	50	25	6,95	1

Çizelge 3.4. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris- Sülfat (pH=7,4)	p- Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	192	50	25	6,950	1
400	333	167	50	50	13,90	1
400	333	142	50	75	20,85	1
400	333	117	50	100	27,80	1
400	333	67	50	150	41,70	1

Çizelge 3.5. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (μ l)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	575	50	2500	25	1,65	4,2
1000	100	565	50	2500	35	2,32	4,2
1000	100	550	50	2500	50	3,30	4,2
1000	100	525	50	2500	75	4,96	4,2
1000	100	500	50	2500	100	6,60	4,2

Çizelge 3.6. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisı (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	575	50	2500	25	1,65	4,2
1000	100	565	50	2500	35	2,32	4,2
1000	100	550	50	2500	50	3,30	4,2
1000	100	500	50	2500	100	6,60	4,2
1000	100	450	50	2500	150	9,90	4,2

Çizelge 3.7. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4	p-Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	0,1	1
400	333	207	50	10	0,2	1
400	333	192	50	25	0,5	1
400	333	167	50	50	1,0	1
400	333	117	50	100	2,0	1

Çizelge 3.8. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris- Sülfat pH=7,4	p- Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	0,1	1
400	333	207	50	10	0,2	1
400	333	192	50	25	0,5	1
400	333	167	50	50	1,0	1
400	333	117	50	100	2,0	1

Çizelge 3.9. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (μ l)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	595	50	2500	5	0,1	4,2
1000	100	590	50	2500	10	0,2	4,2
1000	100	575	50	2500	25	0,5	4,2
1000	100	550	50	2500	50	1,0	4,2
1000	100	500	50	2500	100	2,0	4,2

Çizelge 3.10. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde gentamisin sülfat'ın IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	595	50	2500	5	0,1	4,2
1000	100	590	50	2500	10	0,2	4,2
1000	100	575	50	2500	25	0,5	4,2
1000	100	550	50	2500	50	1,0	4,2
1000	100	500	50	2500	100	2,0	4,2

Çizelge 3.11. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4	p-Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	1,046	1
400	333	207	50	10	2,092	1
400	333	192	50	25	5,230	1
400	333	167	50	50	10,46	1
400	333	117	50	100	20,92	1

Çizelge 3.12. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris- Sülfat pH=7,4	p- Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	1,046	1
400	333	207	50	10	2,092	1
400	333	192	50	25	5,230	1
400	333	167	50	50	10,46	1
400	333	117	50	100	20,92	1

Çizelge 3.13. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (μ l)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (μ l)	İnhibitör Hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	595	50	2500	5	1,046	4,2
1000	100	593	50	2500	7	1,465	4,2
1000	100	590	50	2500	10	2,090	4,2
1000	100	585	50	2500	15	3,139	4,2
1000	100	575	50	2500	25	5,230	4,2

Çizelge 3.14. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde ampisilin sodyum'un IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	595	50	2500	5	1,046	4,2
1000	100	593	50	2500	7	1,465	4,2
1000	100	590	50	2500	10	2,090	4,2
1000	100	585	50	2500	15	3,139	4,2
1000	100	580	50	2500	20	4,180	4,2

Çizelge 3.15. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4) (µl)	p-Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	192	50	25	0,008	1
400	333	167	50	50	0,016	1
400	333	142	50	75	0,024	1
400	333	117	50	100	0,032	1
400	333	67	50	150	0,048	1

Çizelge 3.16. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	p- Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	167	50	50	0,016	1
400	333	142	50	75	0,024	1
400	333	117	50	100	0,032	1
400	333	67	50	150	0,048	1
400	333	17	50	200	0,064	1

Çizelge 3.17. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	595	50	2500	5	0,38	4,2
1000	100	592	50	2500	8	0,60	4,2
1000	100	590	50	2500	10	0,76	4,2
1000	100	580	50	2500	20	1,52	4,2
1000	100	575	50	2500	25	1,90	4,2

Çizelge 3.18. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	590	50	2500	10	0,76	4,2
1000	100	585	50	2500	15	1,14	4,2
1000	100	580	50	2500	20	1,52	4,2
1000	100	575	50	2500	25	1,90	4,2
1000	100	550	50	2500	50	3,80	4,2

Çizelge 3.19. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	p-Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	0,0215	1
400	333	209	50	8	0,0320	1
400	333	207	50	10	0,0429	1
400	333	202	50	15	0,0645	1
400	333	192	50	25	0,1070	1

Çizelge 3.20. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	p- Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	0,0215	1
400	333	207	50	10	0,0429	1
400	333	187	50	30	0,1290	1
400	333	182	50	35	0,1500	1
400	333	177	50	40	0,1700	1

Çizelge 3.21. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde tylosin'in IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	575	50	2500	25	0,0204	4,2
1000	100	550	50	2500	50	0,0408	4,2
1000	100	540	50	2500	60	0,0490	4,2
1000	100	525	50	2500	75	0,0612	4,2
1000	100	500	50	2500	100	0,0816	4,2

Çizelge 3.22. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde tylosin'in IC₅₀ değerinin hidrataz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

0,025 M Veronal Tamponu (pH=8,2) (µl)	%0,04'lük Brom Timol Mavisi (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	CO ₂ gazı ile doyurulmuş Çözelti (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
1000	100	600	50	2500	0	0	4,2
1000	100	575	50	2500	25	0,0204	4,2
1000	100	550	50	2500	50	0,0408	4,2
1000	100	540	50	2500	60	0,0490	4,2
1000	100	525	50	2500	75	0,0612	4,2
1000	100	500	50	2500	100	0,0816	4,2

Çizelge 3.23. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde tylosin'in IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	p-Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	212	50	5	0,017	1
400	333	207	50	10	0,034	1
400	333	192	50	25	0,085	1
400	333	167	50	50	0,170	1
400	333	117	50	100	0,340	1

Çizelge 3.24. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde tylosin'in IC₅₀ değerinin esteraz aktivitesiyle belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat (pH=7,4)	p- Nitrofenilasetat (µl)	Saf su (µl)	Enzim (µl)	İnhibitör Hacmi (µl)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	333	217	50	0	0	1
400	333	192	50	25	0,085	1
400	333	167	50	50	0,170	1
400	333	142	50	75	0,257	1
400	333	117	50	100	0,340	1
400	333	67	50	150	0,514	1

Çizelge 3.25. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4(μ l)	p-Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki p- Nitrofenilasetat konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	50	500	50	0	0	1,30	1
400	100	450	50	0	0	1,67	1
400	150	400	50	0	0	2,20	1
400	200	350	50	0	0	3,30	1
400	250	300	50	0	0	6,67	1
400	50	495	50	5	0,0215	1,30	1
400	100	445	50	5	0,0215	1,67	1
400	150	395	50	5	0,0215	2,20	1
400	200	345	50	5	0,0215	3,30	1
400	250	295	50	5	0,0215	6,67	1
400	50	470	50	30	0,1290	1,30	1
400	100	420	50	30	0,1290	1,67	1
400	150	370	50	30	0,1290	2,20	1
400	200	320	50	30	0,1290	3,30	1
400	250	270	50	30	0,1290	6,67	1
400	50	460	50	40	0,1700	1,30	1
400	100	410	50	40	0,1700	1,67	1
400	150	360	50	40	0,1700	2,20	1
400	200	310	50	40	0,1700	3,30	1
400	250	260	50	40	0,1700	6,67	1

Çizelge 3.26. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde kanamisin sülfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4(μ l)	p-Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki p- Nitrofenilasetat konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	50	500	50	0	0	1,30	1
400	100	450	50	-0	0	1,67	1
400	150	400	50	-0	0	2,20	1
400	200	350	50	-0	0	3,30	1
400	250	300	50	-0	0	6,67	1
400	50	495	50	5	0,0215	1,30	1
400	100	445	50	5	0,0215	1,67	1
400	150	395	50	5	0,0215	2,20	1
400	200	345	50	5	0,0215	3,30	1
400	250	295	50	5	0,0215	6,67	1
400	50	490	50	10	0,0429	1,30	1
400	100	440	50	10	0,0429	1,67	1
400	150	390	50	10	0,0429	2,20	1
400	200	340	50	10	0,0429	3,30	1
400	250	290	50	10	0,0429	6,67	1
400	50	475	50	25	0,107	1,30	1
400	100	425	50	25	0,107	1,67	1
400	150	375	50	25	0,107	2,20	1
400	200	325	50	25	0,107	3,30	1
400	250	275	50	25	0,107	6,67	1

Çizelge 3.27. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4(μ l)	p-Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki p- Nitrofenilasetat konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	50	500	50	0	0	1,30	1
400	100	450	50	0	0	1,67	1
400	150	400	50	0	0	2,20	1
400	200	350	50	0	0	3,30	1
400	250	300	50	0	0	6,67	1
400	50	475	50	25	0,008	1,30	1
400	100	425	50	25	0,008	1,67	1
400	150	375	50	25	0,008	2,20	1
400	200	325	50	25	0,008	3,30	1
400	250	275	50	25	0,008	6,67	1
400	50	425	50	75	0,024	1,30	1
400	100	375	50	75	0,024	1,67	1
400	150	325	50	75	0,024	2,20	1
400	200	275	50	75	0,024	3,30	1
400	250	225	50	75	0,024	6,67	1
400	50	415	50	85	0,0272	1,30	1
400	100	365	50	85	0,0272	1,67	1
400	150	315	50	85	0,0272	2,20	1
400	200	265	50	85	0,0272	3,30	1
400	250	215	50	85	0,0272	6,67	1

Çizelge 3.28. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde amikasin sülfat'ın K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4(μ l)	p-Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki p- Nitrofenilasetat konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	50	500	50	0	0	1,30	1
400	100	450	50	0	0	1,67	1
400	150	400	50	0	0	2,20	1
400	200	350	50	0	0	3,30	1
400	250	300	50	0	0	6,67	1
400	50	450	50	50	0,016	1,30	1
400	100	400	50	50	0,016	1,67	1
400	150	350	50	50	0,016	2,20	1
400	200	300	50	50	0,016	3,30	1
400	250	250	50	50	0,016	6,67	1
400	50	400	50	100	0,032	1,30	1
400	100	350	50	100	0,032	1,67	1
400	150	300	50	100	0,032	2,20	1
400	200	250	50	100	0,032	3,30	1
400	250	200	50	100	0,032	6,67	1
400	50	300	50	200	0,064	1,30	1
400	100	250	50	200	0,064	1,67	1
400	150	200	50	200	0,064	2,20	1
400	200	150	50	200	0,064	3,30	1
400	250	100	50	200	0,064	6,67	1

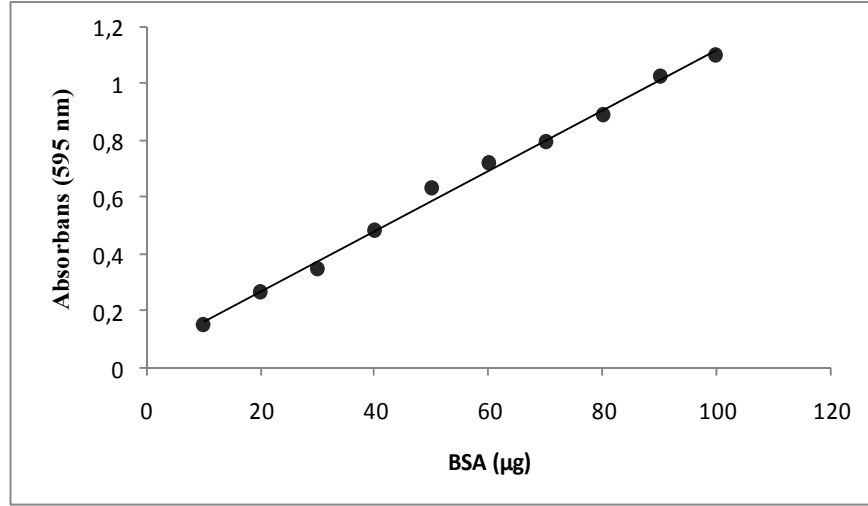
Çizelge 3.29. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde enrofloksasin'in K_i değerlerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tampon 1M Tris-Sülfat pH=7,4(μ l)	p-Nitrofenilasetat (μ l)	Saf su (μ l)	Enzim (μ l)	İnhibitör hacmi (μ l)	Küvetteki inhibitör konsantrasyonu (mM)	Küvetteki p- Nitrofenilasetat konsantrasyonu (mM)	Toplam hacim (ml)
400	50	500	50	0	0	1,30	1
400	100	450	50	0	0	1,67	1
400	150	400	50	0	0	2,20	1
400	200	350	50	0	0	3,30	1
400	250	300	50	0	0	6,67	1
400	50	497,5	50	2,5	0,69	1,30	1
400	100	447,5	50	2,5	0,69	1,67	1
400	150	397,5	50	2,5	0,69	2,20	1
400	200	347,5	50	2,5	0,69	3,30	1
400	250	297,5	50	2,5	0,69	6,67	1
400	50	496	50	4	1,11	1,30	1
400	100	446	50	4	1,11	1,67	1
400	150	396	50	4	1,11	2,20	1
400	200	346	50	4	1,11	3,30	1
400	250	296	50	4	1,11	6,67	1
400	50	475	50	25	6,95	1,30	1
400	100	425	50	25	6,95	1,67	1
400	150	375	50	25	6,95	2,20	1
400	200	325	50	25	6,95	3,30	1
400	250	275	50	25	6,95	6,67	1

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

Elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini Bradford yöntemiyle belirlendi. Standart grafik hazırlandı. Homojenat ve afinite kromotografisi sonucu elde edilen enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini bu standart grafikten faydalanılarak bulundu. Standart özeltilerin μg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması Sonuçları

4.2.1. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılma kademeleri

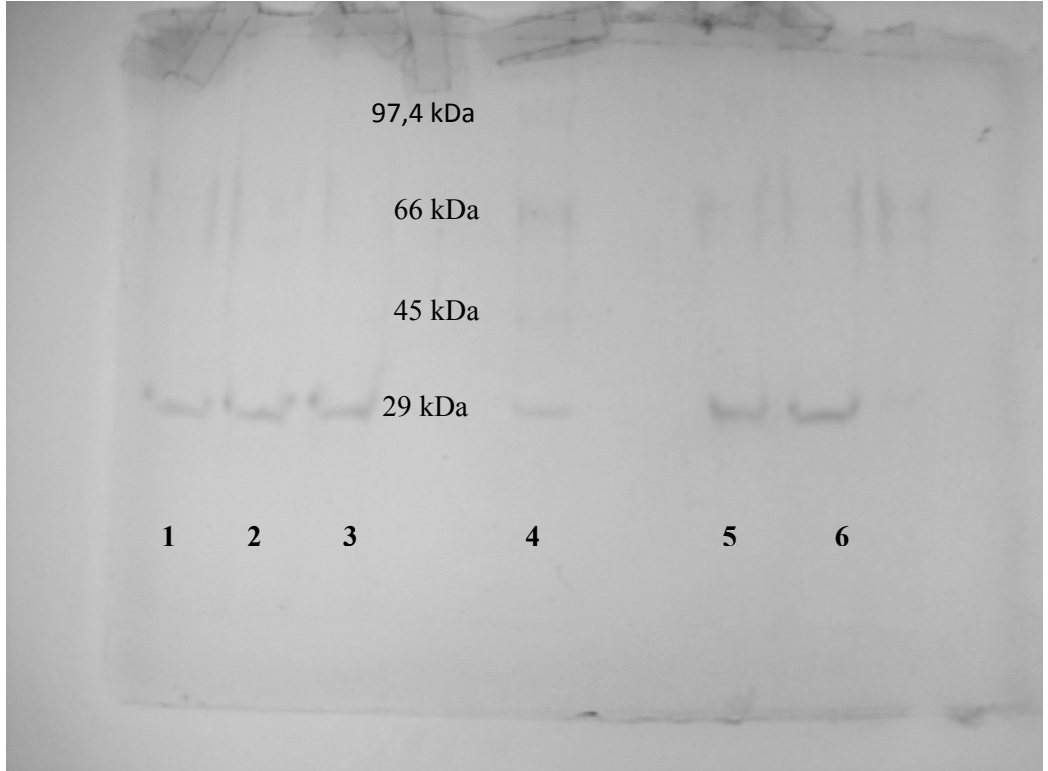
Koyun midesi dokusundan hazırlanan homojenatın pH'sı katı Tris kullanılarak 8,7'ye ayarlandıktan sonra, bölüm 3.2.1.3.'de anlatıldığı gibi daha önceden hazırlanmış olan Sepharose 4B-L-Tirozin sülfanilamid afinite (1,5 cm 2x30 cm'lik ve 20 cm jel yüksekliğine sahip) kolonuna doku numunesi tatbik edildi. Daha sonra elüsyonlar 20 ml/saat elüsyon hızında 1,5'er ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı. Kolondan alınan her bir fraksiyon için 280 nm'de Warburg metoduna göre kalitatif protein tayinleri yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesi yapıldı ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Koyun midesi CA izoenzimleri Sepharose 4B-L-Tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elde edilen, yüzde verim ve saflaştırma katsayıları sırasıyla Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması basamakları

Saflaştırma basamağı	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Toplam aktivite (EU)	Protein miktarı (mg)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
HOMOJENAT	65	40	2600	7,07	282,8	9,19	100	1
Afinité kromatografisi CA I	90	15	1350	0,0185	0,2775	4864,8	51,9	529,4
Afinité kromatografisi CA II	290	7	2030	0,0513	0,3591	5652,02	78	615,2

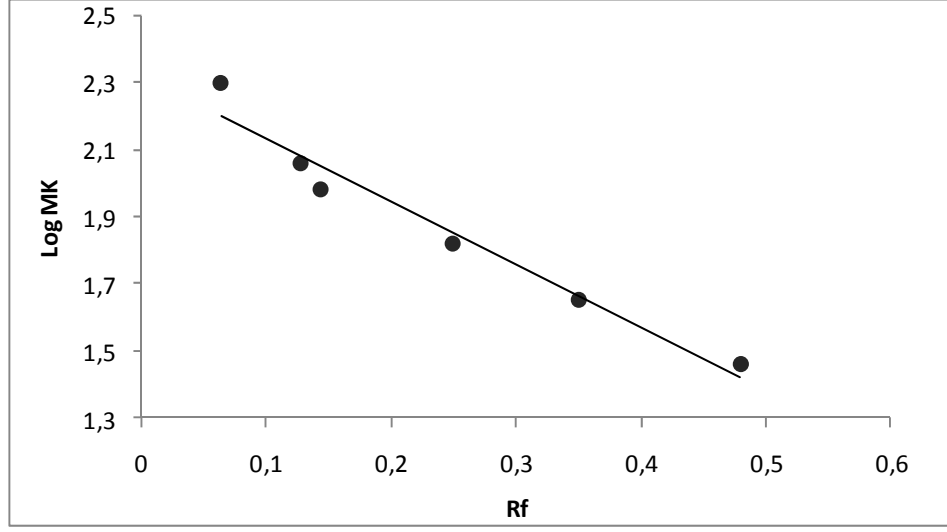
4.2.2. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin SDS-PAGE ile Saflık Kontrolü

Koyun midesinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi numunesinin, Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolonu ile elde edilen elüatların, diyaliz yapıldıktan sonra, enzimlerin saflığını kontrol etmek için kesikli SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Bu amaçla elektroforez sistemi kurularak enzim numuneleri sırayla kuyulara uygulandı ve yürütüldü. Elde edilen bantları gösteren fotoğraf Şekil 4.3'de gösterildi. Koyun midesinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin molekül kütlesi log MK-R_f grafiği çizilerek bu grafikten hesaplandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.2 Afinite kromatografisiyle saflaştırılan koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı

*4: standart proteinler: Fosforilaz (97,4 kDa), sığır serum albumini (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır eritrosit karbonik anhidrazı (29 kDa). (1),(2) ve (3) CA I, (5) ve (6) CA II enzimi.



Şekil 4.3. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle koyun midesi CA I ve CA II enzimlerinin molekül kütlesi tayininde kullanılan standart grafik (CA I için $R_f=0,4657$) (CA II $R_f=0,4657$).

Koyun midesi CA I ve II enzimleri için SDS-PAGE ile molekül kütleleri tayini sonucu CA I ve CA II'nin molekül kütleleri 26,7 kDa olarak belirlendi.

4.2.3. Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için optimum sıcaklıklarının belirlenmesine ait sonuçlar

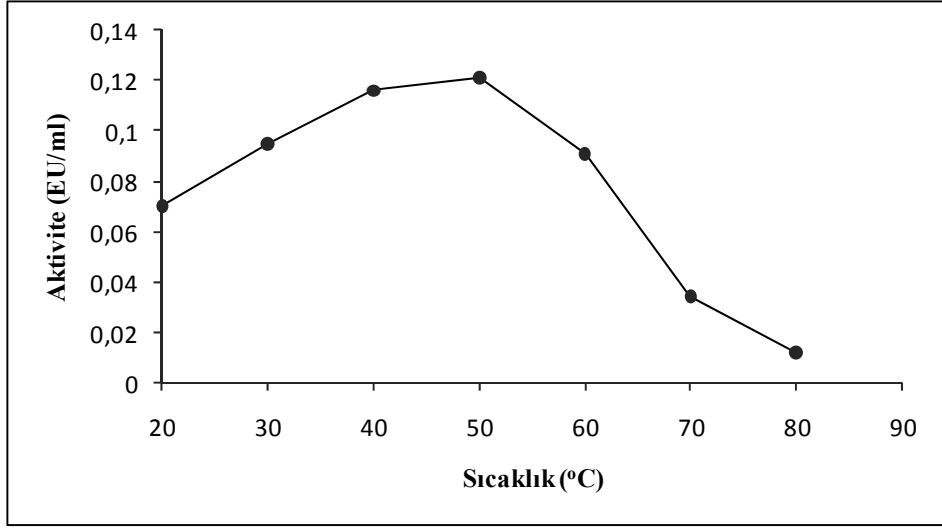
Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II enzimlerinin optimum sıcaklık çalışmaları Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde; 20 ile 80°C arasında yapıldı ve her 10°C'de enzimlerin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak belirlendi. Koyun midesi CA I ve CA II için optimum sıcaklık 50°C olarak belirlendi. Elde edilen aktivite değerleri ile Sıcaklık-Aktivite grafiği çizildi (Şekil 4.4- Şekil 4.5)

Çizelge 4.2. Koyun midesi CA I izoenzimi için değişik sıcaklıklarda yapılan aktivite değerleri

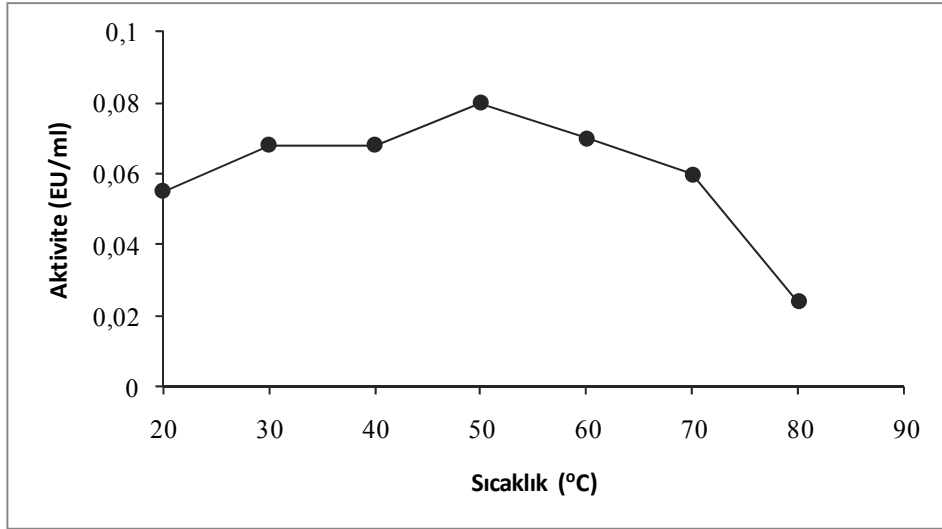
Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/ml)
20	0,0700
30	0,0950
40	0,1160
50	0,1210
60	0,0906
70	0,0340
80	0,0120

Çizelge 4.3. Koyun midesi CA II izoenzimi için değişik sıcaklıklarda yapılan aktivite değerleri

Sıcaklık (°C)	Aktivite (EU/ml)
20	0,055
30	0,068
40	0,068
50	0,080
60	0,070
70	0,060
80	0,024



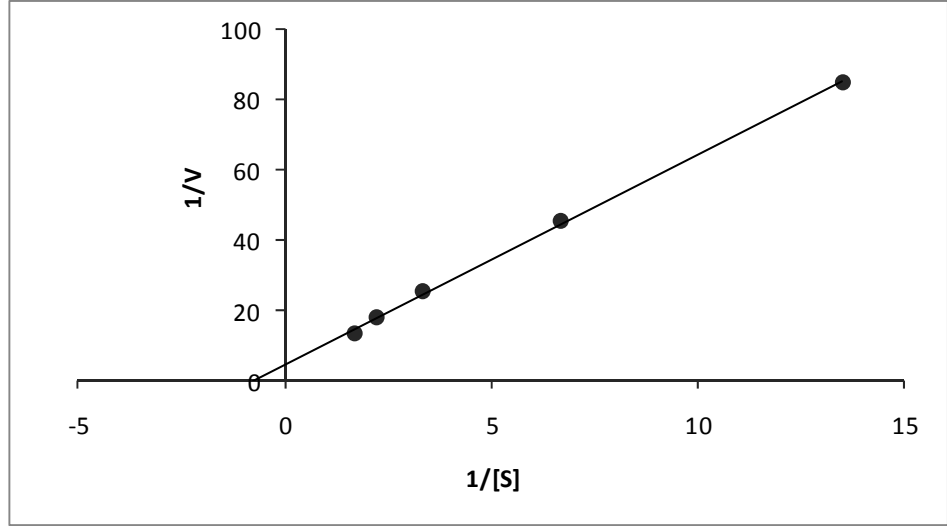
Şekil 4.4 Koyun midesi CA I enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği



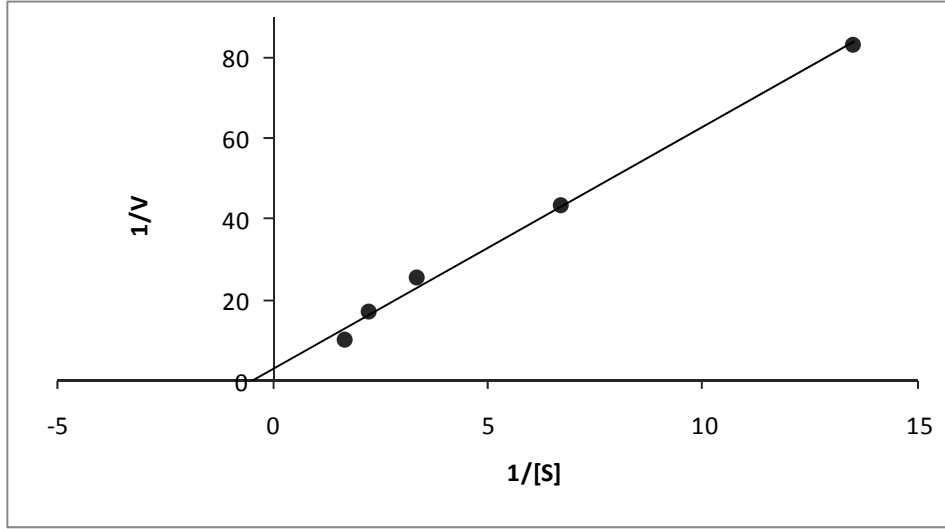
Şekil 4.5. Koyun midesi CA II enziminin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişim grafiği

4.2.4. p-Nitrofenilasetat substratı için K_M ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II enzimleri için ayrı ayrı p-nitrofenilasetat substratı ile K_M ve V_{max} çalışmaları, Bölüm 3.5.5’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Daha sonra CA I ve CA II ile ilgili p-nitrofenilasetat substratı için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri hazırlandı ve bu grafiklerden K_M ve V_{max} değerleri bulundu (Şekil 4.6-4.7). Bulunan değerler Çizelge 4.4’te verildi.



Şekil 4.6. Koyun midesi CA I enzimi için 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.7. Koyun midesi CA II enzimi için 5 farklı p-nitrofenilasetat konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.4. Koyun midesi CA enzimleri CA I ve CA II için p-nitrofenilasetat substratı ile K_M , ve V_{max} çalışmaları sonuçları

Enzim	Substrat	K_M (mM)	V_{max} (EÜ/ml)
CA I	p-nitrofenilasetat	1,32	0,22
CA II	p-nitrofenilasetat	1,968	0,329

4.3. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine Bazı İlaçların Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları

Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine bazı ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Çalışmalar sonucu elde edilen inhibisyon etkileri Çizelge 4.5-4.26'da verildi. Ayrıca konsantrasyona karşı % aktivite olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.8-4.29'da ve bu grafiklerden elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.27-4.30'da verildi.

Çizelge 4.5. Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,0204	96,99
0,0408	64,37
0,0490	42,90
0,0612	31,07
0,0816	12,57

Çizelge 4.6. Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,0204	92,80
0,0408	63,61
0,0490	36,163
0,0612	19,70
0,0816	9,250

Çizelge 4.7. Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,017	106,7
0,034	114,7
0,085	118,0
0,170	126,0
0,340	161,3

Çizelge 4.8. Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,085	96,7
0,170	98,3
0,257	95,0
0,340	96,7
0,514	98,3

Çizelge 4.9. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1,046	61,53
1,465	48,61
2,090	36,92
3,139	21,54
5,230	7,580

Çizelge 4.10. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1,046	67,53
1,465	63,20
2,090	41,76
3,139	31,40
4,180	13,56

Çizelge 4.11. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1,046	139,46
2,092	141,49
5,23	159,87
10,46	192,5
20,92	200,68

Çizelge 4.12. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1,046	103,3
2,092	121,6
5,23	173,3
10,46	225,0
20,92	275,0

Çizelge 4.13. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100
0,38	120
0,76	125
1,14	180
1,52	220
1,9	320

Çizelge 4.14. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100
0,76	180
1,14	185,7
1,52	250
1,9	270
3,8	580

Çizelge 4.15. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,008	60,8
0,016	56,0
0,024	52,0
0,032	19,2
0,048	11,2

Çizelge 4.16. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,016	89,20
0,024	64,60
0,032	47,70
0,048	43,08
0,064	29,23

Çizelge 4.17. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,0215	76,40
0,0320	65,90
0,0429	51,14
0,0645	40,90
0,107	37,50

Çizelge 4.18. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,0215	74,80
0,0320	58,40
0,0429	54,47
0,0645	30,90
0,107	26,0

Çizelge 4.19. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100
1	105
1,8	130
2	180
3,6	230
5	580

Çizelge 4.20. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1	113,3
1,8	137,89
2	194,29
3,6	280
5	580

Çizelge 4.21. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100
1	106
1,8	150
2	180
3,6	210
5	250

Çizelge 4.22. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1	107,0
1,8	129,4
2	177,6
3,6	211,76
5	247,0

Çizelge 4.23. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1,65	64,37
2,32	51,50
3,3	24,84
4,96	10,80
6,6	4,420

Çizelge 4.24. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi sonuçları

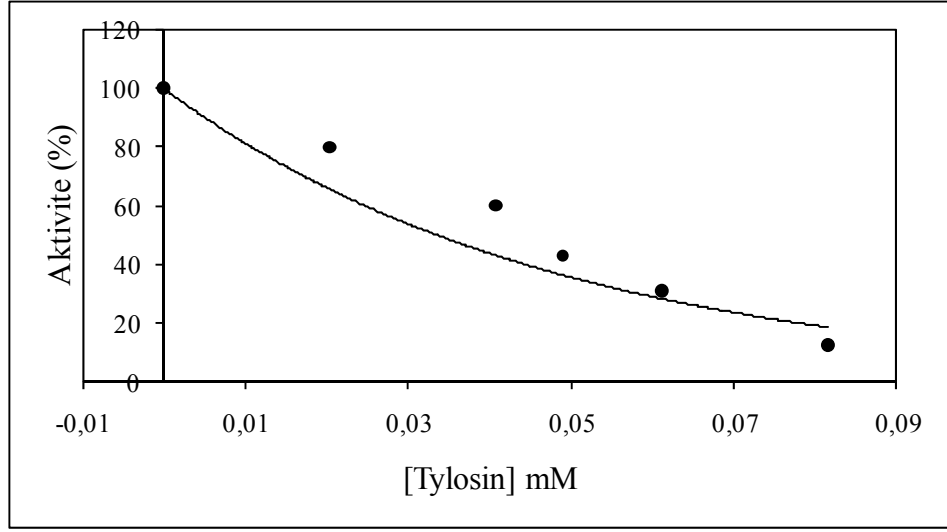
Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
1,65	61,70
2,32	57,14
3,3	24,0
6,6	18,24
9,9	6,80

Çizelge 4.25. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

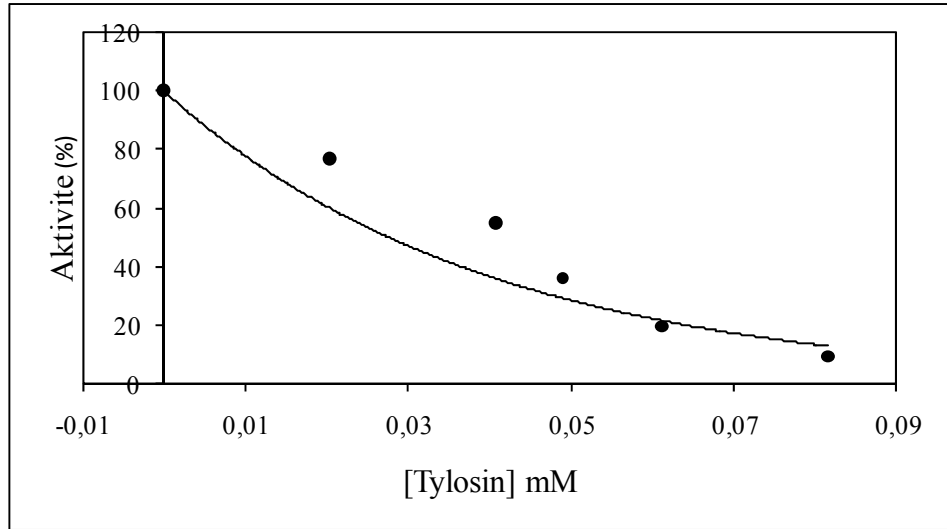
Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
0,69	90,32
0,83	65,16
1,1	50,97
1,39	37,42
6,95	12,26

Çizelge 4.26. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi sonuçları

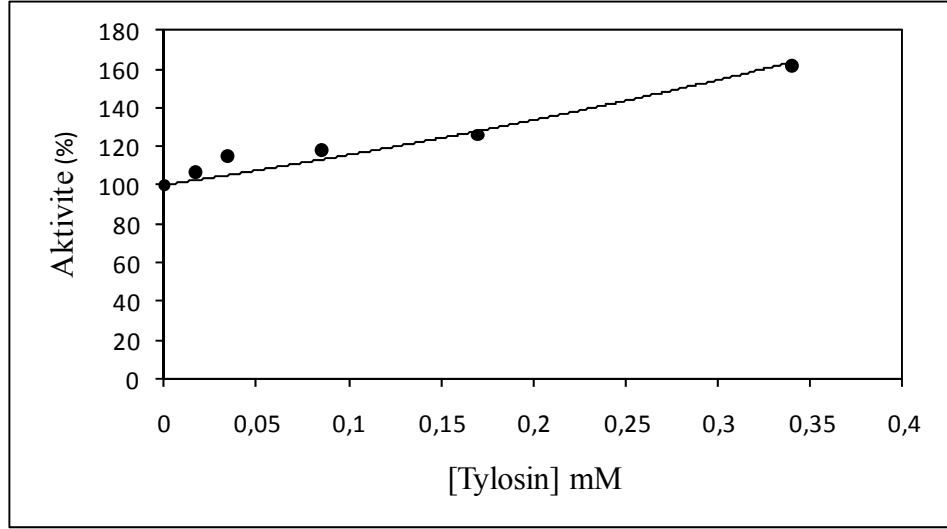
Konsantrasyon (mM)	Aktivite (%)
0,000	100,0
6,95	98,27
13,9	100,0
20,85	98,27
27,8	98,27
41,7	100,0



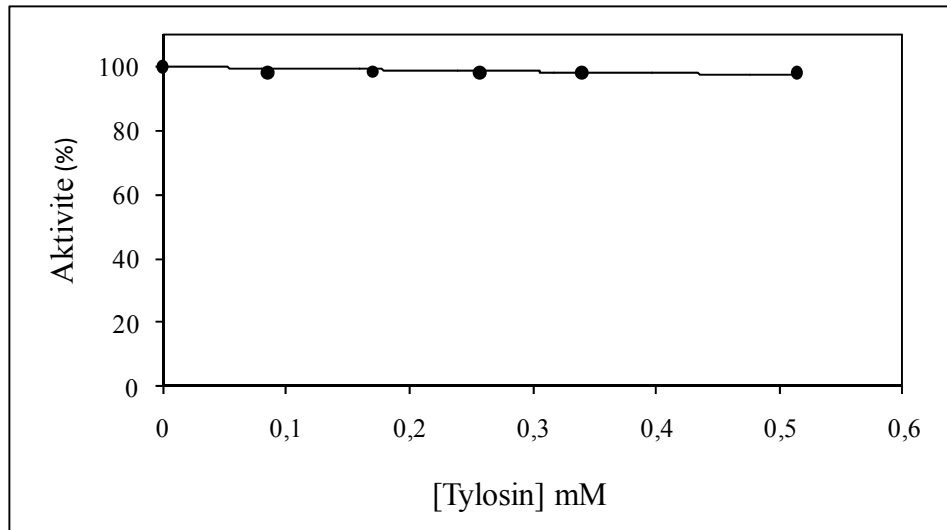
Şekil 4.8. Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



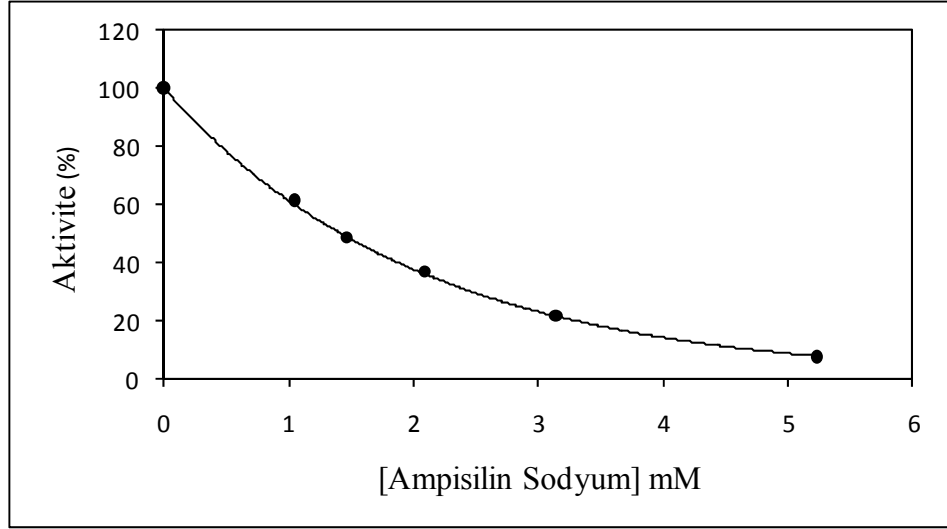
Şekil 4.9. Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



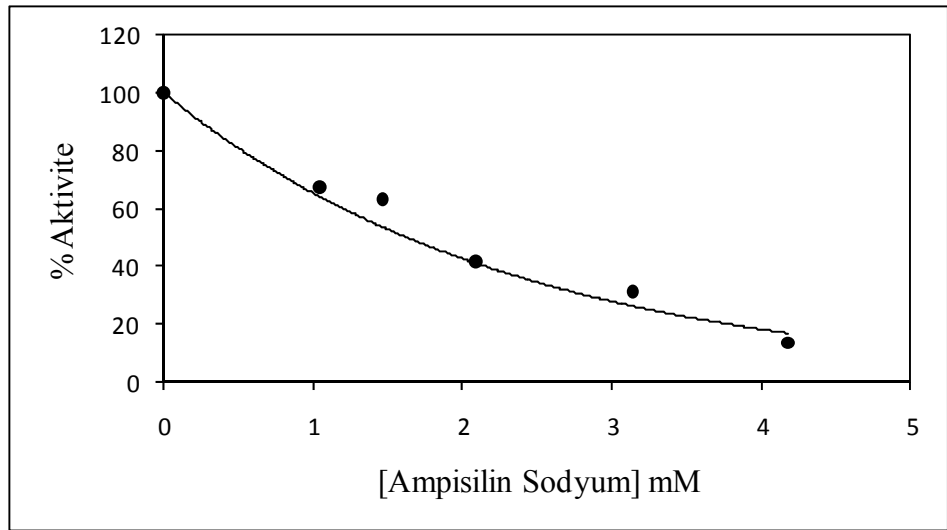
Şekil 4.10. Tylosin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



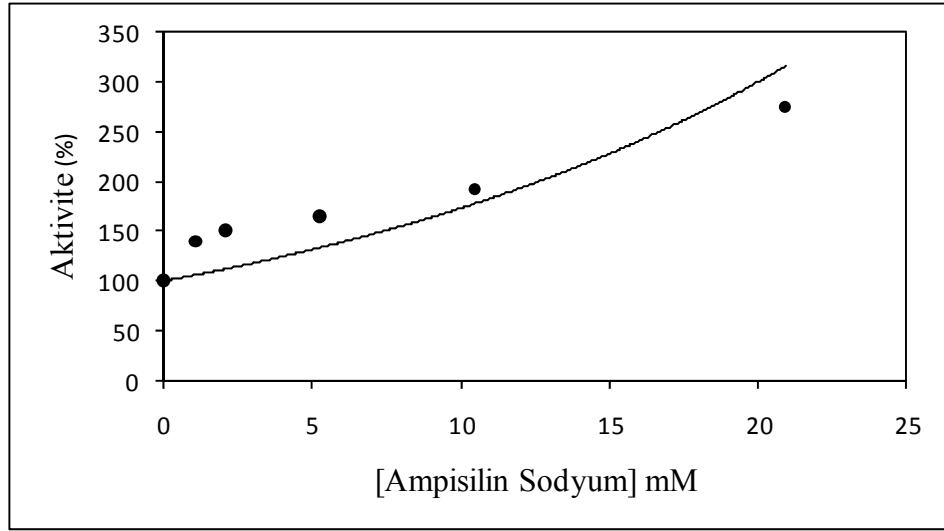
Şekil 4.11. Tylosin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



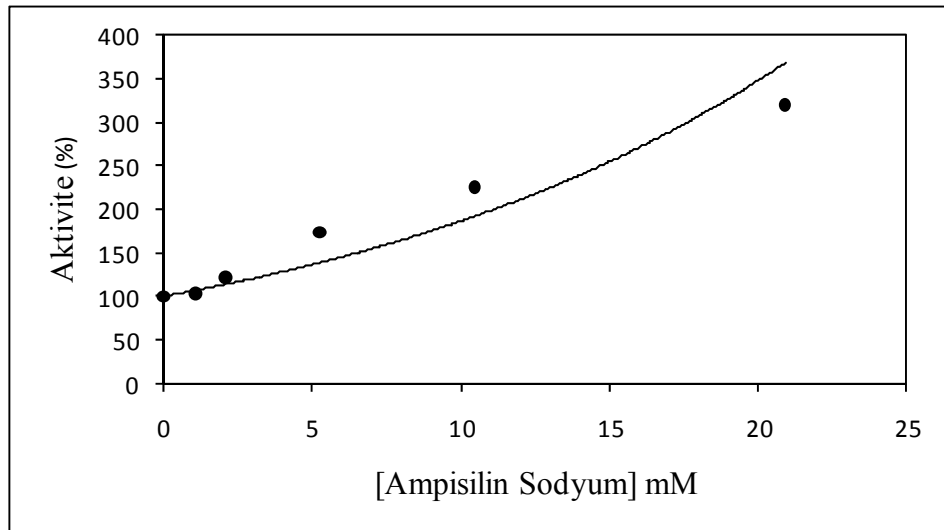
Şekil 4.12. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



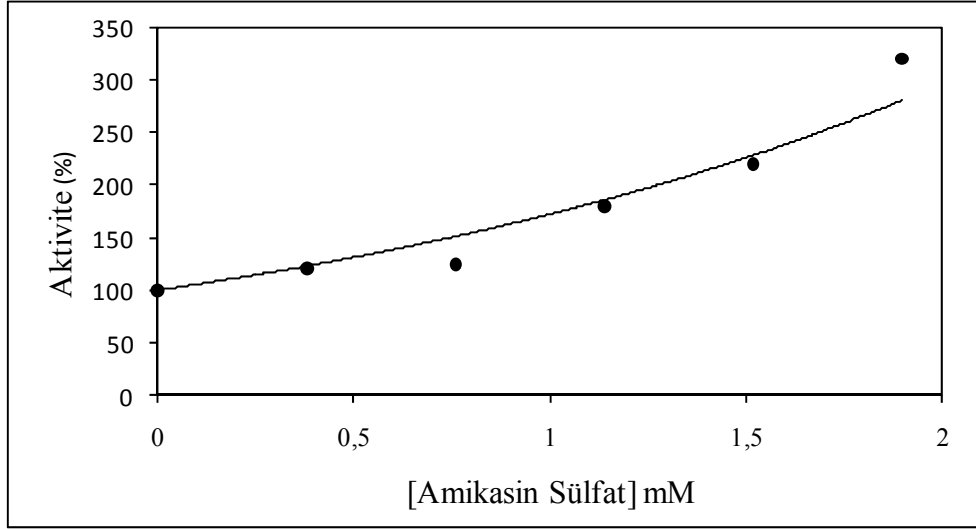
Şekil 4.13. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



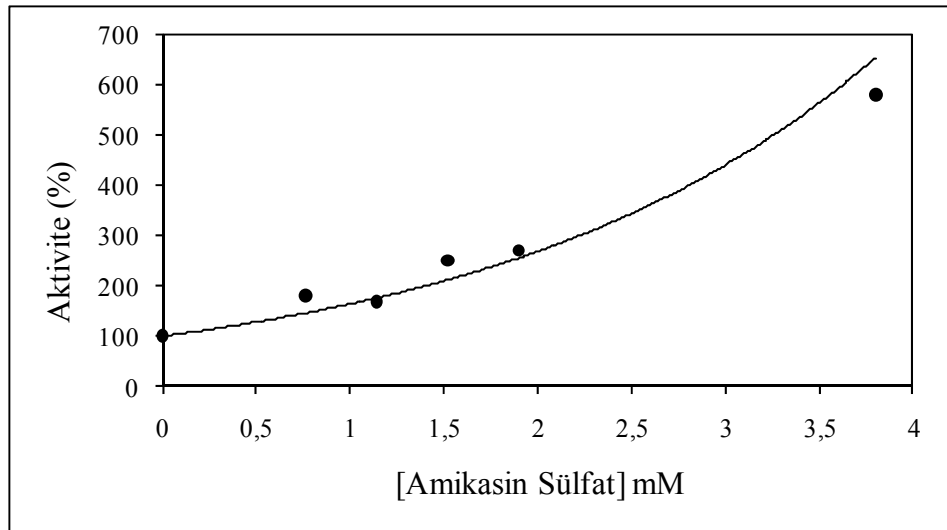
Şekil 4.14. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



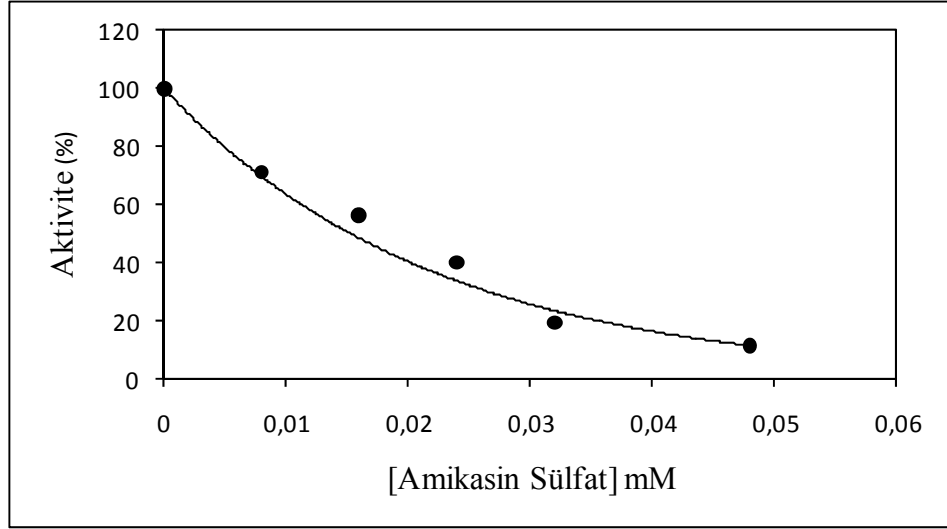
Şekil 4.15. Ampisilin sodyum'un koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



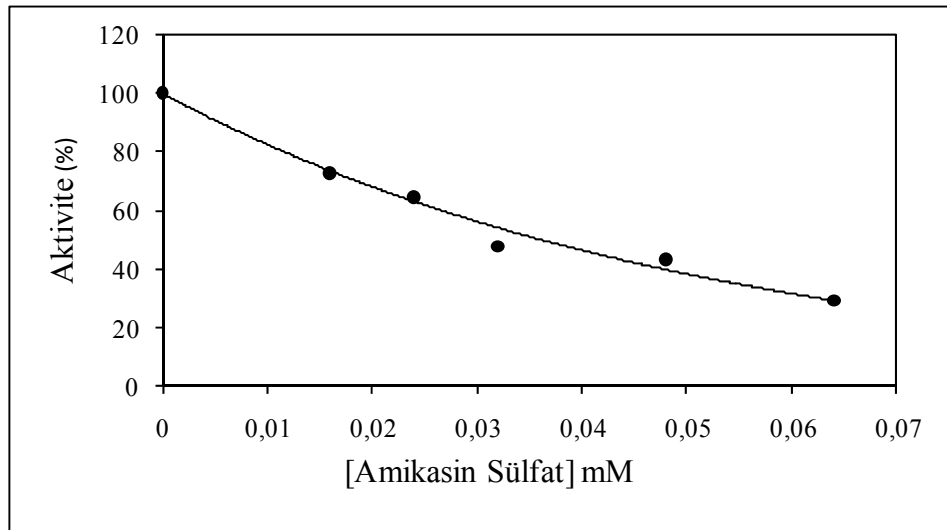
Şekil 4.16. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



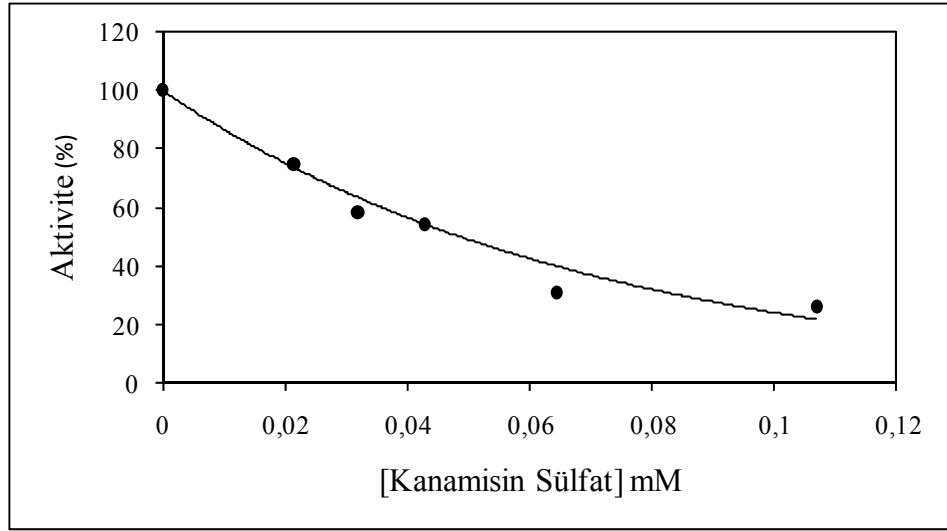
Şekil 4.17. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



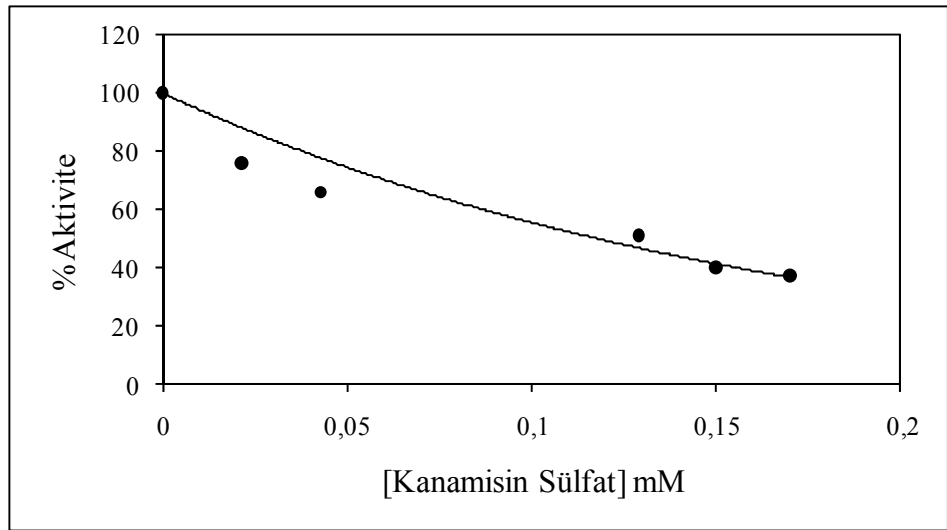
Şekil 4.18. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



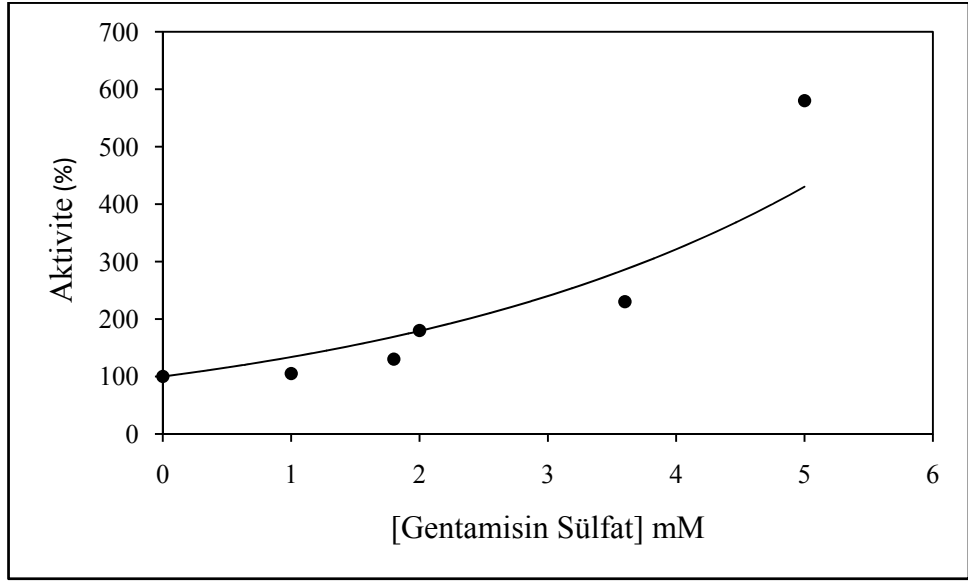
Şekil 4.19. Amikasin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



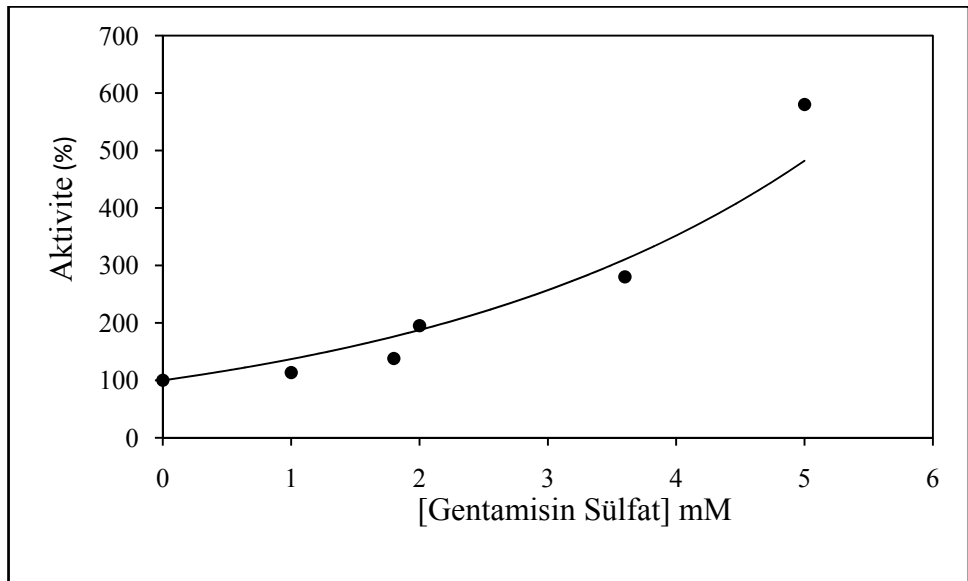
Şekil 4.20. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



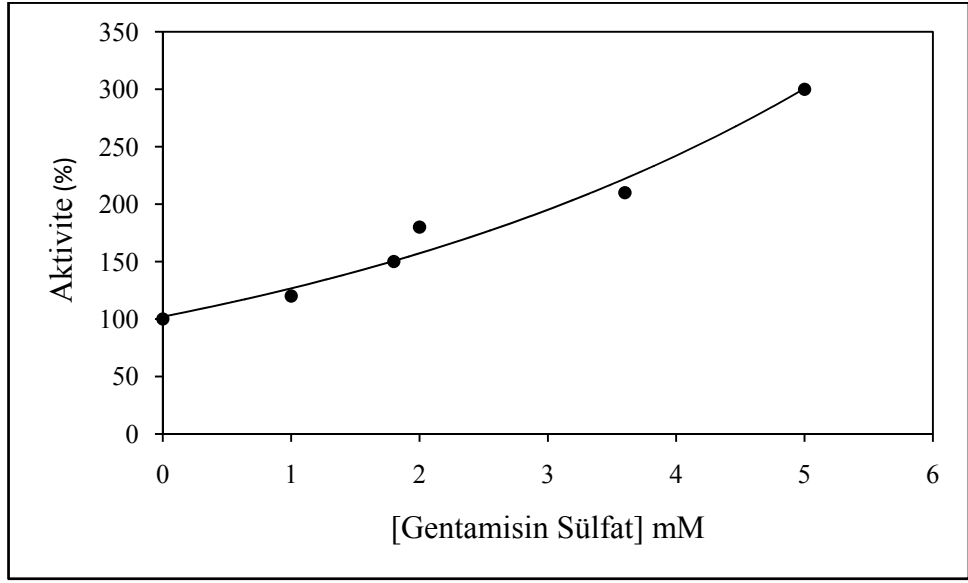
Şekil 4.21. Kanamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



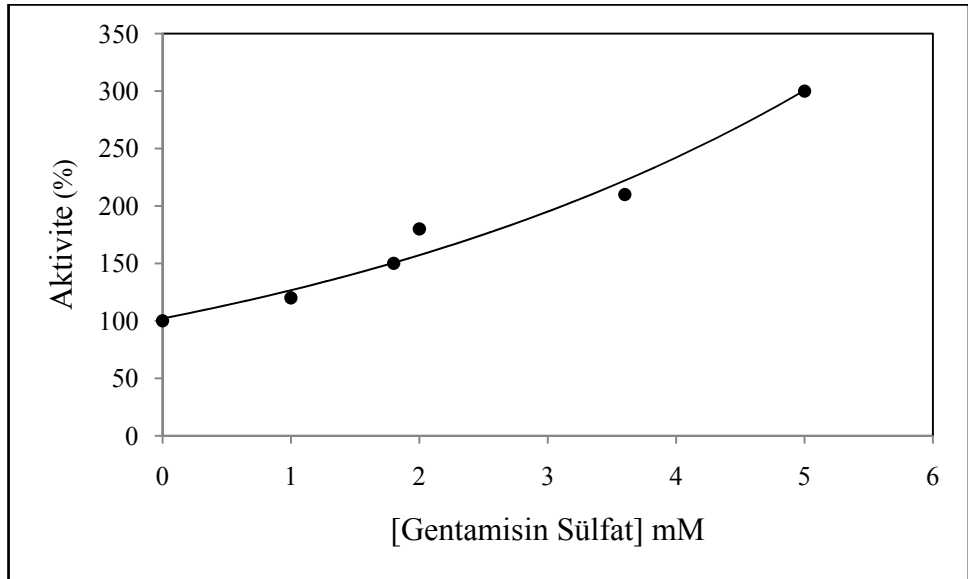
Şekil 4.22. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



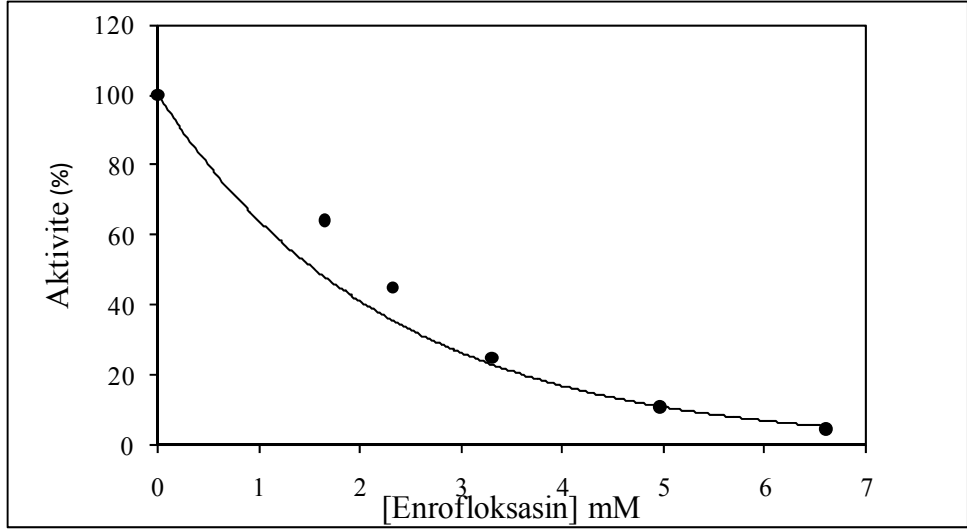
Şekil 4.23. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



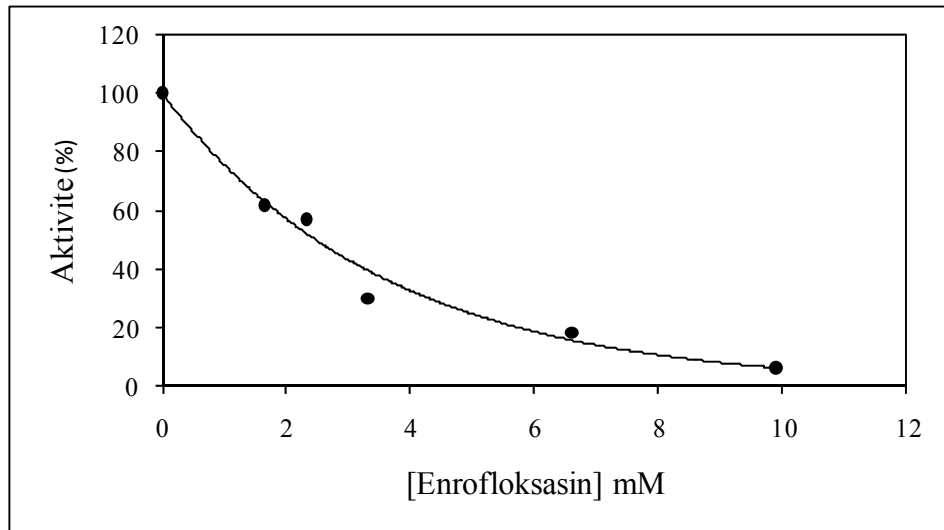
Şekil 4.24. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



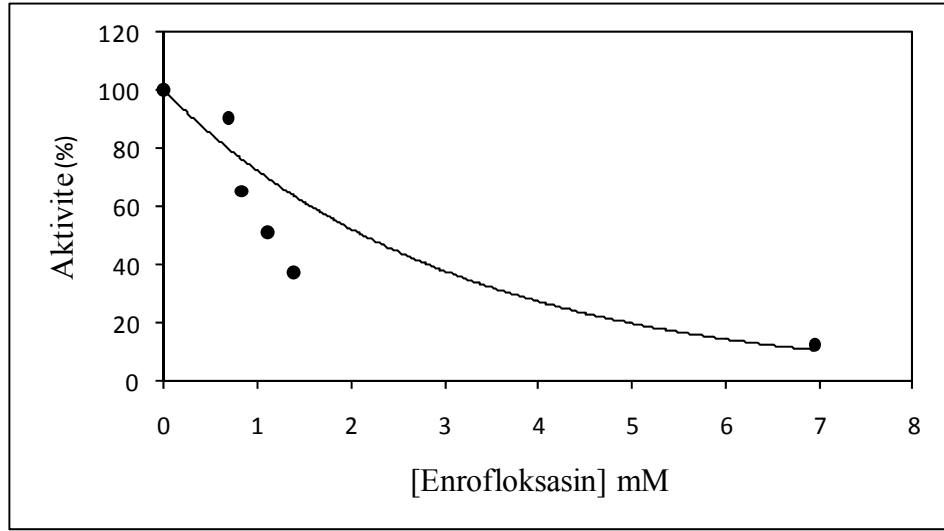
Şekil 4.25. Gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



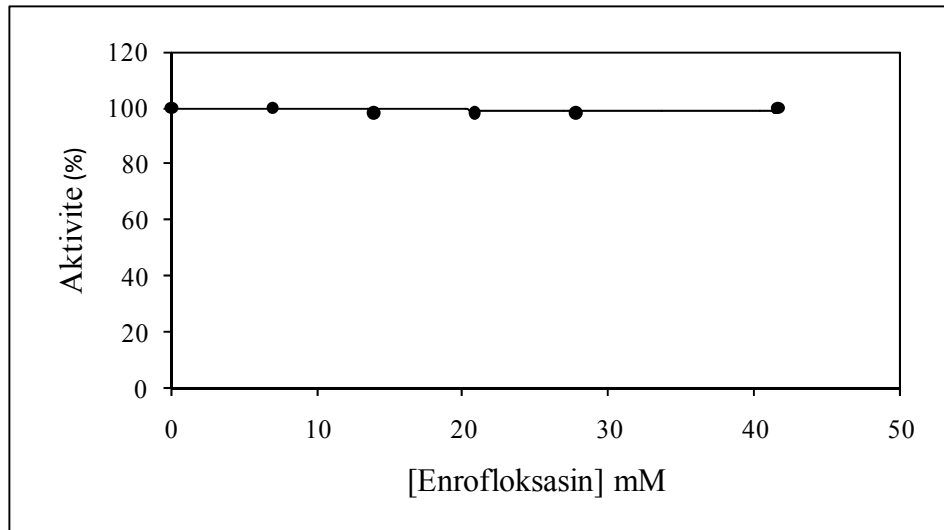
Şekil 4.26. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



Şekil 4.27. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin hidrataz aktivitesi grafiği



Şekil 4.28. Enrofloksasin'in koyun midesi CA I enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği



Şekil 4.29. Enrofloksasin'in koyun midesi CA II enzimi aktivitesi üzerine etkisinin esteraz aktivitesi grafiği

Çizelge 4.27. Koyun midesi karbonik anhidraz I izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların hidrataz aktivitesiyle belirlenen IC₅₀ değerleri

İLAÇLAR	IC ₅₀ (mM)
Enrofloksasin	1,560
Tylosin	0,0335
Ampisilin sodyum	1,410

Çizelge 4.28. Koyun midesi karbonik anhidraz II izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların hidrataz aktivitesiyle belirlenen IC₅₀ değerleri

İLAÇLAR	IC ₅₀ (mM)
Enrofloksasin	2,470
Tylosin	0,0387
Ampisilin sodyum	1,630

Çizelge 4.29. Koyun midesi karbonik anhidraz I izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların esteraz aktivitesiyle belirlenen IC₅₀ değerleri

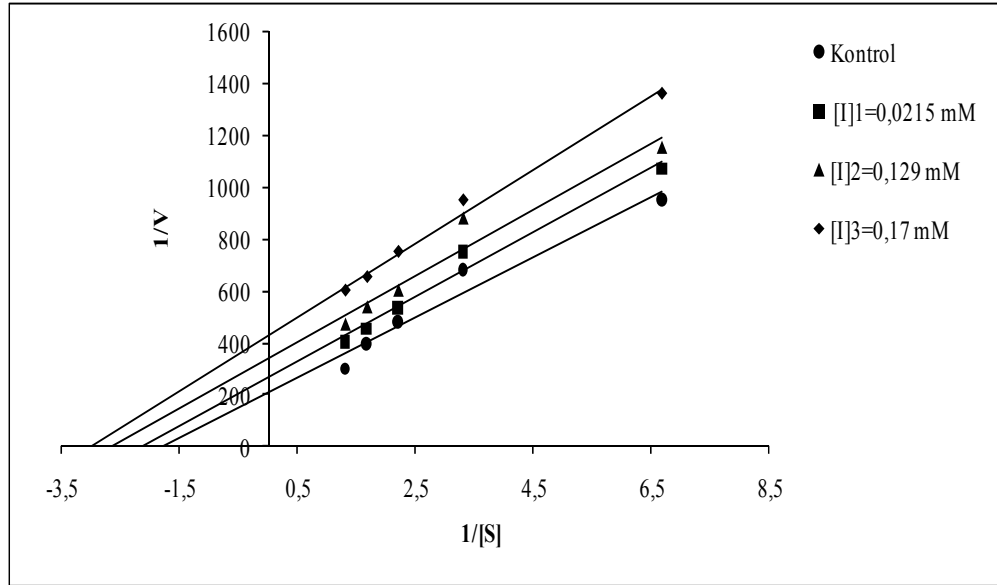
İLAÇLAR	IC ₅₀ (mM)
Enrofloksasin	1,320
Amikasin sülfat	0,0163
Kanamisin sülfat	0,0488

Çizelge 4.30. Koyun midesi karbonik anhidraz II izoenzimi için inhibitör etkisi gösteren ilaçların esteraz aktivitesiyle belirlenen IC₅₀ değerleri

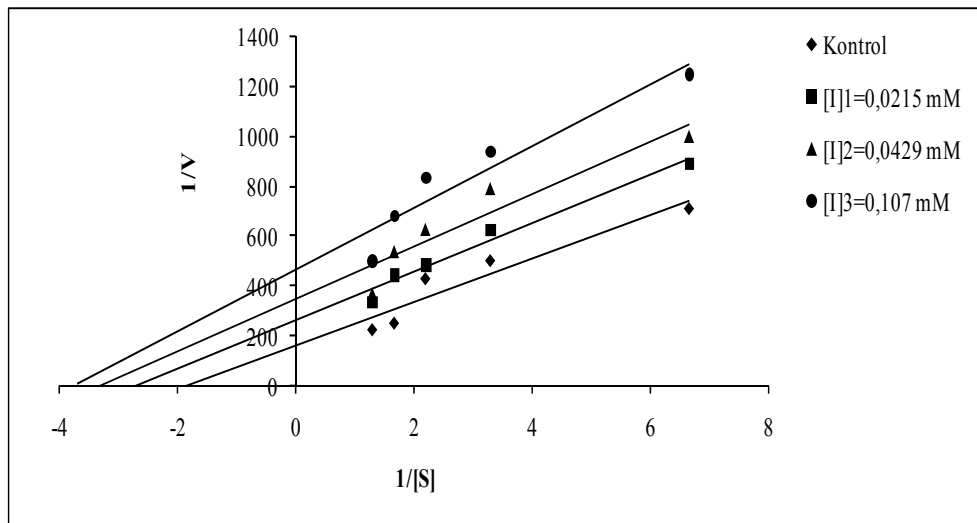
İLAÇLAR	IC ₅₀ (mM)
Amikasin sülfat	0,0362
Kanamisin sülfat	0,1180

4.4. Koyun Midesi Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Bazı İlaçlar İçin K_i Değerlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

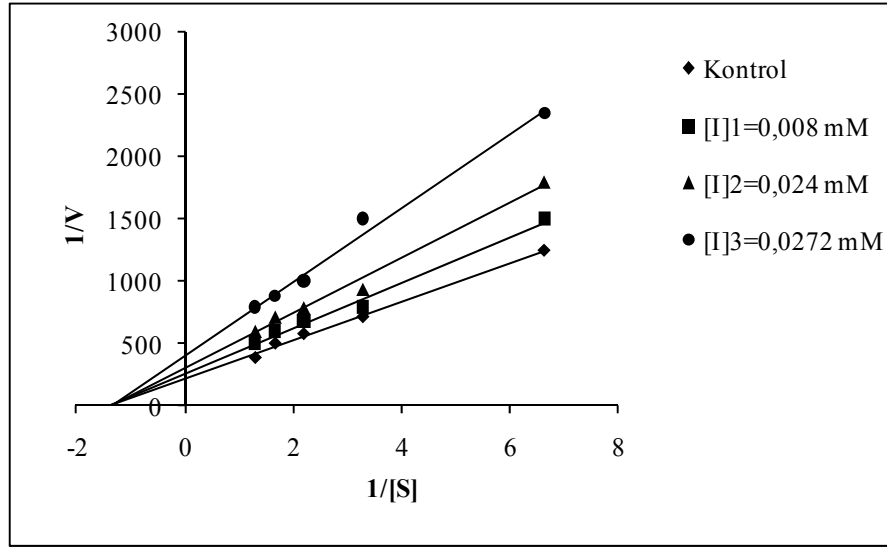
Koyun midesi karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri aktiviteleri üzerine esteraz aktivitesiyle inhibisyon etkisi gösteren enrofloksasin, amikasin sülfat ve kanamisin sülfat ilaçları için K_i değerlerini belirlemek amacıyla sabit 3 sabit ilaç konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonu belirlenerek aktivite değerleri ölçüldü. Bu değerlerden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Elde edilen grafiklerdeki her bir doğrunun denkleminde K_i değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4.30 - 4.34 ile Çizelge 4.31 ve 4.32'de verildi.



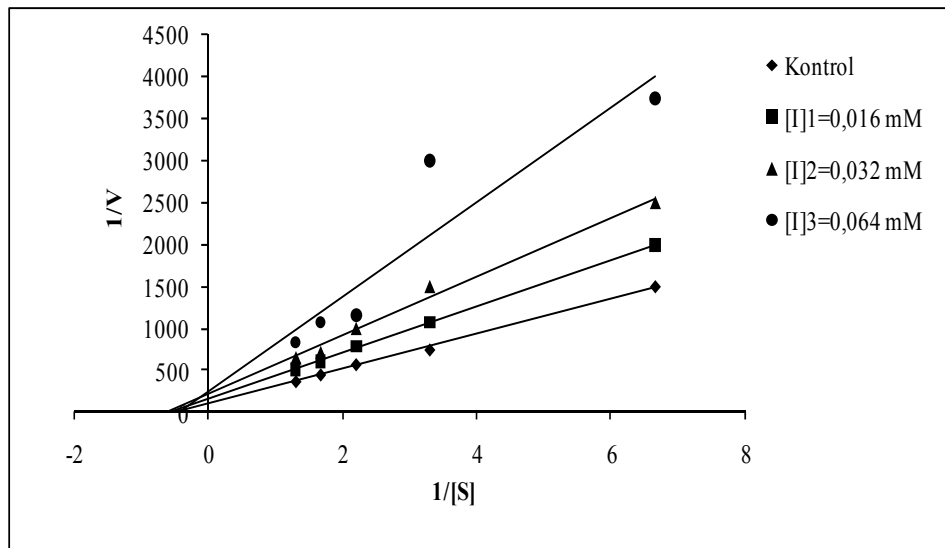
Şekil 4.30. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerine kanamisin sülfat'ın etkisi



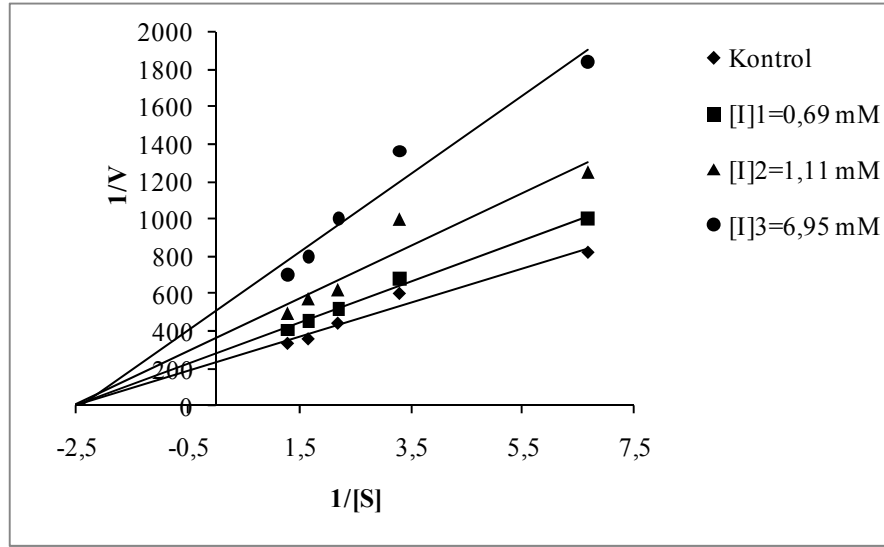
Şekil 4.31. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerine kanamisin sülfat'ın etkisi



Şekil 4.32. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi



Şekil 4.33. Koyun midesi CA II izoenzimi üzerine amikasin sülfat'ın etkisi



Şekil 4.34. Koyun midesi CA I izoenzimi üzerine enrofloksasin'in etkisi

Çizelge 4.31. Koyun midesi CA I izoenzimi için bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İlaçlar	IC_{50} (mM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Kanamisin sülfat	0,0488	0,0215	0,08	0,147±0,0613	Yarı yarışmalı
		0,129	0,20		
		0,170	0,162		
Amikasin sülfat	0,0163	0,008	0,0362	0,0421±0,0155	Yarışmasız
		0,024	0,0597		
		0,0272	0,0304		
Enrofloksasin	1,320	0,69	3,65	3,85±1,982	Yarışmasız
		1,10	1,97		
		6,95	5,92		

Çizelge 4.32. Koyun midesi CA II izoenzimi için bulunan K_i değerleri ve inhibisyon tipleri

İlaçlar	IC₅₀ (mM)	[I] (mM)	K_i (mM)	Ortalama K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Kanamisin sülfat	0,1180	0,0215	0,0340	0,042±0,0118	Yarı yarışmalı
		0,0429	0,0365		
		0,1070	0,0557		
Amikasin sülfat	0,0362	0,016	0,0282	0,0327±0,0078	Yarışmasız
		0,032	0,0282		
		0,064	0,0418		

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidrazlar (CA, karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) canlı organizmalarda pH düzenleyici, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi gibi önemli fonksiyonları olan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran yaygın bir metaloenzim ailesidir. Bu enzim fizyolojik şartlarda karbondioksitin hidrasyonu ve bikarbonatın dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemektedir (Maren 1967., Tashian 1992., Sly and Hu 1995., Smith and Ferry 2000). CA, hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde fonksiyon gören önemli bir enzimdir (Beydemir *et al.* 2004., Demir *et al.* 1999., Krungkrai 2001).

Karbonik anhidraz (CA) canlı metabolizmasında hidrataz aktivitesinin yanı sıra; böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi gibi dokularda H^+ ve HCO_3^- birikiminde rol almaktadır. Bunlardan başka önemli miktarda tükrük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve uterus dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır (Supuran *et al.* 1998).

Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri ispatlanmıştır (Graham *et al.* 1984., Tsuzuki and Miyachi 1989., Badger and Price 1994).

Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α -CA gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein (CARP) tanımlanmıştır. Bunların beş tanesi sitoplazmik (CA I, II, III, VII ve XIII), iki tanesi mitokondriyal (CA VA, VB), bir tanesi salgısal (CA VI), dört tanesi membrana bağlı (CA IV, IX, XII ve XIV), üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.* 2003, Supuran *et al.* 2004). CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümörojen olduğu belirlenmiştir (Nishimori 2004; Hilvo *et al.* 2005).

CA enziminin fotosentez olayının Calvin siklüsünde önemli bir görevi olduğu, kloroplast hücresinin tilakoid membrana bağlı CA enziminin Calvin siklüsündeki diğer enzimler ile birlikte bir multienzim sistemi içerisinde çalıştığı belirlenmiştir (Jebanathirajah and Coleman 1998). Karbonik anhidraz'ın bikarbonatın CO₂ dehidratasyonunu aktivite ederek CO₂ üretiminde artışa ve böylece hücreye CO₂ desteğinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Tsuzuki and Miyachi 1989).

Bu çalışmada koyun midesinde CA I ve II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması, bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi ve hayvan sağlığında sıkça kullanılan bazı antibiyotiklerin bu izoenzimler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Enzimin saflaştırılması işlemi iki basamakta gerçekleştirildi; 1) Koyun mide dokusundan homojenat hazırlanması. 2) Elde edilen homojenatın Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisine uygulanması. Bütün saflaştırma işlemleri soğuk ortamda gerçekleştirildi. Böylece sıcaklığın sebep olacağı enzim aktivitesindeki kaybın önüne geçilmiş oldu.

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırıldığı afinite kromatografisi kolonunda kolon materyali olarak kullanılan Sepharose 4B'ye L-tirozin uzantı kolu olarak takılmıştır ve buna da CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan sülfanilamid ligand olarak bağlanmıştır. Böylece bir dokudan CA'nın saflaştırma işlemi homojenat hazırlama işlemi ile birlikte 5-6 saat gibi kısa bir sürede tamamlanmıştır. Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi CA I ve CA II izoenzimleri afinite kromatografisi ile kısa bir sürede, koyun midesinde, CA I için spesifik aktivite 4834 (EÜ/mg protein), %59.1 verimle ve yaklaşık 529 kat, CA II için spesifik aktivite 5652,02 (EÜ/mg protein), %78 verimle ve yaklaşık 615 kat olarak saflaştırılmıştır. Verimin yüksek olması seçilen ligandın çok iyi bir seçim olduğunu ortaya koymaktadır.

Koyun midyesinden elde edilen homojenat ve Sepharose-4B afinite kromatografisinden elde edilen saf enzim çözeltilisinde protein miktarları Bradford yöntemiyle Şekil 4.1’de verilen standart grafikten kantitatif olarak belirlendi. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı ($\lambda=465$ nm) ve mavi ($\lambda=595$ nm) formu mevcuttur. Birçok protein hemen hemen aynı sonuç eğrilerini verdiği için, yöntem geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu yöntem, az zaman alması, daha az reaktif gerektirmesi ve hassasiyetinin diğer protein tayin metotlarına nazaran daha iyi olması (1-100 μg) sebebiyle avantajlı bir yöntemdir (Bradford 1976).

Afinite kolonundan elüe edilen saf enzim çözeltileri için kalitatif protein tayini yapıldı. Kalitatif protein tayininde kolondan elüe edilen enzim çözeltilerinin 280 nm’de absorbanslarına bakıldı. Bu yöntem proteinlerde bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm’de ışığı maksimum absorblamaları esasına dayanmaktadır (Segel 1975).

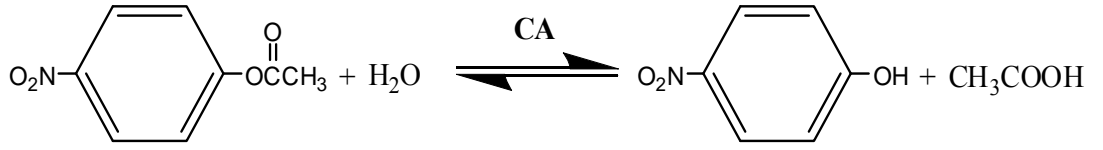
Aktivitelerin belirlenmesinde iki yöntem kullanıldı;

1.Hidrataz Aktivitesi

Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). CO_2 ’nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. Bu yöntemde göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO_2 hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi (t_0-t_c/t_c) formülüne göre hesaplandı (Maren 1960).

2.Esteraz Aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın ester bağınyı koparması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir. 348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir.



Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Verpoorte and Mehta 1967; Armstrong *et al.* 1966).

Enzimlerin saflığını kontrol etmek için sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yapıldı. Jelde tek bandın gözlenmesi ile koyun midesinden elde edilen CA I ve II izoenzimlerinin saf oldukları ispatlanmış oldu (Şekil 4.2).

Çoğunlukla her enzimin aktivitesinin optimum olduğu bir maksimum sıcaklık değeri vardır. Bu sıcaklığın üstünde aktivite düşmeye başlar ve enzimin üç boyutlu yapısında bozulma meydana gelir. Bizim çalışmamızda koyun midesinden saflaştırılan CA enzimlerinin optimum sıcakları 20°C ile 80°C arasında ve 10°C aralıkla enzimin gösterdiği aktiviteler spektrofotometrik olarak ölçülerek belirlendi. CA I ve CA II için de optimum sıcaklık değeri 50°C olarak bulundu. Hisar ve arkadaşlarının 2002'de, gökkuşuğu alabalığı eritrositlerinde yaptıkları çalışmada CA enziminin optimum sıcaklığının 25°C olduğunu belirlemiştir. Yine alabalık lens karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığı $22,5^\circ\text{C}$ olarak bulunmuştur (Beydemir *et al.* 2006). Havuç yapraklarından ve köklerinden saflaştırılan CA enziminin optimum sıcaklığı her iki kaynak için de 75°C olarak belirlenmiştir (Demir *et al.* 1997). Dolayısıyla, koyun midesi CA'larının optimum sıcaklığı yine alabalık eritrosit ve göz lensi CA enziminin

optimum sıcaklığından daha yüksektir. Fakat bitkiden saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin optimum sıcaklığından düşük olduğu görülmüştür.

Koyun midyesinden saf olarak elde edilen CA enzimlerinin alt birimlerinin molekül kütlelerinin saptanmasında SDS-PAGE metodu kullanıldı. Şekil 4.2’de verildiği gibi koyun midyesi CA enzim numuneleri ile birlikte standart protein numuneleri SDS-PAGE’de aynı zamanda yürütüldü. Log MK-Rf standart grafiği çizildi ve Şekil 4.3’de, verildi. Daha sonra koyun midyesinden elde edilen enzim numunelerinin Rf değerleri yardımıyla standart grafikten karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin alt birim molekül kütleleri sırasıyla 26,7 kDa ve 26,7 kDa olarak hesaplandı.

İnsan eritrositlerinden izole edilen CA-I ve CA-II izoenzimleri, sığır eritrositlerinden saflaştırılan CA enziminin molekül kütleleri yaklaşık 30 kDa olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, yuvarlak ağızlı balıklardan *Myxine glutinosa* balıklarında eritrosit CA enziminin molekül kütlesi 29 kDa bulunmuştur (Peterson *et al.* 1997) İki farklı köpek balığında ise molekül kütlesi 36 kDa ve 40 kDa olarak bulunmuştur (Maynard and Coleman 1971). Bunun yanı sıra bitki kloroplastlarından elde edilen hekzamerik bir yapıya sahip olan CA’nın ise yaklaşık 180 kDa olduğu görülmüştür (Pocker and Joan 1974; Demir *et al.* 1999; Demir *et al.* 2000; Özdemir *et al.* 1997). Ek olarak, insan böbreğinde hücre zarına bağlı ve molekül kütleleri 66 kDa civarında olan CA izoenzimlerine de rastlanmıştır (Pocker and Sarkanen, 1979).

Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik şartlardaki substratı CO₂’dir. CO₂ diğer kullanılan substratlardan daha düşük K_M ve daha yüksek V_{max}’a sahiptir. Enzimlerin doğal substratı yerine aynı deney şartlarında analogları veya enzimin *in vitro* şartlarda farklı bir reaksiyonu katalizleyebilmesi ve bu reaksiyonda ürüne dönüştürdüğü substratı kullanıldığında genellikle enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Ulus *et al.* 1997). Çalışmamızda koyun midyesinden saflaştırılan CA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesinde substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetat için K_M ve V_{max} değerleri

belirlenmiştir. Bu amaçla 5 farklı p-nitrofenilasetat substratı konsantrasyonu kullanılarak spektrofotometrik olarak 348 nm’de enzim aktiviteleri belirlendi ve saflaştırılan CA enzimleri için Lineveawer-Burk grafiği çizilerek bu grafikten K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı (Şekil 4.6 ve 4.7). Koyun midesinden saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin K_M değerleri sırasıyla 1,32 ve 1,968 mM olarak bulundu. V_{max} değerleri CA I ve CA II için sırasıyla 0,22 ve 0,329 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein dakika olarak grafik denklemleri yardımıyla hesaplandı. CA I için bulunan K_M değerinin daha küçük olması CA II’den daha fazla p-nitrofenilasetat substratına karşı ilgisi olduğu anlamına gelir.

İnsan eritrositlerinden elde edilen HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin K_M değerleri sırasıyla 5,0, 4,3 mM iken V_{max} değerleri 1,0 ve 2,0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein dakika bulunmuştur (Çiftçi 1992). Sığır eritrositleri plazma membranındaki CA enziminin K_M ve V_{max} değerleri de 3,596 mM ve $1,948 \cdot 10^{-3}$ mM/L.dak olarak bulunmuştur (Demir *et al.* 2000).

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu yüzden enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesi çalışmalarında da inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu 2004).

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1), glokom, asit-baz dengesizliği, epilepsi ve diğer kas-sinir hastalıkları, yüksek irtifa hastalığı, ödem ve obezite gibi birçok hastalığın tedavisinde ve bu hastalıklardan korunulmasında, farmakolojik ajanların dizayn edilmesi için ilgi çekici hedef olmuşlardır (Renzi 2000, Scozzafava 2004).

CA izoenzimlerinin sülfonamidlerle inhibisyonu konusunda birçok çalışma vardır (Supuran 2003, Pastorekova 2004). Ama CA izoenzimlerinin antibiyotiklerle inhibisyonu konusunda çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Antibiyotikler, kısmen ya da tamamen mikroorganizmalardan türetilen, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek amaçlı kullanılan ilaçlardır. Mikroorganizmaları öldüren ya da yeniden üremelerini durduran virüslere karşı etkisizdirler (Lukacs 1990).

Birçok antibiyotik tedavi edici olarak kullanılır. Birkaç literatürde, insan karaciğer enzimleri olan aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalın fosfataz enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı ya da azalttığı rapor edilmiştir (Pickering 1973, Honjo 1984).

Cefazolin sodyum, cephadrine, sulbactam/cefoperazone ve chloramphenicol sodium succinate antibiyotikleri Çoban *et al.* (1998) tarafından çalışılmıştır. Bu çalışmada IC₅₀ değerleri CA I için sırasıyla 9, 16, 19 ve 48 mM, CA II için sırasıyla 6, 10, 15 ve 17mM olarak bulunmuştur.

İlaç, canlı hücre üzerinde meydana getirdiği etkiyle hastalıkların teşhisini, iyileştirilmesi veya semptomlarının azaltılması amacıyla tedavisini veya bu hastalıktan korunmayı sağlayan, canlılara değişik uygulama yöntemleri ile verilen doğal, yarı sentetik veya sentetik kimyasal bileşiklerdir. Günümüzde ilaç kullanımı giderek artmaktadır. Bu ilaçlar içinde en yaygın olarak kullanılan ilaç türünü antibiyotikler oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların sebep olduğu hemen hemen tüm hastalıklarda antibiyotikler tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Antibiyotikler insan sağlığında olduğu kadar hayvan sağlığında da önemli bir kullanım alanına sahiptir. Hayvan sağlığında kullanılan ilaçların, metabolik önemi yüksek olan bir enzim üzerine etkisinin incelenmesi bilimsel açıdan büyük önem arz etmektedir. Bu önemin farkındalığının verdiği sorumlulukla karbonik anhidraz enzimi üzerine hayvan sağlığında yaygın olarak kullanılan bazı ilaçların etkilerini inceledik. Çalışmamızda 6 tane antibiyotiğin inhibitör kabiliyetleri incelendi.

Çalışmada seçilen ilaçların koyun midesi CA enzimi üzerine etkilerinin araştırıldığı hiçbir literatüre rastlanmamıştır. Genel olarak ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerindeki inhibisyon etkileri IC_{50} (enzimin aktivitesini %50 inhibe eden ilaç konsantrasyonu) değeri olarak verilmektedir. Kinetik çalışmalarımız sırasında enzim aktivitesini inhibe eden ilaçların IC_{50} değerleri hidrataz ve esteraz aktivitesiyle belirlenmiştir. Bilindiği gibi IC_{50} değeri küçük olan inhibitörün inhibisyon etkisi daha yüksektir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda kullanılan ilaçların koyun midesi CA I izoenzimi üzerine hidrataz aktivitesiyle inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralaması; tylosin>ampisilin sodyum>enrofloksasin şeklindedir. Kullanılan ilaçların koyun midesi CA I izoenzimi üzerine esteraz aktivitesiyle inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralaması; amikasin sülfat >kanamisin sülfat >enrofloksasin şeklindedir. Kullanılan ilaçların koyun midesi CA II izoenzimi üzerine hidrataz aktivitesiyle inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralaması; tylosin>ampisilin sodyum>enrofloksasin şeklindedir. Kullanılan ilaçların koyun midesi CA II izoenzimi üzerine esteraz aktivitesiyle inhibisyon etkilerinin büyükten küçüğe doğru sıralaması; amikasin sülfat >kanamisin sülfat şeklindedir. Bu sonuçlara göre koyun midesi CA I ve II izoenzimleri üzerinde hidrataz aktivitesiyle en güçlü inhibisyon etkisine sahip olan ilaç tylosin'dir (sırasıyla IC_{50} : 0,0335 mM ve 0,0387 mM). Yine bu sonuçlara göre koyun midesi CA I ve II izoenzimleri üzerinde esteraz aktivitesiyle en güçlü inhibisyon etkisine sahip olan ilaç amikasin sülfat'tır (sırasıyla IC_{50} : 0,0163 mM ve 0,0362 mM).

Çalışmamızda kullanılan ilaçlardan biri olan gentamisin sülfat, NADPH oksidaz ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimleri için inhibitör özelliği gösteren aminoglikozid bir antibiyotiktir (Beydemir *et al.* 2003, Umeki 1995). Aminoglikozid bir antibiyotik olan gentamisin, özellikle gram negatif organizmaların sebep olduğu birçok enfeksiyon tipinde tedavi edici olarak kullanılır. Ancak E coli gram negatif bir bakteri olmasına rağmen gentamisine direnç göstermiştir (kayaalp 2002). Hidrataz ve esteraz aktiviteleriyle yaptığımız kinetik çalışmalar sonucu gentamisin sülfat'ın koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerini aktive ettiği görülmüştür (1; 1,8; 2; 3,6; 5 mM). Benzer bir çalışmada gentamisin sülfat'ın 4 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda (1.98,

3.96, 5.94, 7.92, 9.90 mM) insan eritrosit CA I ve II izoenzimlerini aktive ettiği görülmüştür (Beydemir 2002). Özensoy *et al.* (2008) tarafından yapılan bir çalışmada gentamisin sülfat için IC₅₀ değerleri hCA I ve hCA II için sırasıyla 0,00235 mM ve 0,00253 mM olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda koyun midesi CA I izoenzimi üzerinde esteraz aktivitesiyle yüksek inhibisyon etkisi gösteren amikasin sülfat, kanamisin sülfat ve enrofloksasin ilaçları için, koyun midesi CA II izoenzimi üzerinde esteraz aktivitesiyle yüksek inhibisyon etkisi gösteren amikasin sülfat ve kanamisin sülfat ilaçları için K_i sabitlerinin belirlenmesi işleminde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı (Segel 1975, Telefoncu 1986). Sonuçların hassas bulunabilmesi için her inhibitörlü çalışma için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda 1/V ve 1/[S] değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.30-4.34). Grafik çiziminde Microsoft-Excel programından faydalanılmıştır. K_i değerlerine göre yapılan sıralama IC₅₀ değerleri ile ilgili yapılan sıralama ile aynıdır. Kanamisin sülfat ilacının CA I için üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması 0,147±0,0613 mM, amikasin sülfat ilacının CA I için hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması 0,0421±0,0155 mM, enrofloksasin ilacının CA I için hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması 3,85±1,982 mM olarak belirlendi. Kanamisin sülfat ilacının CA II için üç sabit inhibitör konsantrasyonunda hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması 0,042±0,0118 mM ve amikasin sülfat ilacının CA II için hesaplanan K_i sabitlerinin ortalaması 0,0327±0,0078 mM olarak hesaplandı. Çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplanarak inhibitörlerin inhibisyon tipleri belirlenmiş oldu. Buna göre CA I izoenzimini amikasin sülfat ve enrofloksasin ilaçları yarışmasız, kanamisin ise yarı yarışmalı olarak inhibe ettikleri bulunmuştur. CA II izoenzimini ise amikasin sülfat yarışmasız, kanamisin sülfat ise yarı yarışmalı olarak inhibe ettikleri belirlenmiştir. Yarışmasız inhibitörler enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlanır ve enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek inhibitör etkisi gösterirler.

Çizelge 4.33. Koyun midesi CA I ve CA II için yapılan kinetik çalışmaların toplu sonuçları

	CA I	CA II
Optimum sıcaklık	50	50
K_M(mM)	1,32	1,968
V_{max}	0,22	0,329
Molekül kütlesi tayini (kDa) (SDS-PAGE ile)	26,7	26,7

Çizelge 4.34. Koyun midesi CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktivitesiyle bulunan IC₅₀ değerlerinin toplu gösterilişi.

İLAÇLAR	IC ₅₀ (Mm)	
	CA I	CA II
Enrofloksasin	1,41	2,47
Tylosin	0,0335	0,0387
Ampisilin sodyum	1,56	1,63

Çizelge 4.35. Koyun midesi CA I ve CA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesiyle bulunan inhibisyonun toplu görüşleri

İLAÇLAR	CA I			CA II		
	IC ₅₀ (Mm)	Ort. K _i (Mm)	İnhibisyon türü	IC ₅₀ (Mm)	Ort. K _i (Mm)	İnhibisyon türü
Kanamisin sülfat	0,0488	0,147±0,0613	Yarı yarışmalı	0,118	0,042±0,0118	yarı yarışmalı
Amikasin sülfat	0,0163	0,0421±0,0155	yarışmasız	0,0362	0,0327±0,0078	yarışmasız
Enrofloksasin	1,32	3,85±1,982	yarışmasız	-	-	-

KAYNAKLAR

- Abbate F, Supuran CT, Scozzafava A, Orioli P, Stubbs MT, Klebe G. Nonaromatic sulfonamide group as an ideal anchor for potent human carbonic anhydrase inhibitors: Role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design. *J Med Chem* 2002; 45: 3583–3587.
- Ahmed S, James K, Owen CP, Patel CK, Patel M. Acid dissociation constant: A potential physicochemical factor in the inhibition of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11 :899–902.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem*, 214, 5137.
- Peterson, R.E., Tu, C. and Linser, P.J., 1997. Isolation and Characterization of a Carbonic Anhydrase Homologue from the Zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Evol*, 44, 432-439.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166.
- Badger, M.R. and Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 369-392.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Büyükokuroğlu, M.E., 2002. Effects of Gentamicin Sulfate on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes *in Vitro* and from Rat Erythrocytes *in Vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 966-969
- Beydemir, Ş., Gülçin İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., and Supuran, C.T., 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, 20, 35-39.
- Boriack-Sjodin, P.A., Heck, R.W., Laipis, P.J., Silverman, D.N. and Christianson, D.W., 1995. Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution, implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 92, 10949-10953.
- Bottcher, K., Waheed, A., Sly, W.S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: purification, characterization and comparison with mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.
- 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.

- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Bülbül M., Saraçoğlu N., Küfrevioğlu Ö.İ., Çiftçi M., 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 10, 2561.
- Bülbül, M., Hisar, O., Beydemir, S., Çiftçi, M. and Küfrevioğlu, Ö. I., 2003. The *In Vitro* and *In Vivo* Inhibitory Effects of Some Sulfonamide Derivatives on Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity. *Journal of Enzyme Inhibition Medical Chemistry*. 18, 371-375.
- Casini A, Antel J, Abbate F, Scozzafava A, David S, Waldeck H, Schafer S, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II, and IV. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:841–845.
- Chegwidden, W.R., Edwards, Y. and Carter, N., 2000. The Carbonic Anhydrase-New Horizons. *Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., pp. 2165-2204, McGraw-Hill, Inc., Newyork.
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M. and Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III and IV are present in human esophageal epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45, 35- 40.
- Claudiu T. Supuran : “Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators” Rev.7, (February 2008), 1-14
- Çoban AT, Nalbantoğlu B, Çil MY, Özdemir H, Küfrevioğlu Ö.I. Investigation of the inhibition effects of some antibiotics on human erythrocyte carbonic anhydrase isozymes. *Tr J Med Sci* 1998; 28:407.
- Demir, Y., Demir, N. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1999. Carbonic anhydrase from *Vicia canencens* leaves. *Prep. Biochem. & Biotechnol.*, 29, 235-244
- Demir, Y., Demir, N., Nadaroğlu, H. and Bakan, E., 2000. Purification and characterization of carbonic anhydrase from bovine erythrocyte plasma membrane. *Prep. Biochem. Biochem. Biotechnol.*, 30, 49-59.
- Feldstein, J. B., Silverman, D. N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J. Biol. Chem.* 259, 5447-5453.
- Fresht, A., 1999, *Structure and mechanism in protein science*, W.H. Freeman and Company, New York, ABD.
- Gilbert, H.F., 1992. *Basic Concepts in Biochemistry*, Mc Graw-Hill Inc, p.81 Germany.
- Graham, D., Reed, M.L., Patterson, B.D., Hockley, D.G. and Dwyer, M., 1984. Chemical properties, distribution and physiology of plant and algal carbonic anhydrases. *Ann. NY Acad. Sci.* 429, 222-237.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392, 83-92, Part 1.

- Jebanathirajah, J.A. and Coleman, J.R., 1998. Association of carbonic anhydrase with a Calvin cycle enzyme complex in *Nicotiana tabacum*. *Planta*, 204, 177-82.
- Kayaalp, S.O., 2000. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 10. Baskı.
- Keha, .E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya, Aktif yayınları*, 97-125, Erzurum.
- Krungkrai, S. R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lehninger AL. *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth ,Publishers Inc,2000
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2005, *Principles of Biochemistry*, 3.Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- Lesburg, C.A. and Christianson D.W., 1995. X-RAY crystallographic studies oengineered hydrogen-bond network in protein-zinc binding-site. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 6838-6844.
- Lindskog, S. and Silverman, D.W., 2000. In the *Carbonic Anhydrase-New Horizons*. Basel, 175-196.
- Lonnerholm, G., Selking, O. and Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88, 1151-1161.
- Maren, T. H., Conroy, C.W., Wynns, G.C., and Godman, D.R. 1997. “*Renal and Cerebrospinal fluid formation pharmacology of high molecular weight Carbonic Anhydrase Inhibitor*”, *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, 98-104.
- Maren, T.H., 1960. A simplifield micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130, 26.
- Mehta S, Edsall J.T. *J.Biol. Chem*, 242, 4221-4229.
- Nishimori, I., 2004. Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in *Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators* (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.) pp 24-43, CRC Press, Boca Raton, FL
- Nuti, E., Orlandini, E., Nencetti, S., Rossello, A., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2007. "Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors. Inhibition of Human Tumor-Associated Isozymes IX and Cytosolic Isozyme I and II with Sulfonylated Hydroxamates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 2298.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosyphoshatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, (315-312).
- Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., Nalbantoğlu, B., Demir, N. and Bakan, N., 1997. The inhibition kinetics of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes with some active cations. *Turk J. Med. Sci*, 27, 559-563.
- Özensoy, Ö., Arslan, O., Koçkar, F., 2008. Differential *in vitro* inhibition effects of some antibiotics on tumor associated carbonic anhydrase isozymes of hCA-IX

- and hCA-XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, August 2008; 23(4): 579–585
- Parkkila, S. and Parkkila, A.K., 1996. Carbonic anhydrase in the elementary tract-roles of the different isoenzymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Biological Gastroenterology*, 31, 305-317.
- Pocker, Y. and Joan, S. Y., 1974. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. *Biochemistry*, 13, 5116.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rakkila, P., Harkonen, P.L. and Vaananen, H.K., 1999. Carbonic anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB Journal*, 13, 513-522.
- Segel, I.H., C. John Wiley and Sons, 1975. *Enzyme Kinetics*. New York.
- Sly, W.W. and Hu, P.Y., 1995. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 64, 375-401.
- Smith, K.S. and Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases *FEMS Microbiology Reviews* 24,335-366.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Silverman, D.N. and Christianson, D.W., 1988. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide. Molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Science*, 7 556-563.
- Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 3th Edition, 233-260, New York
- Supuran C.T. Indisulam, 2003: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*;12:283–287.
- Supuran, C. T., and Scozzafava, A., “Carbonic Anhydrase Inhibitors”, *Curr.Med.Chem.*, 1, (2001), 61-97
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., 2000. *Eur. J. Med. Chem*, 35, 867.
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1: 61-97.
- Supuran, C.T., Ilies, M. and Scozzafava, A., 1998. Carbonic Anhydrase Inhibitors – Part 29: Interaction of isoenzymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 33, 739-751.
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. *Adv. Genet.*, 30, 321-356.
- Telefoncu, A., 1986. *Temel ve Uygulamalı Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Yayını (Der) 59, İzmir.
- Tsuzuki, M. and Miyachi S., 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat. Bot.* 34, 85-104.
- Verpoorte, J. A., 1967. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C Mehta S, Edsall J.T. *J.Biol. Chem*, 242, 4221-4229.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S., Zhang, R., 2006. A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative biochemistry and physiology, Part B. Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 190-194.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2004 yılında kazandığı Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. 2008 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı.