

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

76880

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDE BULUNAN KARBONİK
ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE BAZI İLAÇLARIN
AKTİVASYON VE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

76880

Şükrü BEYDEMİR

Yönetici: Prof.Dr.Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde bazı ilaçların etkileri araştırıldı.

Bu amaçla önce eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırıldı. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalanıldı.

Bu tez kapsamında karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde 6 ilacın etkisine bakıldı. HCA-I'in esteraz aktivitesi üzerine; streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve heparin ilaçları inhibisyon etkisi gösterirken sodyum ampisilin, magnezyum sülfat ve dipiron sodyum'un etki etmediği görülmüştür. HCA-I'in hidrataz aktivitesi üzerinde; heparin ve sodyum ampisilin'in inhibisyon, gentamisin sülfat ve dipiron sodyum'un aktivasyon etkisi gösterdiği, streptomisin sülfat ve magnezyum sülfat'ın ise hiçbir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. HCA-II'nin hidrataz aktivitesi üzerine ise magnezyum sülfat ve sodyum ampisilin'in inhibisyon, gentamisin sülfat ve dipiron sodyum ilaçlarının aktivasyon etkisi gösterdiği, streptomisin sülfat ve heparin'in ise hiçbir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek I_{50} değerleri bulunmuştur.

SUMMARY

Effects of some drugs were investigated on carbonic anhydrase isozymes purified from human erythrocytes.

Firstly, erythrocyte carbonic anhydrase isozymes (HCA-I and HCA-II) were separately purified by affinity chromatography. In this study, it was taken advantage of hydratase and esterase activities for determining of carbonic anhydrase activities.

In this thesis, effects of six drugs were studied on carbonic anhydrase isozymes. It was observed on HCA-I esterase activity that streptomycin sulfate, gentamicin sulfate and heparin show inhibition effect and sodium ampicillin, magnezyum sulfate and dipyrone sodium don't show any effect. It was observed on HCA-I hydratase activity that heparin, sodium ampicillin show inhibition effect, gentamicin and dipyrone sodium show activation effect, and streptomycin sulfate and magnezyum sulfate don't show any effect. It was observed on HCA-II hydratase activity that magnezyum sulfate and sodium ampicillin show inhibition effect, gentamicin sulfate and dipyrone sodium show activation effect, and streptomycin sulfate and heparin don't show any effect. I_{50} values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs shown inhibition effects.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak yürüttüğüm bu çalışma 1996-1998 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr .Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU yönetiminde Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Deneysel çalışmalarım ve tezin yazımı boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na en derin minnet ve şükranlarımı ifade etmek isterim.

Çalışmanın deneysel safhalarında büyük yardımlarını gördüğüm Yrd.Doç.Dr.Barbaros NALBANTOĞLU, Yrd.Doç.Dr.Hasan ÖZDEMİR, Dr.Mehmet ÇİFTÇİ ve diğer bölüm elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca deneylerde kullandığım ilaçların temininde yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Prof.Dr. Mehmet GÜNDOĞDU ve Sayın Yrd.Doç.Dr.Mahmut BAŞOĞLU'na içten teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 1998

Arş.Gör. Şükrü BEYDEMİR

KISALTMALAR

ACD	: Asit-sitrat dekstroz
CA	: Karbonik anhidraz enzimi
E.C.	: Enzim kod numarası
E.U.	: Enzim ünitesi
EI	: Enzim-inhibitör kompleksi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
ESI	: Enzim-substrat inhibitör kompleksi
HCA-I	: İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
HCA-II	: İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	: İnhibitör
i.m.	: Adele içine
i.v.	: Damar içine
OD	: Optik dansite
PER	: Amonyum persülfat
rpm	: Devir/dakika
S	: Substrat
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: N,N,N',N', -tetrametil etilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
V	: Enzimatik reaksiyon hızı

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	iv
1.GİRİŞ	1
2.MATERYAL VE METODLAR	13
2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
2.2.Yararlanılan Alet ve Cihazlar	13
2.3.Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	14
2.4.Yöntemler	16
2.4.1.Protein Tayini	16
2.4.1.a.Kalitatif Protein Tayini	16
2.4.1.b.Coomassie-Blue Yöntemi ile Protein Tayini	16
2.4.2.Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	17
2.4.2.a.CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi Tayini	17
2.4.2.b.Esteraz Aktivitesi Tayini	18
2.4.3.İnsan Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması	19
2.4.3.a.Sepharose-4B Matriksi Üzerinde Afinite Jelinin Hazırlanışı	19
2.4.3.b.İnsan Eritrositlerinden Hazırlanan Hemolizatın Afinite Kolonuna Uygulanması, Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Elüsyonu	20
2.4.3.c.SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile İzoenzimlerin Saflığının Kontrolü	22
2.4.4.Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerinde Bazı İlaçların Etkilerinin İncelenmesi	23
2.4.4.a.Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon ve Aktivasyon Gösteren İlaçların Etkilerinin İncelenmesi	23

	<u>Sayfa</u>
2.4.4.b.Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Gösteren İlaçların Etkilerinin İncelenmesi	24
3.DENEY SONUÇLARI	26
3.1.İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	26
3.2.Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	27
3.3.İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	28
3.4.Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon ve Aktivasyon Etkisi Gösteren İlaçlarla İlgili Sonuçlar	29
3.5.Karbonik Anhidraz II İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon ve Aktivasyon Etkisi Gösteren İlaçlarla İlgili Sonuçlar	34
3.6.Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren İlaçlarla İlgili Sonuçlar	39
4.TARTIŞMA	44
5.KAYNAKÇA	50

1.GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiç bir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak % 100'lük bir verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubunu teşkil ederler. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı adı verilen bir değerle ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda 1mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısına eşittir. Turnover sayısı en yüksek olan enzim 600.000 s^{-1} ile karbonik anhidrazdır.^{1,2,3}

Enzimlerin bazı bileşikler tarafından hem in vivo hem de in vitro aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bir çok ilaçlar ve zehirli bileşikler fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibisyon olayından aynı zamanda enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de faydalanılır.²

Enzimatik inhibisyon başlıca 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 nakledilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna bir örnektir. Bu gazlardan diizopropilflorofosfat, enzimin aktif bölgesinde yer alan serin amino asidiyle reaksiyona girerek, inaktif diizopropilfosfo-enzim oluşturur.²

Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılacak maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

- i) Yarışmalı (kompetitiv) inhibisyon
- ii) Yarışmasız (nonkompetitiv) inhibisyon
- iii) Yarı yarışmalı (unkompetitiv) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitiv) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla 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.

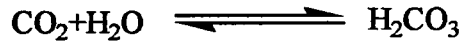
Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitiv) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir.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

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitiv) 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 var olacağından yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla ES kompleksi ortamdaki sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür.^{4,5}

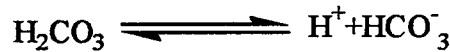
Yarışmasız (nonkompetitiv) inhibisyonun özel bir türü olan lineer karışık tip inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda E, S ve I' nın bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır.⁴

Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde, sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzimler adı verilir. Bu olaya da feed-back inhibisyonu denir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Homotropik allosterik enzimlerde substrat bizzat pozitif modülatör olarak etki yapar. Heterotropik allosterik enzimlerde, enzim substrattan 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.⁶

Karbonik anhidraz enzimi (CA) (E.C.4.2.1.1., karbonat hidroliyaz) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir.⁷ Bu enzim canlılarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir. Katalizlenen asıl reaksiyon



olmasına rağmen burada oluşan H_2CO_3 kendiliğinden



şeklinde H^+ ve bikarbonat iyonlarına ayrışır. Karbondioksit gazının su içinden geçirilmesiyle pH'nın düşmesi yukarıdaki reaksiyonların sağ yöne yürüdüğünü, bikarbonat çözeltisine asit ilave edildiğinde CO_2 kabarcıklarının oluşması yukarıdaki reaksiyonların sol tarafa doğru yürüdüğünü göstermektedir. Aynı olaylar hayvanların solunumunda da meydana gelmektedir. Dokularda metabolizma artışı olarak teşekkül

eden CO_2 , önce HCO_3^- 'a çevrilerek akciğerlere taşınır. Alveollerde ise hemoglobinin bıraktığı H^+ ile birleşerek H_2CO_3 'ı ardından tekrar CO_2 'i oluşturur ve CO_2 de gaz halinde nefesle dışarı atılır.

Yapılan çalışmalarda fizyolog ve biyokimyacılar, CO_2 alış-veriş hızının yukarıdaki hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarının kendiliğinden oluşum hızından çok daha fazla olduğunu gördüler.⁸ Bu olaylarda, kanda mevcut olan bir enzimin rol alabileceği şüpheleri, Raughton ve Meldrumun insan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimini bulmalarıyla sona erdi.⁹ Bir kaç yıl sonra başka dokular içerisinde ve başka canlılarda da karbonik anhidraz varlığı ortaya çıkarıldı.^{10,11,12}

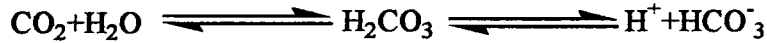
Ayrıca balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri belirlenmiştir. CA sözü geçen canlı hücrelerin çoğunda sitoplazmada çözünmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunmaktadır.¹³

Bitki kloroplastlarındaki CA enziminin rolü henüz tam olarak aydınlatılmamakla beraber, fotosentez olayının Calvin siklüsünde önemli bir görevi olduğu tahmin edilmektedir. Nitekim CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan asetazolamidin (5-asetamido-1,3,4-tiyadiazol-2-sulfonamid) aynı zamanda fotosentez olayını da inhibe etmesi bu tahmini desteklemektedir.¹⁴ CA'nın dağılımı ve omurgalılarındaki bilinen veya muhtemel fizyolojik rolleri Maren ve Carter tarafından geniş olarak anlatılmıştır.^{15,16}

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu yukarıda söz edildiği gibi doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO_2 'i H_2CO_3 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3 'ü CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır. Böbrek tübüllerinde ise aynı reaksiyonlarla, Na^+ ve H_2O geri emilimini sağlamaktadır. Diğer dokularda da yine yukarıda anlatılan reaksiyonla ya CO_2 transferini, ya da H^+ iyonunun birikimini temin ederek, hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Nitekim omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon bikarbonat tampon sistemidir.^{17,18,19} Son yıllarda yapılan çalışmalarda

sulfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, mitokondriyal CA enziminin (CA-IV), sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olması ile açıklanabilir. Yine iskelet kasında CA, laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.²⁰ Son olarak karbonik anhidrazın CO_2 , HCO_3^- ve H_2O arasındaki dönüşümleri gerçekleştirmesi ile bir çok dokularda hayati öneme sahip olduğunu söylemek mümkündür.

Karbonik anhidraz enziminin canlı organizmalarda bilinen en önemli reaksiyonu



şeklinde. Yaklaşık 30 yıldan beri memeli eritrositlerinde bu reaksiyonu farklı aktivitelerle yürüten iki izoenzim varlığı bilinmektedir. HCA-I ve HCA-II şeklinde gösterilen iki izoenzimden HCA-I düşük aktivitelidir. HCA-I'e göre çok daha yüksek aktiviteye sahip olan HCA-II ise miktar olarak HCA-I'in yaklaşık altıda biri kadardır. HCA-I ve HCA-II, diğer izoenzimlere göre daha yaygın bulunur. Sitokimyasal, radioimmunoassay, roket immünoelektroforezi tekniklerinin kullanılmasıyla böbrek, beyin mukoza, pankreas, retina ve lenste varlığı belirlenmiştir.¹⁶

1976 yılına kadar farklı genlerce şifrelenen iki CA izoenziminin varlığı biliniyordu. Daha sonra memeli kaslarında CA aktivitesine sahip olan başka bir izoenzim daha bulundu (CA-III). Kas CA'sının aktivitesi HCA-I aktivitesinin yalnızca %5'i kadar olup, molekül ağırlığı diğer iki izoenzime çok yakındır. CA-III izoenzimine çok az miktarlarda eritrositlerde de rastlanmıştır. Ayrıca diğer bir izoenzim de, büyükbaş hayvanların akciğer membranında ve böbrek tübüllerinin membranlarında bulunmuştur. Bu yeni izoenzimin membran yüzeyinde gördüğü fonksiyon kesin olarak bilinmemektedir. CA-IV olarak gösterilen bu izoenzime membrana bağlı CA'da denilmektedir.^{13,15} Yapılan çalışmalar, CA-IV'ün erişkin kişilerin dokularının büyük bir bölümünde ve bazı fetal dokularda bulunduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda, CA-V belirli dokuların mitokondrilerinde, CA-VI tükürük bezlerinde ve CA-VII ise sitozolde bulunan CA izoenzimleridir.²¹

Bütün bilinen karbonik anhidraz enzimlerinin aktif bölgelerinde, ligant bağlarla bağlanmış ve aktivite için mutlak gerekli olan bir Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir OH^- grubu bulunmaktadır. İkinci olarak, aktif bölge yakınlarındaki amino asitler, proton verici ve proton gradiyenti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir. Zn^{+2} iyonunun uzaklaştırılması ile elde edilen apokarbonik anhidraz (apo CA), hiçbir aktivite göstermemektedir.^{20,22,23}

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları 30000, bitki kloroplastlarından elde edilen hekzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise yaklaşık 180.000 dalton olduğu görülmüştür.^{20,24} Bunun yanısıra, insan böbreğinde hücre zarına bağlı ve molekül ağırlıkları 66.000 civarında olan CA izoenzimlerine de rastlanmıştır.¹³

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanamamaktadır. Eritrosit izoenzimleri için izoelektrik pH, insanda 7.4 ve 5.7, atda 10.0 ve 6.0. sığırdan 5.2, domuzda 7.3 ve 5.2 köpek balığında ise 4.5 olarak literatüre geçmiştir.^{25,26} Amino asit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA'ları, yüksek oranda prolin, asidik ve bazik amino asitler ve az miktarda kükürtlü amino asitler ihtiva etmektedir. Bitki CA'ları ise bunlara nispeten daha yüksek seviyede sistein taşımaktadırlar.^{23,24,27}

Karbonik anhidraz enziminin CO_2 , HCO_3^- ve H_2O arasındaki reaksiyonları katalizlemenin yanısıra asetaldehit ve benzer bileşiklerin hidratasyonu ve çeşitli esterlerin de hidrolizini katalizledikleri görülmüştür. Enzimin "esteraz" aktivitesini ortaya koyan bu son özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir.^{28,29,30} CA izoenzimlerinin en güçlü inhibitörleri sülfonamidlerdir.³¹ Bu bileşiklerin özelliklerinin keşfedilmesinden sonra ilaçlarda kullanılan daha etkili sülfonamid türevi inhibitörler sentezlenmiştir. Asetazolamid ve etoksolamid bunlara örnektir. Tek değerlikli anyonların da inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuş ve sığır CA'sı ile yapılan esteraz aktivitesi deneylerinde artan etkinliğe göre F^- , Cl^- , CH_3COO^- , NO_3^- , HSO_3^- , ClO_4^- , I^- , N_3^- , SCN^- , CNO^- , HS^- , CN^- anyonlarının p-nitrofenil asetat hidrolizini inhibe ettikleri görülmüştür. Ayrıca insan eritrosit enzimlerinin de, CO_2 hidratasyon reaksiyonlarında Pb^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Cu^{+2} ağır metal iyonları tarafından inhibe edildiği bulunmuştur.^{23,32,34}

Karbonik anhidrazın aktivitesi, enzimin CO_2 'yi hidrasyonu HCO_3^- dehidrasyonu ve bazı esterleri hidrolizleme özelliklerinden yararlanılarak belirlenmektedir. Yukardaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortama göre CO_2 gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H^+ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO_2 gazı, kantitatif olarak manometrik yolla tespit edilebilir. Fakat manometrik yöntemin, reaksiyon pH'sının değişken olması, CO_2 'nin suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi sakıncaları vardır.³⁵ Yine belirli bir pH düşmesi veya yükselmesi için geçen süre, potansiyometrik yolla veya indikatörle tespit edilebilir. Bu yöntem kısa zaman alması gibi avantajlı bir tarafı olmasına rağmen, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO_2 'nin sınırlı çözünmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır.^{35,36,37,38} Bu sakıncaları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı durdurulmuş- akış reaksiyonu (rapid stopped-flow reaction) gibi yöntemler, enzimin K_M ve V_{max} parametrelerinin bulunmasında kullanılmaktadır.²⁶

Enzimin esteraz (ester hidrolizleme) aktivitesi p-nitrofenil asetatın hidrolizi sırasında açığa çıkan p-nitrofenol miktarının, 348 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümüyle tayin edilmektedir.^{26,39} CO_2 hidrataz aktivitesi daha çok kromatografi işlemlerinde, toplanan eluatlardaki aktiviteyi ölçmekte kullanılır.

Bu tez kapsamında insan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri araştırılan ilaçlar ve özellikleri aşağıda özetlenmiştir;

1.Streptomisin sülfat: İlk bulunan aminoglikozid türevidir. *Streptomyces griseus*'tan elde edilir. Gram-negatif enterik basillere karşı etkinliği daha sonra bulunan aminoglikozidlere göre düşüktür.

Tüberküloz tedavisinde kullanılır. Ripampin ve etambutol gibi oral yoldan alınan yeni ilaçların çıkmasıyla bu kullanılış yerinde önemini kısmen kaybetmiştir. Tüberküloz menenjit olgularında kullanılır. Diğer kemoterapötiklerle (genellikle tetrasiklinlerle)

birlikte bruselloz, veba ve tularemi gibi infeksiyonlarda kullanılır. *E.coli*'ye bağı idrar yolu infeksiyonlarında kullanılabilir. Bu endikasyonda idrarın pH'sının 8'in üstüne çıkarılması etkinliği artırır. Bu amaçla üç saatte bir 500 mg sodyum bikarbonat veya aynı miktar sodyum sitrat ağızdan verilir. Antipsödomonal etkisi zayıftır; antipsödomonal bir aminoglikozid sayılmaz.

Tüberküloz dışında kalan infeksiyonlarda günde 15-25 mg/kg dozunda i.m. kullanılır. Bu doz ikiye bölünerek 12 saatte bir uygulanır. İlk 7-10 günlük uygulamadan sonra günlük doz 1 g'a düşürülür. Çocuklarda ve bebeklerde günlük doz 20-40 mg/kg'dır.

Ototoksik etkisi (özellikle denge üzerinde) belirgindir. Nefrotoksik etkisi diğer aminoglikozidlere oranla zayıftır.⁴⁰

2.Gentamisin sülfat: Micromonospora purpurea'dan elde edilir. Gerçekte yapıca birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün karışımından ibarettir. Kitlesine göre, streptomisin, kanamisin ve amikasin'den güçlüdür. Aminoglikozid ilaçlar içinde spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olanıdır. Bakterisid etki yapar. Özellikle Enterobacteriaceae grubu (*E.coli*, *Klebsiella*, *Aerobacter* vb.) bakteriler ile *Pseudomonas aeruginosa* gibi gram-negatif basiller ve penisiline ve metisiline-dayanıklı Staph, aureus suşları üzerinde etkilidir. Antipsödomonal penisilinlerle kombine edildiğinde, *Proteus* türleri ve *Pseudomonas* üzerinde, sinerjizma nedeniyle daha güçlü etkinlik gösterir. Sayılan bakterilerin hepsi in vitro koşullarda gentamisinin 6 µg/ml'den daha düşük konsantrasyonları ile inhibe edilirler. Bu konsantrasyon serumda, bir kezlik mutad doz olan i.m. 1.5 mg/kg gentamisin ile elde edilir. Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz.

Kanda yaklaşık % 10 oranında alyuvarlara bağlanır; bu nedenle anemik hastalarda kandaki serbest gentamisin konsantrasyonu biraz daha yüksek olur. Vücutta biyotransformasyona uğramadan böbreklerden itrah edilir ve idrarda serumdakinden 10-100 kez daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Gentamisin'in en önemli

indikasyonu, aerobik gram-negatif basillere (özellikle *Pseudomonas* ve *Proteus*'lara) bağlı sistemik infeksiyonlardır.⁴⁰

3. Sodyum ampisilin: Hem ağızdan ve hem de parenteral uygulanabilen bir penisilin türüdür. *Haemophilus influénzae*, *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus mirabilis* gibi gram-negatif basillerin suşlarının çoğuna karşı bakterisid etkinlik gösterir. Ancak, sayılan gram-negatif basillerden son yıllarda meydana gelen rezistans artması nedeniyle ampisilin'in terapötik üstünlüğü azalmaktadır. Avrupa ülkelerinde izole edilen *E.coli* suşlarının tümü üzerinden yaklaşık % 40' ının ampisilin'e rezistan olduğu bulunmuştur.

Ampisilin mide-barsak kanalından kısmen (ortalama % 40) absorbe edilir; absorpsiyonu besinler tarafından önemli ölçüde azaltılmaz. Oral uygulandığında doruk plazma konsantrasyonuna yaklaşık 2 saatte erişilir; bu konsantrasyon nadiren 3 µg/ml'i geçer. Halbuki i.m. enjeksiyonla verildiğinde doruk konsantrasyona 1 saatte erişilir; düzey daha yüksek olur ve daha uzun sürer. Ciddi infeksiyonlarda yüksek dozda ve parenteral (genellikle i.v.) verilmesi gerekir. Plazma proteinlerine çok az (ortalama % 20) bağlanır. Absorbe edilen dozun yaklaşık yarısı böbreklerden (glomerüler filtrasyon ve tübüler salgılanma suretiyle) atılır; 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. Tübüler salgılanmasını inhibe eden probenesid adlı ilaç ampisilin'in böbrekten itrahını bloke eder, kandaki konsantrasyonunu yükseltir ve uzatır. Bundan ampisilinle gonore tedavisinde yararlanılır. Ampisilin'in yarılanma ömrü 0,5-1 saattir.

Ampisilin'in menenjit tedavisinde yüksek dozda (günde 400 mg/kg) ve i.v. kullanılması tavsiye edilmektedir.

Yukarıda sayılan bakterilere bağlı idrar yolu infeksiyonlarında bakteremi varsa, ampisilin'in gene yüksek dozda (genellikle günde 6-12 g) ve i.v. kullanılması tavsiye edilir. Bu endikasyonda ampisilin uygulaması, bebeklerde ve gebelerde özel toksik etkisi olan tetrasiklinlere tercih edilebilir.

Ampisilin'in tavsiye edilen dozu genelde infeksiyonun ciddiliğine göre 50-400 mg/kg'dır; dörde bölünerek 6 saatte bir verilir. Bu aralıkta doz yükseltildiği takdirde ampisilin ağızdan değil, parenteral (tercihen i.v.) kullanılmalıdır.

Ampisilin'in sık görülen özel bir yan tesiri infeksiyöz mononükleozlu hastalarda ve kronik lenfatik lösemi, böbrek yetmezliği ve hiperürisemi olgularında ve allopurinol adlı üresemiye düşürücü ilaç alanlarda sık olarak ciltte makulopapüler döküntü oluşturmaktadır.⁴⁰

4.Heparin: Sığırların akciğerlerinden ve domuzların ince barsak mukozasından ekstraksiyon ve saflaştırma suretiyle elde edilen, lineer zincir yapısında kompleks bir sülfatlanmış polisakkarid ve özel bir terimle glukozaminoglikan'dır. Hayvanlar aleminde mast hücreleri ve bazofil lökositlerin içindeki salgı granüllerinde bir proteine kovalent bağlanmış olarak bulunur; bunun fonksiyonel önemi belli değildir ve sistematik mastositozis'li hastalar hariç plazmada farkedilebilir bir miktarda bulunmaz. Mast hücrelerinin salgıladığı heparin ilaç olarak kullanılanlara göre daha büyük moleküldür (60.000-10.0000 dalton). Vücutta heparin benzeri başka glukozaminoglikanlar bulunur; bunlar çeşitli hücrelerin dış yüzüne ve mezaşimal dokuların matriksine yerleşmiş olan heparan sülfattır. Bu maddeler doğal olarak antikoagülant etkinlik göstermezler, fakat böyle bir potansiyele sahiptirler.

İlaç olarak hazırlanan heparin, ekstraksiyon sırasında glukozaminoglikan zincirlerinin kırılması sonucu oluşan 5000 ile 30000 dalton arasında değişen (ortalama 12000 kadar) heparin fragmentlerinin heterojen bir karışımıdır. Molekülünde sülfat gruplarının yoğun olarak bulunuşu nedeniyle, heparin güçlü bir anyonik maddedir ve vücutta oluşan en asidik madde olarak nitelendirilebilir. Bu özelliğinden dolayı heparin katyonik nitelikteki ilaçlarla veya protein ve diğer maddelerle kolayca birleşip kompleks yapabilir. Vücutta heparan sülfattan ve dermatan sülfattan başka yapıca heparine benzeyen kondroitinler ve heparitinler gibi, çok sayıda sülfat grupları içeren heparinoid polisakkaridler de bulunur.⁴⁰

5.Magnezyum sülfat: Hipomagnezeminin tedavisi için tavsiye edilen dozlar kliniklere göre değişiklik gösterir; optimal doz üzerinde fikir birliği yoktur. Magnezyum tedavisi başlatılmadan önce magnezyum, % 50'lik $MgSO_4$ solüsyonu şeklinde parenteral verilir. Doz şemalarından birine göre, birinci gün 48 mmol Mg eşdeğeri solüsyon i.m. injekte edilir, daha sonraki 4 gün günde 17-25 mmol injekte edilir. Eğer hasta ağır ve konvülsiyon gelişmişse, 16 mmol Mg i.v. verilerek yükleme yapılır ve aynı gün daha sonra 48 mmol i.v. verilerek uygulama sürdürülür. Daha sonraki 4 gün, günde bölünmüş dozlar halinde 25 mmol i.v. Mg verilir; hastaya i.v. sıvı uygulaması yapılıyorsa $MgSO_4$ solüsyonu ona ilave edilebilir.

Hipomagnezemili hasta ağır değilse, eksiklik ağız yolundan magnezyum bileşikleri verilerek düzeltilebilir. Bu durumda magnezyum düzeyinin normale dönmesi yavaş olur ve haftalar alır. Oral replasyon için magnezyum laktat veya magnezyum bileşiği içeren bir antasid müstahzar kullanılır. Genellikle günde 15 mmol Mg eşdeğeri bileşik kullanılır. Bu dozdaki oral Mg bileşiği genellikle belirgin bir diyare yapmaz. Eksiklik fazlaysa oral replasman tavsiye edilmez. Çünkü ağızdan verilmesi gereken fazla magnezyum tuzu ishal yapar.

Magnezyum sülfat injeksiyonuna eklampsi, lokal beyin ödemi ve tetanus gibi nedenlere bağlı olan konvülsiyon hallerinde de başvurulabilir. Bronşiyal astma nöbetini de düzeltebilir. Mutad antiaritmik ilaçlara cevap vermeyen rekurrent ventrikül fibrilasyonu durumunda i.v. magnezyum sülfat injeksiyonu veya infüzyonu iyi sonuç verebilir.⁴⁰

6. Dipiron sodyum: Aminopirin'in 4-metilaminometansülfonat sodyum türevidir. Suda kolay çözünür; bu nedenle injeksiyonluk preparat yapılmaya elverişlidir (1 kısmı 1.5 kısım suda çözünür). Ağızdan alındığında mide suyu içinde non-enzimatik olarak ve hızlı bir şekilde aktif metaboliti olan **4-metilaminoantipirin (4-MAA)**'ya dönüşür ve o şekilde mide-barsak kanalından absorbe edilir. İntravenöz verildiğinde kanda hemen bu metabolite dönüşür. Mide-barsak kanalından absorpsiyon oranı % 85 dolayındadır. 4-MAA karaciğerde 4-formilaminoantipirin ve 4-aminoantipirin'e dönüştürülür; son metaboliti N-asetilasyona uğrar. 4-MAA'nın eliminasyon yarılanma ömrü 2.6-3.5 saat kadardır. Metabolitlerin büyük kısmı böbreklerden itrah edilir. Bazen böbrekte rubazon

asidi metabolitlerinin oluşmasından dolayı idrarı kırmızıya boyar. Dipiron, farmakolojik yönden, yan tesirleri dahil, aminopirine benzer. Analjezik etkinliği aspirininkinden yüksektir. Bazı incelemelerde meperidininkine eşit bulunmuştur. Antispazmodik etki potansiyeli vardır.

Dipiron sodyum yarım yüzyıldan fazla bir zamandır kullanılan bir ilaç olmasına rağmen farmakolojik özellikleri, güncel kavramlar bağlamında ancak son zamanlarda incelenmeye başlanılmıştır.

Ağızdan bir kezde 500-1000 mg verilir. Günde 5 g'a kadar verilebilir. % 50'lik injeksiyonluk çözeltileri 1.2 ve 5 ml'lik ampüller halinde bulunur. 0.5-2.5 gram dozunda intramüsküler injekte edilir. İntravenöz yoldan yavaş olarak injekte edilirse de bu yoldan kullanılması seyrek de olsa anafilaktik şoka neden olduğu için pek tavsiye edilmez; gerekirse i.v. yoldan 1 g'ı aşmayan dozda yavaş injekte edilerek verilebilir. Uzun süre kullanılırsa kan hücrelerinin sayısı periyodik olarak izlenmelidir.⁴⁰

Yukarıda da anlatıldığı gibi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiş olan karbonik anhidraz canlılarda CO₂'in hidratasyonu ve HCO₃⁻'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir. Yani solunum olayında büyük bir role sahiptir. Bu çalışmada karbonik anhidraz enziminin iki izoenzimi olan HCA-I ve HCA-II'nin insan eritrositlerinden ayrı ayrı saflaştırılması ve değişik tedavi amacıyla kullanılan bazı ilaçların bu izoenzimler üzerine in vitro etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca bu ilaçlardan inhibisyon etkisi gösterenlerin % aktivite-[I] grafikleri yardımıyla I₅₀ değerlerinin (% 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu) bulunması ve aktivasyon gösterenlerin de grafikler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonunda söz konusu ilaçların karbonik anhidraz izoenzimlerini hangi konsantrasyonlarda etkilediği bulunacak ve bu sonuçlar hekimlerin dikkatine sunulacaktır.

2.MATERYAL VE METODLAR

2.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan, Sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, standart serum albümin, N,N,N',N'- tetrametil etilen diamin (TEMED), diyaliz torbası, L-tirozin Sigma Chemical Comp'den, triklor asetik asit (TCA), sodyum karbonat, trihidroksimetilamino metan (Tris), siyanojen bromür, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, metanol, aseton, etanol, kloroform, sodyum nitrat, sülfürik asit, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coommassie brillant blue G-250 ve R-250 E.Merck AG'den; streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, heparin, sodyum ampisilin, magnezyum sülfat, dipiron sodyum, sodyum hidroksit, CO₂ gazı piyasadan sağlanmıştır.

2.2.Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj: IEC Clinical centrifuge USA

Soğutmalı santrifüj: Heraeus sepatech suprafuge-22

Spektrofotometre: Pharmacia LKB-Biochrom, ULTROSPEC-III

pH metre: Perkin-Elmer, Coleman 28 C Metrion IV pH meter

Elektroforez tankı: Hoefer, HSI

Fraksiyon toplayıcısı: Fraction collector, Eldex

Peristaltik pompa: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Model K-55: GE, Sci, İnd, İnc.

Hassas terazi: Mettler Ha 51 Gallenkamp

Kromatografi kolonu: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (İsveç)

Kronometre: Hanhard, Elektronische Digital-stoppuhr /Germany)

Otomatik pipetler: Fischer

Magnetik karıştırıcı :İka Combimag RCO.

Çalkalayıcı :GFL

2.3.Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

1. 0,05 M Tris-SO₄ pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon): 6,055 g (0.05 mol) Tris, 950 ml destile suda çözüldü. 1N H₂SO₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi . Daha sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı
2. 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g (0,02 mol) NaHCO₃, 950 ml destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
3. 0,15 M Na₂CO₃/ 0,1 M NaHCO₃, pH=10 (CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) 15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4 g (0,1 mol) NaHCO₃'ın 1 litre destile suda çözülmesi ile hazırlandı.
4. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄, pH=8,7 (Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye tamamlandı.
5. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 ml destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye tamamlandı.
6. 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH=6,3 (Kolona tutunmuş HCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye destile su ile tamamlandı.
7. 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄, pH=5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g NaClO₄ ve 2,09 g 0,15 mol

$\text{NaCH}_3\text{COO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, 120 ml destile su içerisinde çözüldü. 1N HCl ile pH'sı 5,6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 150 ml'ye tamamlandı.

8. SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponu: 0,65 ml 1 M Tris-HCl (pH=6,8), 3 ml % 0,1'lik SDS ve 1 ml % 100'lük gliserin, 1 ml % 0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacmin saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µl numune tamponunda 50 µl olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.

9. SDS-Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 ml suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 ml % 0,1'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

10. İndikatör çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,2184 g NaHCO_3 'ün 1 litre saf suda çözülmesi ile hazırlandı.

11. CO_2 çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO_2 gazı geçirilerek hazırlandı.

12. Coomassie brilliant blue G-250 renk 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 edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

13. Boyama çözeltisi (jelin 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.

14. Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti): % 10 asetik asit olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

15. Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): % 50 izopropanol, % 10 TCA, % 40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

16. İlaç stok çözeltileri

Streptomycin sülfat	: 1g	2 ml çözücüsünde çözüldü
Gentamisin sülfat	: 80 mg	2 ml çözücüsünde çözüldü
Sodyum ampisilin	: 1 g	3 ml çözücüsünde çözüldü
Heparin	: 192.3 mg	5 ml çözücüsünde çözüldü
Magnezyum sülfat	: 730 mg	10 ml çözücüsünde çözüldü
Dipiron sodyum	: 1 g	2 ml çözücüsünde çözüldü

17. % 0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01N NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

2.4.Yöntemler

2.4.1.Protein Tayini

2.4.1.a.Kalitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sonunda fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbens göstermesi esasına dayanmaktadır.⁴¹ Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak absorbensları spektrofotometrede köre karşı okundu.

2.4.1.b.Coomassie Blue Yöntemi ile Protein Tayini

Bu yöntemle afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları belirlendi. Bu yöntem, coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm de maksimum absorbens gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.⁴²

Tayin işlemleri şöyle yapıldı. 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 alındı. Saf su ile tüm

tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. 5 ml coomassie reaktifi tüplere ilave edildi ve vortex ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

2.4.2.Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

2.4.2.a.CO₂-Hidrataz Aktivitesi Tayini

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması sırasında, aktivite ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Bu yöntem CA'nın saflaştırılması sırasında hemen hemen bütün araştırmacılar tarafından uygulanmıştır.

Kullanılan yöntem Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntemin yine Maren tarafından modifiye edilmiş şeklidir. Prensip olarak CO₂'nin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'nın 10'dan 7,4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır. Burada indikatör olarak pH=7,4'de renk değişimi gösteren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na₂CO₃+0,1 M NaHCO₃) yararlanıldı.⁴³

Deney şöyle gerçekleştirilmiştir: Reaksiyon tüpüne önce 0,1 ml indikatör, 0,5 ml H₂O, 0,1 ml enzim ve 2,5 ml doymun CO₂ çözeltileri konuldu. Aynı anda 1 ml karbonat tamponu katılarak kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (tc). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0,1 ml saf su konularak yapıldı (to). İlaçlı çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılıp ilaın hacmi değiştirilerek aktivite tayinleri yapıldı. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu.

Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Yani;

$$EU=(t_o-t_c)/t_c$$

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplanır.⁴³

2.4.2.b.Esteraz Aktivitesi Tayini

İlaçların CA-I izoenzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması 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 ikisinde aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir.^{44,45} Bu dalga boyunda p-nitrofenilasetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemleri için şu prosedür uygulandı: Kuvartz kuvetlere 1 ml substrat, 1,4 ml tampon, 0,5 ml H_2O , 0,1 ml enzim konulmasından 3 dakika sonra 25°C de 348 nm'de absorbansı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 ml tampon konularak karışımını 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitrofenil asetatin absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İlaçlı çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak ilacın hacmi değiştirilip aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitrofenil asetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 ml aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişliğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi.⁴⁴ Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris- SO_4 (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı.⁴⁶

2.4.3.İnsan Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması

2.4.3.a.Sepharose-4B Matritsi Üzerinde Afinite Jelinin Hazırlanışı

Afinite jeli, Sepharose-4B matritsi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendirildi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır.⁴⁷

Sepharose-4B'in aktifleştirilmesi ve tirozin takılması: 20 ml Sepharose-4B, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4,0 g toz halinde getirilmiş CNBr'nin hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 11'e çıkarıldı ve reaksiyon boyunca bu pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım hemen bir buchner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 ml soğuk NaHCO₃ tamponu (pH=10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edildi ve karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagele karıştırma, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandı. Bundan sonra süspansiyon, 4 °C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat 4 °C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde jel yıkama suyu 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Böylece raksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 ml 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 ml'si içine alındı.^{48,49,50,51}

Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0°C daki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid, 40 ml Sepharose-4B -L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH, 1M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabit tutuldu . 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve 200 ml 0,05M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla

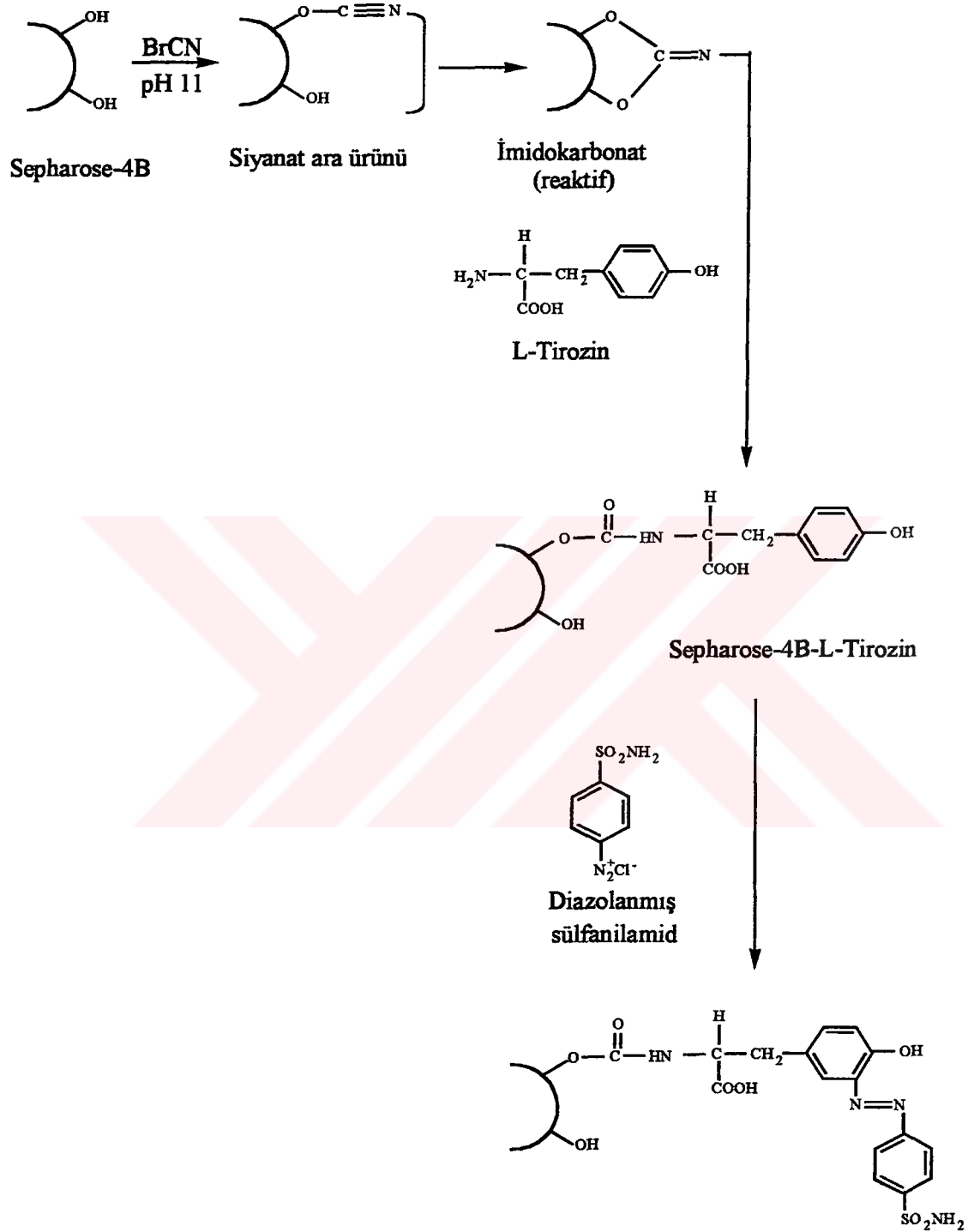
yıkandı. Yıkandıktan sonra da bu tampon içinde muhafaza edildi.^{51,53} Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 2.1 gösterilmiştir.

2.4.3.b.İnsan Eritrositlerinden Hazırlanan Hemolizatların Afinite Kolonuna Uygulanması, Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Elüsyonu

İnsan kanından hemolizat eldesi şu prosedüre göre yapılmıştır. Önce araştırma hastanesinin kan bankasından EDTA'lı torbalarda kan alındı. Eritrositleri ayırmak için kan 10 ml'lik 4 tüpe konuldu ve 15 dakika santrifüj edildi. Tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakaları damlalıkla dikkatli bir şekilde ayrıldı. Daha sonra eritrositler %0,9 NaCl çözeltisi ile iki defa yıkandı. Bu işlemler sonucu 100 ml kandan 40-50 ml eritrosit elde edildi. Eritrositler hacimlerinin 1,5 misli 0°C deki destile suyla kuvvetli bir şekilde çalkalanarak hemoliz edildi.⁵² Hemolizat 4 °C'de 10.000 rpm'de yarım saat süreyle santrifüj edilerek eritrosit zarları uzaklaştırıldı.

İnsan kanından hemolizat elde edildikten sonra 2.4.2.a'da anlatıldığı gibi hidrataz aktivitesi deneyleri yapıldı. Elde edilen hemolizat 300 ml olarak hazırlandı ve bu hazırlanan hemolizatların 1 ml'si 10 ml'ye seyreltilip ve bundan da 100 µl alınarak aktiviteye bakıldı. Bulunan absorbans değerleri µmol/mlxdak cinsinden hesaplandı.

2.4.3.a'da hazırlanan afinite jeli, insan kanından elde edilen hemolizattan karbonik anhidraz izoenzimlerinin ayrı ayrı saflaştırılmasında kullanıldı. Bu amaçla önce 1,3 cm²x60 cm boyutlarında bir kolona jel paketlenerek 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄ (pH=8,7) çözeltisi ile dengelendi. Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan hemolizatın pH'sı katı Tris'le 8,7'ye getirildi ve daha sonra kolona tatbik edildi. Kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/25 mM Na₂SO₄ (pH=8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidrazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. İzoenzimleri ayırmak için 25 mM Na₂HPO₄ /1 M NaCl, pH=6,3 çözeltisi ile kolona tutunmuş HCA-I izoenziminin elüsyonu 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄, pH=5,6 çözeltisiyle de afinite jeline adsorbe olan HCA-II'nin elüsyonu yapıldı. Elüsyonlar fraksiyon toplayıcısı ile 5'er ml halinde toplandı ve akış hızı 20 ml/saat'a ayarlandı. Bütün bu işlemler 15-20°C civarındaki sıcaklıkta gerçekleştirildi.⁵⁰



Afinite Jeli

Şekil 2.1. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için sentezlenen afinite jelinin toplu reaksiyonları.

Elüatlarda 280 nm'de kalitatif protein tayini ve CO₂-hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek, coomassie blue yöntemiyle toplam protein miktarı ve esteraz aktivitesi belirlendi. Daha sonra hemolizat ve saf enzim çözeltisi için spesifik aktiviteler ayrı ayrı belirlenerek yüzde saflaşma hesaplandı. Saflaştırılan enzim çözeltileri önce suya karşı 12 saat ve daha sonra 0,05M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltisine karşı 4-5 saat diyaliz edildi.

2.4.3.c. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi ile İzoenzimlerin Saflığının Kontrolü

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra %3-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroföresi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından anlatıldığı gibi yapılarak saflaştırılan izoenzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.⁵²

Bunun için elektroföres plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine yerleştirildi ve kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözünmüş daha sonra 40-50 °C' ye soğutulmuş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımıyla ilave edildi. Hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşınca kadar yaklaşık yarım saat bekletildi. Katılaştıktan sonra üsteki SDS döküldü. Daha sonra yığma jeli yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroföres tankına yerleştirildi. Oluşan kuyular işaretlenerek, jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroföres 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 nümune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkube edildi. Numuneler soğutulularak, jeldeki kuyulara ince bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo, (anot) üstten (-) kablo (katod) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5

saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yürütme tamponu, tekrar kullanılmak üzere özel kabına alındı. Jel sabitleştirme çözeltisinde (% 50 izopropanol+%10 TCA+% 40 saf su) 30-40 dakika bekletildi. Daha sonra fikse çözeltinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli zaman periyotlarında değiştirilme suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Mavi renge boyanan renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 ml % 30'luk akrilamid -% 0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml % 0,1'lik SDS, 0,4 ml % 5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml % 1,5'luk amonyum persülfat $[(NH_4)_2S_2O_8]$ (PER)] ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığma jeli hazırlanması sırasında; 1 M'lık Tris-HCl (pH=6,8)'den 1,24 ml, % 30'luk akrilamid- % 0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, % 0,1'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.

2.4.4. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerinde Bazı İlaçların Etkilerinin İncelenmesi

2.4.4.a. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon ve Aktivasyon Gösteren İlaçların Etkilerinin İncelenmesi

İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, heparin, magnezyum sülfat, dipiron sodyum ilaçlarının etkilerinin var olup olmadığı mümkün olan en yüksek ilaç konsantrasyonunda bir ön deneyle araştırıldı. Daha sonra insan kanından elde edilen

eritrositlerden saflaştırılan HCA-I ve HCA-II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek I_{50} değerleri hesaplandı. Aktivasyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] değerleri tablolar ve grafikler halinde verildi. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 ml).

2.4.4.b. Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Gösteren İlaçların Etkilerinin İncelenmesi

İnsan eritrosit karbonik anhidraz I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, magnezyum sülfat ve dipiron sodyum ilaçlarının etkilerinin olup olmadığı mümkün olan en yüksek ilaç konsantrasyonunda bir ön deneyle araştırıldı. Daha sonra inhibisyon gösteren ilaçlar için insan kanından elde edilen eritrositlerden saflaştırılan HCA-I izoenzimi için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir ilaç için % aktivite-[I] grafikleri çizildi ve I_{50} değerleri hesaplandı. Bu grafiklerde [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 ml).

Bütün esteraz aktivitesi deneylerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 3 mM, aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3 ml olduğundan ve 1 ml substrat çözeltisi kullanıldığından ortamdaki substrat konsantrasyonu 1 mM'dır. Aktivite birimi şöyle hesaplandı: 348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti (ϵ) $5,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, p-nitrofenil asetatın ise $0,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan, 348 nm'de ölçülen absorbans değerinin 5'e bölünmesi ile ortamdaki p-nitrofenol (+p-nitrofenolat) iyonu konsantrasyonunu verir.^{44,45}

$$\text{p-Nitrofenol miktarı} = A(\text{O. D}) / 5 \times 10^3 \text{ M}$$

$$\text{p-Nitrofenol miktarı} = A(\text{O. D}) / 5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre 1 dakikada oluşan p-nitrofenol miktarını bulmak için 3'e bölünür. Toplam hacim 3 ml olduğundan

$$\text{p-Nitrofenol miktarı} = \frac{[A(O\cdot D)/5]}{3} \times 3 = \frac{A(O\cdot D)}{5} \mu \text{ mol/dak}$$

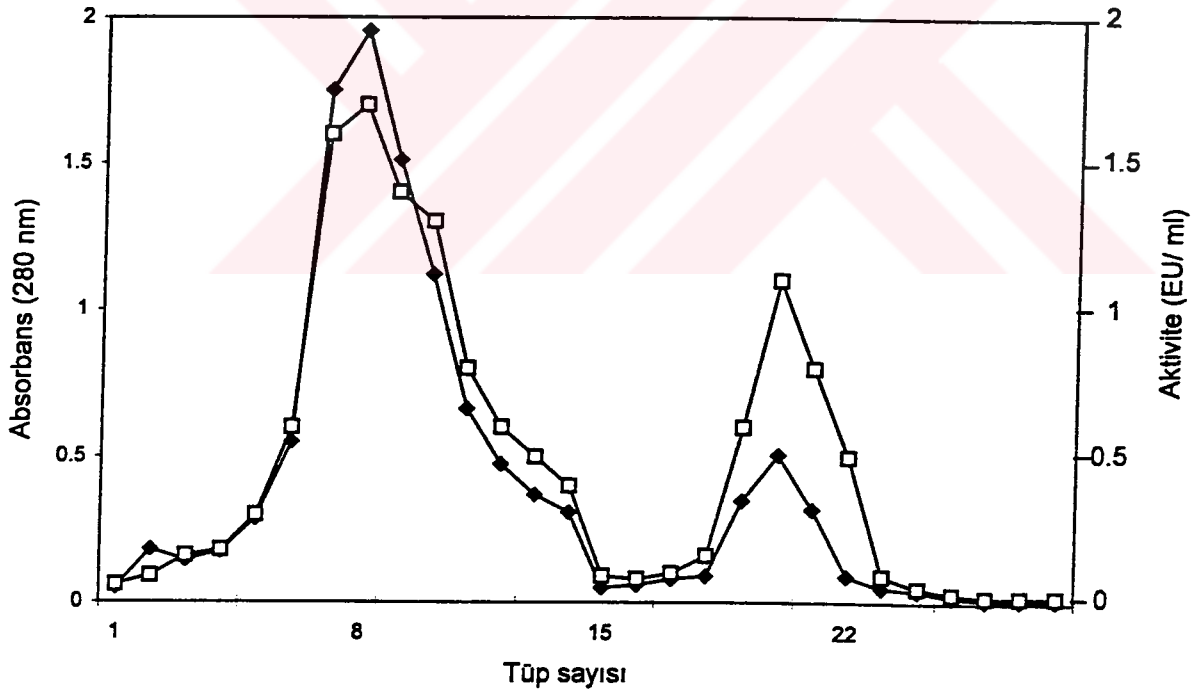
bulunur.



3.DENEY SONUÇLARI

3.1.İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

İnsan eritrositlerinden HCA-I ve HCA-II izoenzimleri saflaştırılması ayrı ayrı yapıldı. Elde edilen hemolizatlar kolona direkt olarak tatbik edildi. Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işleminden sonra HCA-I, 1 M NaCl/ 25 mM Na₂HPO₄ pH=6,3 tamponuyla; HCA-II ise 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ pH=5,6 tamponuyla elüe edildi. Elüatlar 5 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki nümune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 3.1'de gösterildi



Şekil 3.1. İnsan eritrositlerinden elde edilen HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin sırasıyla 1 M NaCl/ 25 mM Na₂HPO₄ pH=6,3 ve 0,1M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ pH=5,6 tamponlarıyla elüsyonu; (■) 280 nm 'de absorbans, (□) Wilbur-Anderson birimiyle aktivite. Kolon 1,3 cm²x60 cm, jel yüksekliği 40 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.

İnsan hemolizati ve bunlardan saflaştırılan izoenzimler için coomassie-blue yöntemiyle protein tayini ve esteraz aktivitesi yapıldı. İzoenzimlerin aktivite ölçümü 1 mM substrat konsantrasyonunda ve 200 µl enzim çözeltisi ile yapılmıştır. Protein tayinleri ise 100 µl enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Hemolizatlarda ise aktivite ve protein miktarı ölçümünde her bir hemolizattan 1 ml alınıp 10 ml'ye seyreltilmiş ve bundan 100 µl alınarak hidrataz aktivitesi ölçümü yapılmıştır.

Mililitre hemolizat için protein miktarı 136 mg/ml ve hidrataz aktivitesi için 1396 EU/ml olarak bulundu. Buradan hemolizat için

spesifik aktivite ise (S.A)=1396/136 = 10,26 olarak hesaplandı.

Saflaştırma sonucunda HCA-I için 7-11, HCA-II için 18-21 nolu tüplerdeki eluatlar birleştirilerek coomassie-blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi deneyi yapıldı. Protein miktarları HCA-I için 0,71 mg/ml, HCA-II için 0,10 mg/ml iken hidrataz aktivitesi HCA-I için 36,8 A.B/ml, HCA-II için 26,1 A.B/ml olarak bulundu. Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 200 kat seyreltme yapıldığından HCA-I için aktivite birimi 7360, HCA-II için 5220 olarak bulundu. Buna göre;

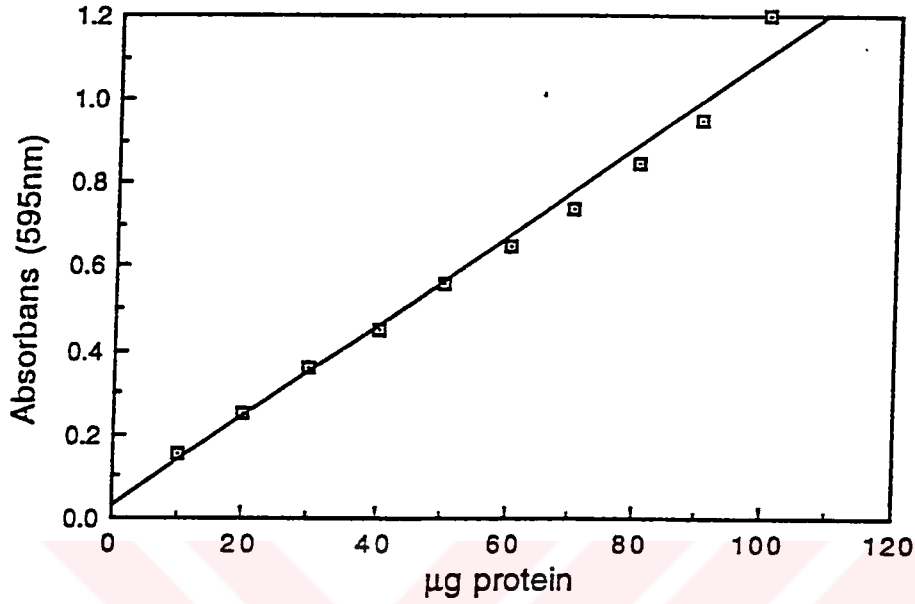
$$\text{HCA-I için spesifik aktivite (S.A)} = \frac{7360}{0,71} = 10366$$

$$\text{HCA-II için spesifik aktivite (S.A)} = \frac{5220}{0,10} = 52200 \text{ olarak bulundu}$$

Bu değerlere göre hemolizatin doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu HCA-I 10366/10,26=1010 kat, HCA-II 52200/10,26=5087 kat saflaştırılmış oldu.

3.2.Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde coomassie blue yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için önce standart bir eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Coomassie-blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.

3.3.İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Afinite kolonundan saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi yapıldı. Bunun için 2.4.3.c'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine insandan saflaştırılan izoenzimleri tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 3.3).



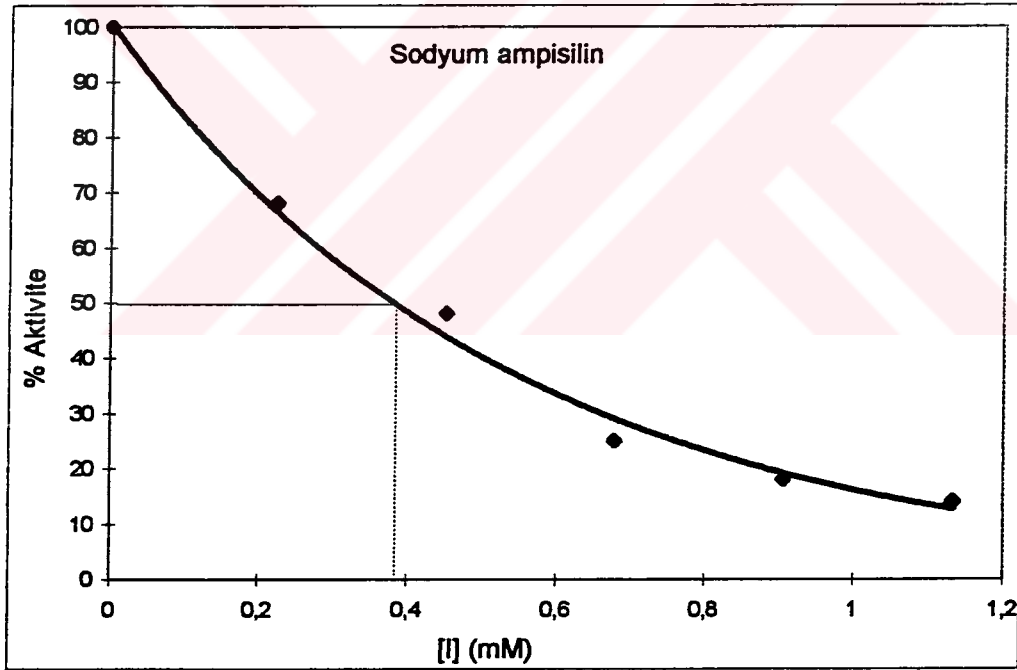
Şekil 3.3 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı. 1-4. kanallar CA-I, 5-8. kanallar CA-II

3.4. Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon ve Aktivasyon Etkisi Gösteren İlaçlarla İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit HCA-I izoenzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite değerleri Tablo 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4’de gösterilmiştir. Bu ilaçlardan sodyum ampicilin ve heparin, HCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterirken gentamisin sülfat ve dipiron sodyum ilaçları aktivasyon etkisi göstermiştir, bununla birlikte streptomisin ve magnezyum sülfat ilaçları da hiçbir etki göstermemiştir. Tablo 3.1 ve 3.2’deki değerler kullanılarak inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.4-3.5). Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (I_{50} değerleri) hesaplanmıştır. Aynı şekilde aktivasyona sebep olan ilaçlar için de Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’deki değerler kullanılarak % aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7). Son olarak Tablo 3.5’de ilaçların etkileri özetlenmiştir.

Tablo 3.1. CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine sodyum ampisilin ilacının etkisinin sonuçları.

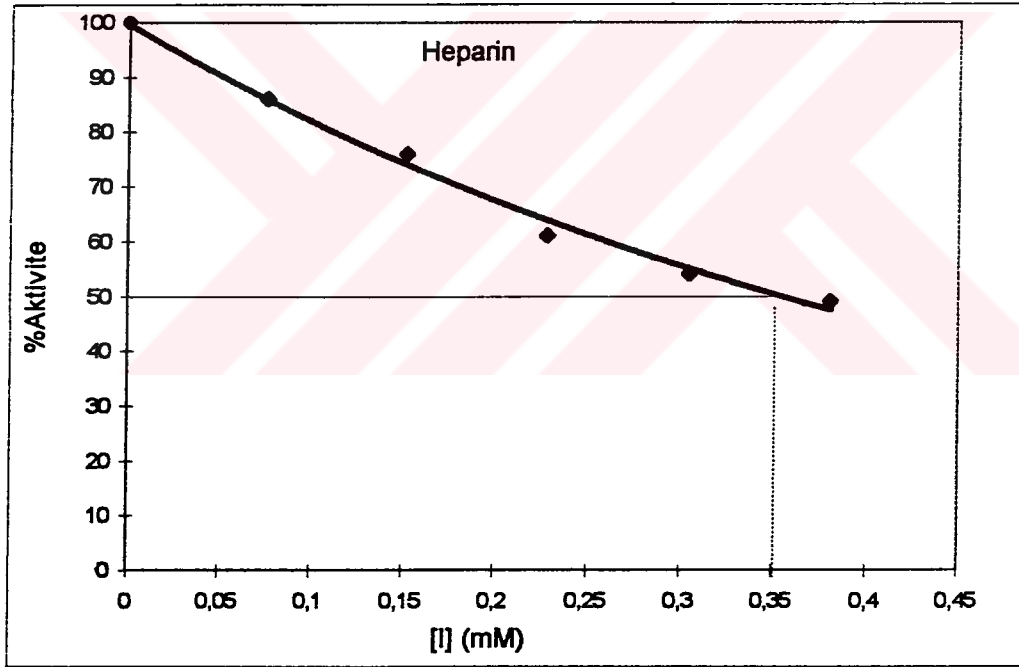
[I] mM	% Aktivite
0	100
0.227	68
0.454	48
0.681	25
0.908	18
1.135	14



Şekil 3.4. CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi için sodyum ampisilin ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.2.CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine heparin ilacının etkisinin sonuçları.

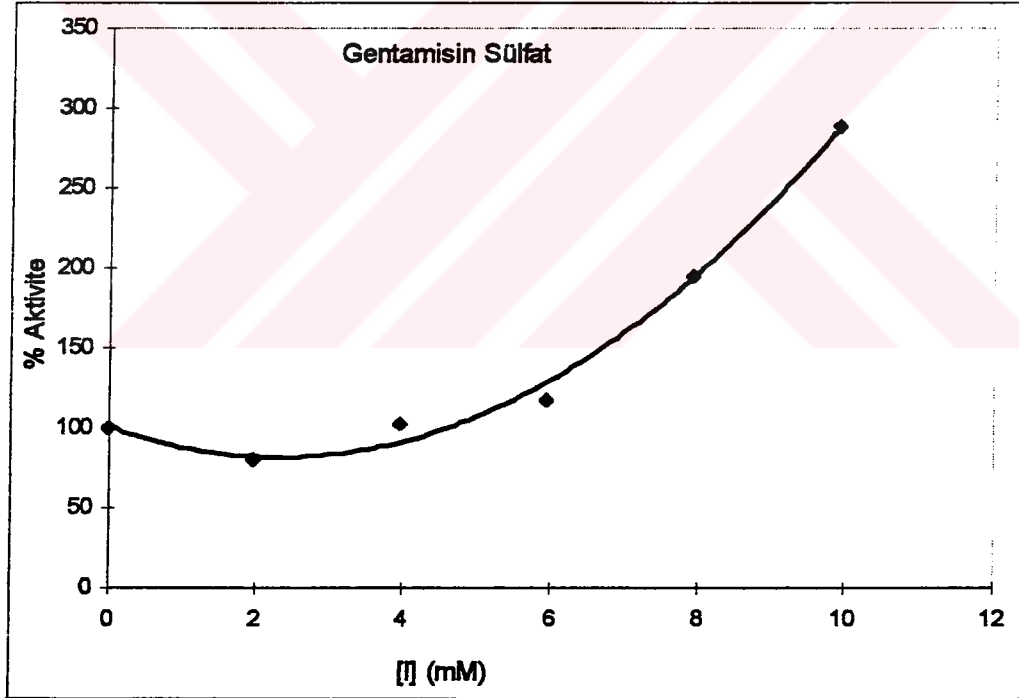
[I] mM	% Aktivite
0	100
0.0762	86
0.1524	76
0.2286	61
0.3048	54
0.381	49



Şekil 3.5. CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi için heparin ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.3.CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine gentamisin sülfat ilacının etkisinin sonuçları.

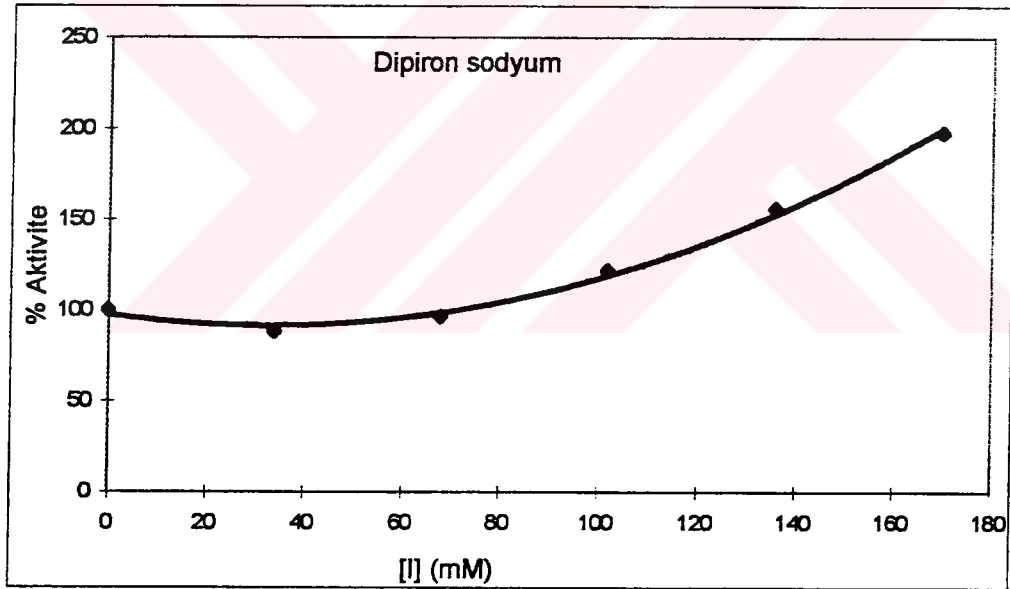
[I] mM	% Aktivite
0	100
1.98	80
3.96	103
5.94	117
7.92	195
9.90	289



Şekil 3.6. CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi için gentamisin sülfat ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği

Tablo 3.4.CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine dipiron sodyum ilacının etkisinin sonuçları.

[I] mM	% Aktivite
0	100
34.0	88
68.0	96
102	122
136	156
170	198



Şekil 3.7.CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi için dipiron sodyum ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.5. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçların etkileri ve ilaçların % aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen I_{50} değerleri.

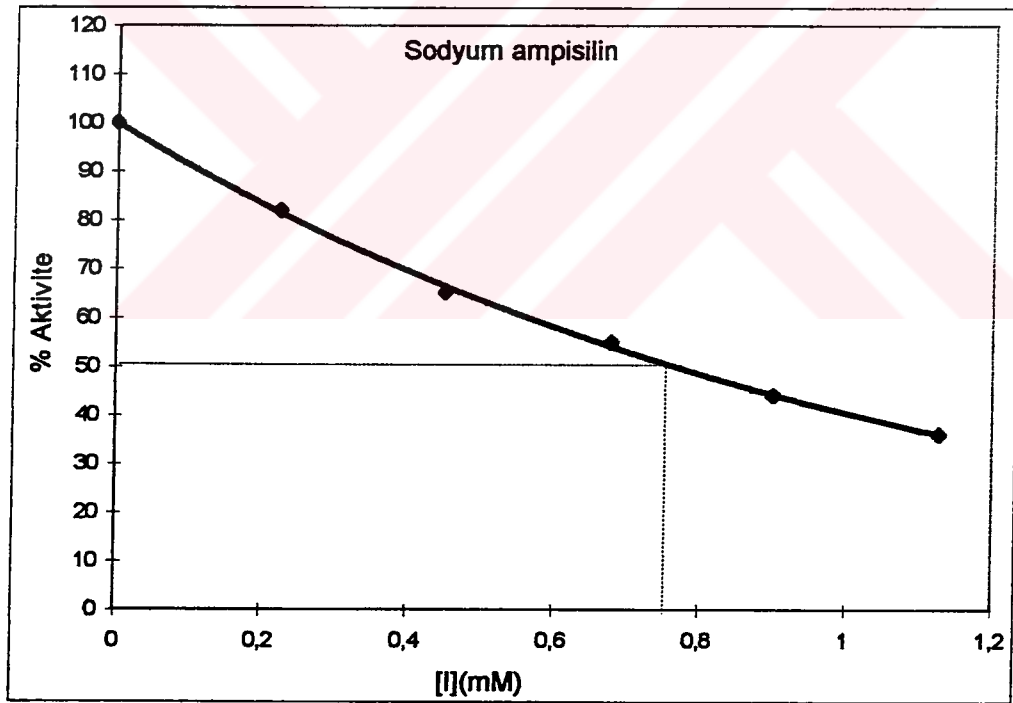
İlaç Adı	İlacın Etki Tarzı
Sodyum ampisilin	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=0,385$ mM
Heparin	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=0,350$ mM
Gentamisin sülfat	Aktivasyon gösterdi
Dipiron sodyum	Aktivasyon gösterdi
Streptomisin sülfat	Hiçbir etki göstermedi
Magnezyum sülfat	Hiçbir etki göstermedi

3.5. Karbonik Anhidraz II İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon ve Aktivasyon Etkisi Gösteren İlaçlarla İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit HCA-II izoenzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite değerleri, Tablo 3.6, 3.7, 3.8 ve 3.9’da gösterilmiştir. Bu ilaçlardan sodyum ampisilin ve magnezyum sülfat HCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterirken gentamisin sülfat ve dipiron sodyum ilaçları aktivasyon etkisi göstermiştir, bununla birlikte streptomisin sülfat ve heparin ilaçlarında hiçbir etki göstermemiştir. Tablo 3.6 ve 3.7’deki değerler kullanılarak inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.8 ve 3.9). Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (I_{50} değerleri) hesaplanmıştır. Aynı şekilde aktivasyona sebep olan ilaçlar için de Tablo 3.8 ve 3.9’daki değerler kullanılarak % aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11). Son olarak Tablo 3.10’de ilaçların etkileri özetlenmiştir.

Tablo 3.6.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine sodyum ampisilin ilacının etkisinin sonuçları.

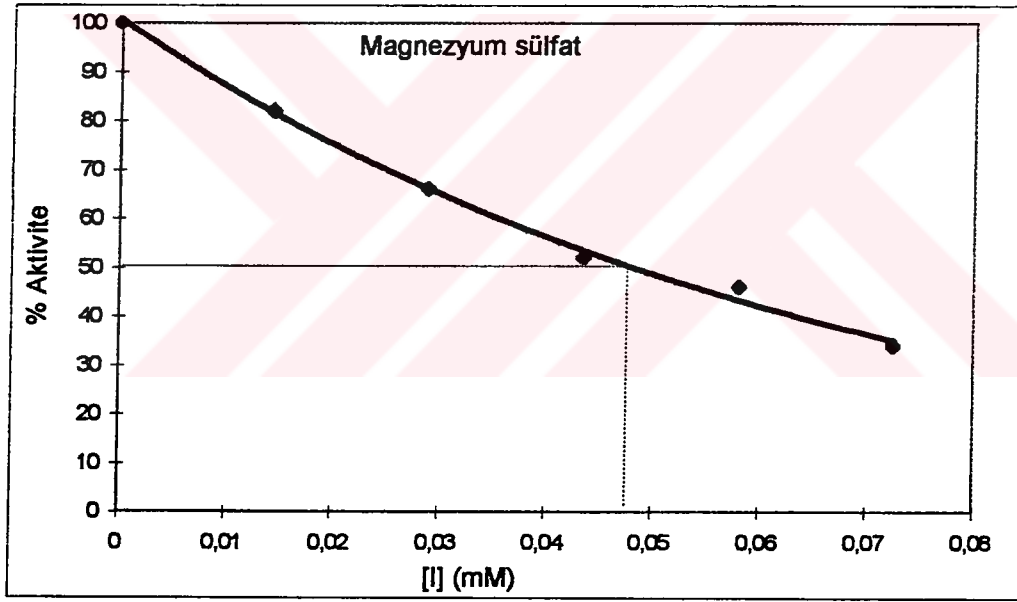
[I] mM	% Aktivite
0	100
0.226	82
0.452	65
0.680	55
0.904	44
1.130	36



Şekil 3.8.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi için sodyum ampisilin ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.7.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine magnezyum sülfat ilacının etkisinin sonuçları.

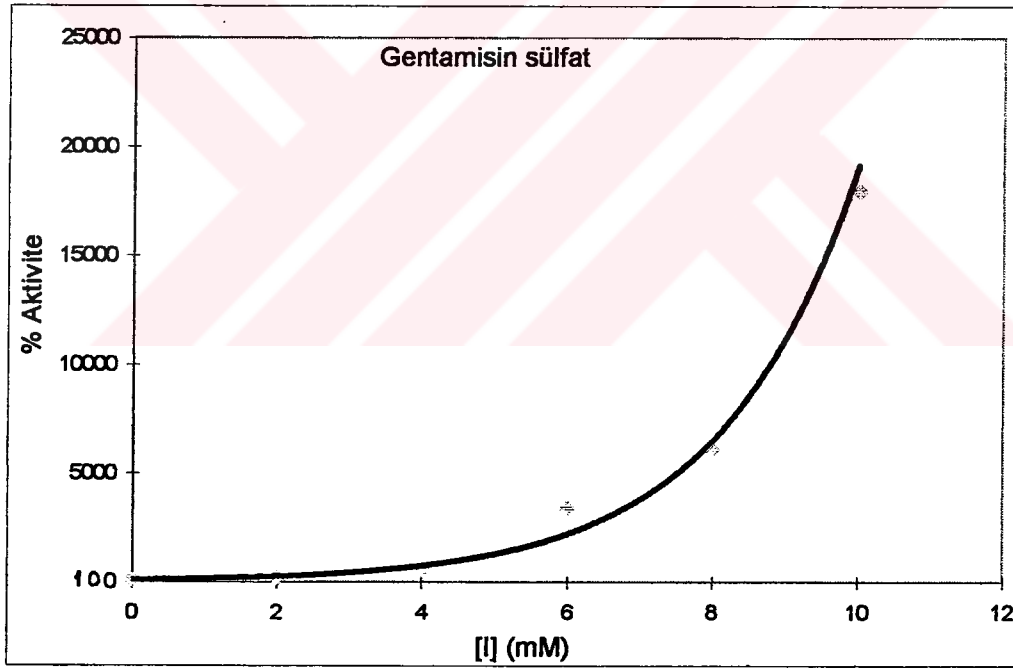
[I] mM	% Aktivite
0	100
0.0145	82
0.0290	66
0.0436	52
0.0581	46
0.0726	34



Şekil 3.9.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi için magnezyum sülfat ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.8.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine gentamisin sülfat ilacının etkisinin sonuçları.

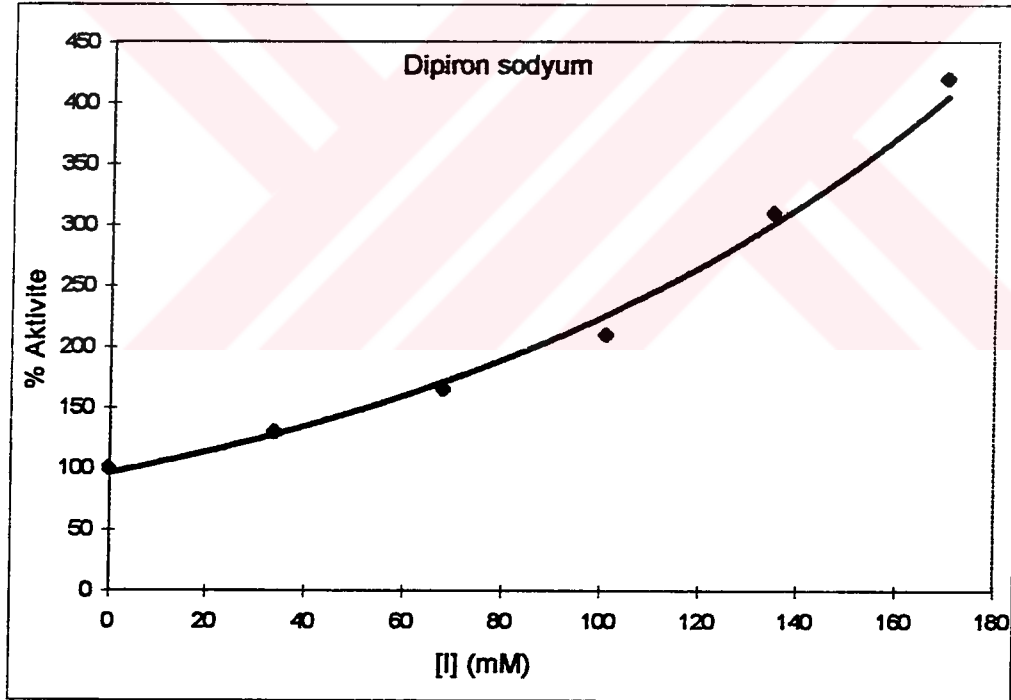
[I] mM	% Aktivite
0	100
2	218
4	575
6	3400
8	6125
10	17969



Şekil 3.10 CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi için gentamisin sülfat ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.9.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine dipiron sodyum ilacının etkisinin sonuçları.

[I] mM	% Aktivite
0	100
34	130
68	165
101	210
335	310
170	420



Şekil 3.11.CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi için dipiron sodyum ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.10. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde ilaçların etkileri ve ilaçların % aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen I_{50} değerleri.

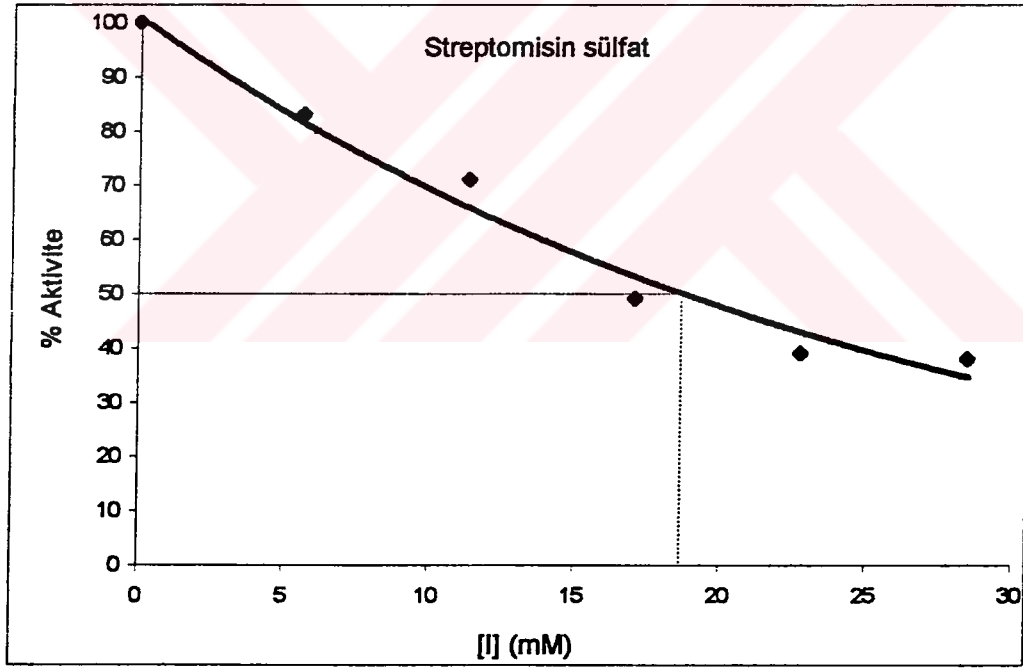
İlaç Adı	İlaçların Etki Tarzı
Sodyum ampisilin	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=0,774$ mM
Magnezyum sülfat	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=0,048$ mM
Gentamisin sülfat	Aktivasyon gösterdi
Dipiron sodyum	Aktivasyon gösterdi
Streptomisin sülfat	Hiçbir etki göstermedi
Heparin	Hiçbir etki göstermedi

3.6. Karbonik Anhidraz I İzoenziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren İlaçlarla İlgili Sonuçlar

Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit HCA-I izoenzimi için 5 farklı ilaç konsantrasyonunda elde edilen % aktivite değerleri Tablo 3.11,3.12 ve 3.13’de gösterilmiştir. Bu ilaçlardan streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve heparin HCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir, bununla birlikte sodyum ampisilin, magnezyum sülfat ve dipiron sodyum ilaçlarında hiçbir etki göstermemiştir. Tablo 3.11 ve 3.12 ve 3.13’deki değerler kullanılarak inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.12, 3.13 ve 3.14). Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (I_{50} değerleri) hesaplanmıştır. Son olarak Tablo 3.14’de ilaçların etkisi özetlenmiştir.

Tablo 3.11.CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine streptomisin sülfat ilacının etkisinin sonuçları.

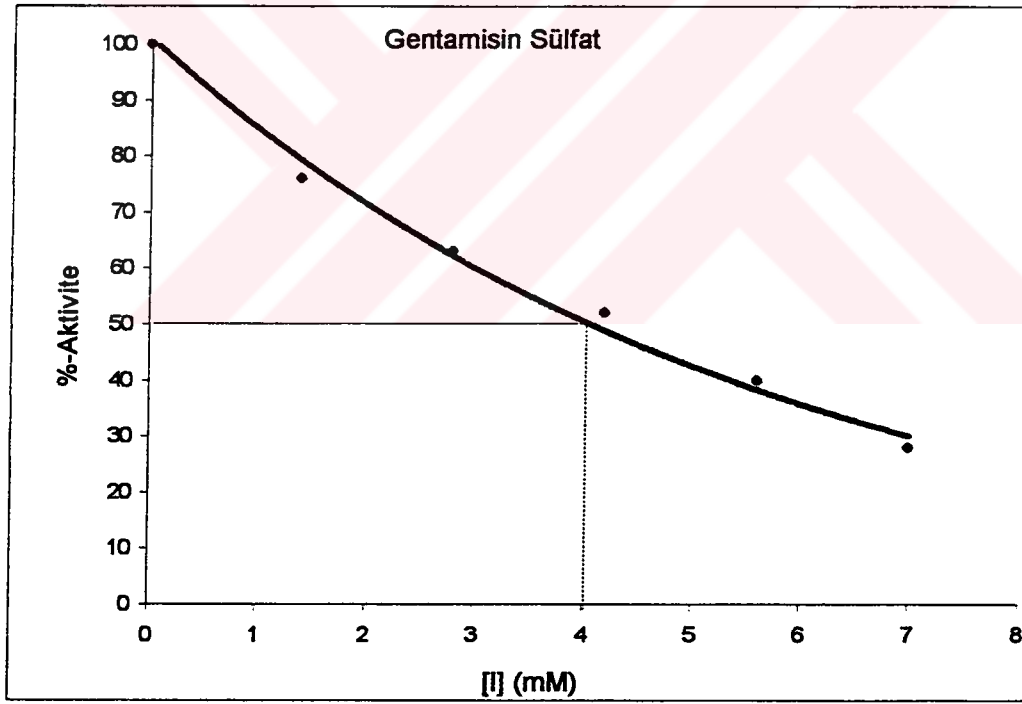
[I] mM	% Aktivite
0	100
5.7	83
11.4	71
17.1	49
22.8	39
28.5	38



Şekil 3.12.CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi için streptomisin sülfat ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.12. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine gentamisin sülfat ilacının etkisinin sonuçları.

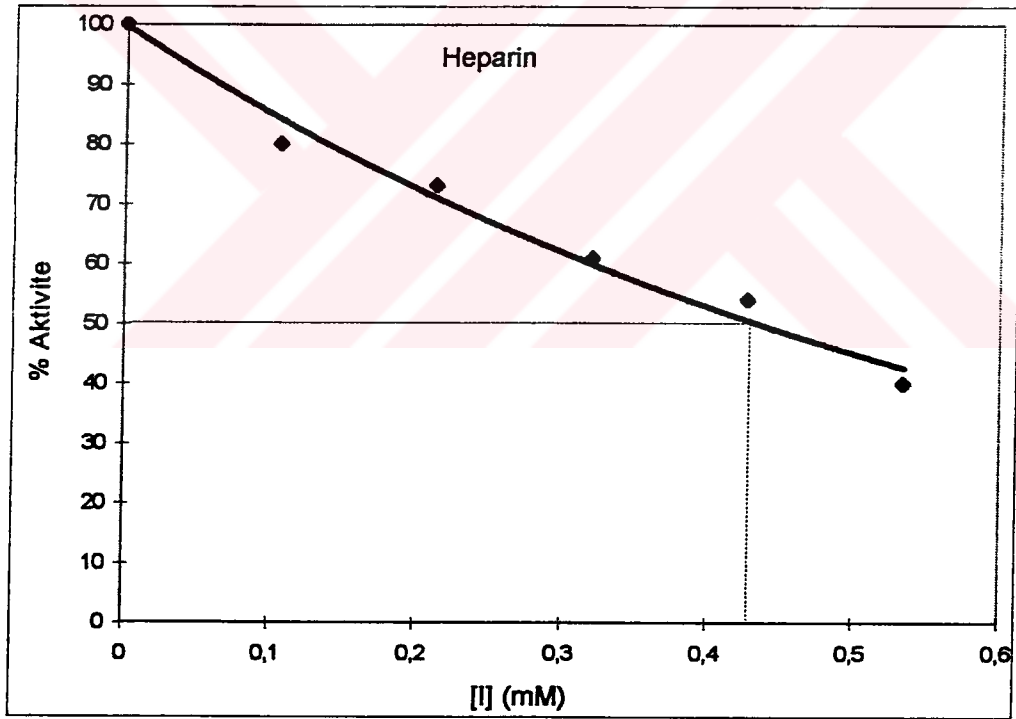
[I] mM	% Aktivite
0	100
1.4	76
2.8	63
4.2	52
5.6	40
7.0	28



Şekil 3.13.CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi için gentamisin sülfat ilacı kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.13.CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine heparin ilacının etkisinin sonuçları.

[I] mM	% Aktivite
0	100
0.107	80
0.214	73
0.321	61
0.428	54
0.535	40



Şekil 3.14.CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi için heparin ilacının kullanılarak 5 farklı ilaç konsantrasyonunda % aktivite-[I] grafiği.

Tablo 3.14. İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde ilaçların etkileri ve ilaçların % aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen I_{50} değerleri.

İlaç Adı	İlaçların Etki Tarzı
Streptomisin sülfat	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=18,875$ mM
Gentamisin sülfat	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=4$ mM
Heparin	İnhibisyon gösterdi $I_{50}=0,437$ mM
Sodyum ampisilin	Hiçbir etki göstermedi
Magnezyum sülfat	Hiçbir etki göstermedi
Dipiron sodyum	Hiçbir etki göstermedi

3.7.Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerinde İlaçlarla Yapılan Çalışmaların Toplu Sonuçları

Karbonik anhidraz I izoenziminin esteraz ve hidrataz aktiviteleri ile karbonik anhidraz II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerinde streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, heparin, magnezyum sülfat ve dipiron sodyum ilaçlarıyla yapılan çalışmaların toplu sonuçları Tablo 3.15’de gösterilmiştir.

Tablo 3.15.İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CAI ve II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerinde ilaçlarla yapılan çalışmaların toplu sonuçları.

HCAI			HCAII
	Hidrataz	Esteraz	Hidrataz
Streptomisin sülfat	Etki göstermedi	18,875 mM	Etki göstermedi
Gentamisin sülfat	Aktivasyon gösterdi	4 mM	Aktivasyon gösterdi
Sodyum ampisilin	0,385 mM	0,437 mM	0,774 mM
Heparin	0,350 mM	Etki göstermedi	Etki göstermedi
Magnezyum sülfat	Etki göstermedi	Etki göstermedi	0,048 mM
Dipiron sodyum	Aktivasyon gösterdi	Etki göstermedi	Aktivasyon gösterdi

4.TARTIŞMA

Karbonik anhidraz enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir.⁷ Bu enzim canlılarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen ve solunumda büyük rolü olan bir enzimdir. Bu çalışmada insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I ve HCA-II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırılarak tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan bazı ilaçların bu izoenzimler üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışma sonuçları tartışılmadan önce kullanılan metodların seçiliş sebepleri şöyle izah edilebilir:

Karbonik anhidraz izoenzimleri saflaştırılırken genel olarak iki basamak kullanıldı; hemolizatin hazırlanması ve afinite kromatografisi işlemi. Aynı gün alınan kandan hazırlanan hemolizatin afinite kromatografisine uygulanmasından sonra elde edilen elüatlardaki protein muhtevaları 280 nm’de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılmış olan kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır.⁴¹ Saflaştırılan enzim çözeltisinde mg mertebesinde elde edilen enzim çözeltileri içindeki protein miktarları, hassasiyeti diğer metodlara göre çok daha iyi olup, daha az zaman alıcı ve daha az reaktif gerektiren bir yöntem olan coomassie-blue yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntemin önemli bir özelliği de her çalışma için ayrı bir standart eğri gerektirmemesidir.⁴²

HCA-I ve HCA-II’nin aktivite tayinleri iki farklı yöntemle yapılmıştır. Birincisi; Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi olarak bilinen CO₂-hidrataz aktivitesidir.⁴³ Bu yöntemle CO₂’nin H₂O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃’ün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak ortamın pH’sını değiştirme süresi ölçülmektedir. Kromatografi işlemlerinde elüatlardaki nisbi aktivite artış ve azalışlarını belirlemede hemen hemen tüm araştırmacılar tarafından kullanılan bu yöntem, kromatografi işlemleri sırasında elde edilen elüatlardaki enzim aktivitesi ölçümü amacıyla kullanılmıştır. Aynı zamanda bu aktivite, CA izoenzimlerinin

fizyolojik fonksiyonu olduğundan, ilaçların CA izoenzimleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla da kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan ikinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemin esası, karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalamasına (esteraz aktivitesi) dayanmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm’de absorpsiyon vermektedir. HCA-I izoenzimi için bu aktivite metodu kullanılmıştır. Bunun seçiliş sebebi Wilbur-Anderson metoduna göre daha hassas olmasıdır. Ancak hidrataz aktivitesinin ölçümü fizyolojik olarak daha fazla değer taşır. p-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için önce asetonda çözöldü, daha sonra sulu çözeltisi hazırlandı. Çözöcü olarak asetonun seçilmesinin sebebi ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözöcü olarak kullanılmasıdır.^{44,45}

Aktivite ölçüm pH’sı HCA-I ve HCA-II izoenzimleri için 7,4 olarak alındı. Bunun sebebi ise Kondo ve arkadaşları³⁵’nın çalışmalarında pH=7,4’de esteraz aktivitesi ölçömleri yaptıklarından ve HCA-I ile HCA-II izoenzimlerinin bulunduğı ortam olan eritrositlerin pH’sının 7,4 olduğundan dolayıdır.

Çalışmada Sepharose-4B üzerinde hazırlanan afinite jeli kullanıldı. Sepharose-4B açık porlu yapısıyla çok iyi akış özelliğine sahip olduğundan tercih edildi. Sepharose-4B siyanojen bromürle aktifleştirilerek, tirozin uzantı kolu olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendirildi (Şekil 2.1). Sülfanilamid enzimin spesifik bir inhibitörü olduğundan afinite jelinde ligand olarak fonksiyon gördü. Tirozin ise enzimin ligandla daha iyi etkileşmesini sağlamak için uzantı kolu olarak seçildi. Zira karbonik anhidrazın aktif bölgesi enzimin globuler yapısının 12-15 Å derinliğinde olduğü X ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir.⁵⁴ Bu durumda hazırlanan afinite jeline belirtilen derinliğe erişebilecek uzunlukta bir uzantı kolu bağlanması gerekmektedir. İşte tirozin, bu amaçla afinite jelinin bünyesine alındı.

Çalışmada kullanılan ilaçlar araştırılırken sıklıkla kullanılıp kullanılmadığına bakıldı. İlaçlar seçilirken araştırma hastanesinden bir çok doktorla fikir alış verişinde bulunuldu,

mümkün olduğu kadar en çok kullanılan ilaçlar tercih edildi. Bu çalışmada kullanılan ilaçların suda çözünen ilaçlar olmasına dikkat edildi. Ve toplam altı tane ilaç çalışıldı. Bu ilaçlardan streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve heparin ilaçlarının HCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği belirlendi (Tablo 3.14). HCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine ise sodyum ampisilin ve heparin ilaçları inhibisyon, gentamisin sülfat, dipiron sodyum aktivasyon etkisi gösterirken, streptomisin sülfat ve magnezyum sülfatın hiçbir etkiye sahip olmadığı görüldü (Tablo 3.5). Bu sonuçlara göre, heparin CA-I izoenziminin hem esteraz hemde hidrataz aktivitesini inhibe ederken gentamisin sülfat esteraz aktivitesini inhibe etmekte hidrataz aktivitesini artırmaktadır. Yine streptomisin sülfat esteraz aktivitesini inhibe ederken, hidrataz aktivitesine herhangi bir etkisi olmamaktadır. Böylece bir enzimin inhibisyon kinetiği çalışılırken, substratın farklılığının nazara alınması gerçeği bariz bir şekilde karşımıza çıkmaktadır.

HCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine de sodyum ampisilin, magnezyum sülfat inhibisyon etkisi, gentamisin sülfat ve dipiron sodyum aktivasyon etkisi gösterirken, streptomisin sülfat ve heparin ilaçlarının hiçbir etkiye sahip olmadığı deneyler sonucunda belirlendi (Tablo 3.10). Burada da izoenzimlerin inhibitör veya aktivatörlere karşı ilgisinin farklı olması gerçeği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmada değişik inhibitör konsantrasyonlarında substrat miktarı sabit tutularak inhibisyon dereceleri belirlenmektedir. Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede I_{50} değerleri kullanılmaktadır.⁵⁵ Çalışmada enzimin esteraz ve hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçların I_{50} değerleri % aktivite-[I] grafikleri vasıtasıyla belirlendi. Genelde ilaç ve kimyasal maddelerin enzimler üzerinde olan inhibisyon etkileri I_{50} değeri olarak literatürde verilir.

CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve heparin ilaçları için I_{50} değerleri

İlaç adı	I ₅₀
Streptomisin sülfat	18,875 mM
Gentamisin sülfat	4 mM
Heparin	0,437 mM

CA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren sodyum ampisilin ve heparin ilaçları için I₅₀ değerleri

İlaç adı	I ₅₀
Sodyum ampisilin	0,385 mM
Heparin	0,350 mM

CA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren sodyum ampisilin ve magnezyum sülfat ilaçları için I₅₀ değerleri

İlaç adı	I ₅₀
Sodyum ampisilin	0,774 mM
Magnezyum sülfat	0,048 mM

şeklindedir.

HCA-I'in esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar büyükten küçüğe doğru heparin, gentamisin sülfat ve streptomisin sülfattır. HCA-I'in hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon gösteren ilaçlar büyükten küçüğe doğru heparin ve sodyum ampisilindir. HCA-II'nin hidrataz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar büyükten küçüğe doğru magnezyum sülfat ve sodyum ampisilin olarak sıralanabilir. Bu sıralama yukardaki tablolardan da basitçe görülebilir.

Ayrıca karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçların yetişkin ve sağlıklı bir insan kanında bir dozdaki yaklaşık konsantrasyonu

hesaplanarak sebep olduğu % inhibisyon değerleri, ilgili % aktivite-[I] grafikleri yardımıyla bulunarak aşağıda verilmiştir.

HCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine streptomisin sülfat, gentamisin sülfat ve heparin ilaçlarının kandaki konsantrasyonu ve % inhibisyon değerleri;

İnhibitör adı	Kandaki konsantrasyonu	% inhibisyon
Streptomycin sülfat	0,136 mM	3
Gentamisin sülfat	0,0332 mM	1
Heparin	0,0032 mM	1

HCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine sodyum ampisilin ve heparin ilaçlarının kandaki konsantrasyonu ve % inhibisyon değerleri;

İnhibitör adı	Kandaki konsantrasyonu	% inhibisyon
Sodyum ampisilin	0,057 mM	9
Heparin	0,0032 mM	1

HCA-II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine magnezyum sülfat ve sodyum ampisilin ilaçlarının kandaki konsantrasyonu ve % inhibisyon değerleri;

İnhibitör adı	Kandaki konsantrasyonu	% inhibisyon
Sodyum ampisilin	0,057 mM	5
Magnezyum sülfat	1,2 mM	Yaklaşık 100

İnhibitörlerin kandaki konsantrasyonları hesaplanırken, inhibitörün tamamen kana karıştığı kabul edildi. Yukarıda görüldüğü gibi HCA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine streptomisin sülfat ilacının bir dozu % 3, gentamsin sülfat ve heparin ilaçlarının bir dozu ise % 1 inhibisyona sebep olmaktadır. Yine HCA-I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine sodyum ampisilin ilacının bir dozu %9, heparin ilacının bir dozu ise %1 inhibisyona sebep olmaktadır. HCA-II

izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine sodyum ampisilin ilacının bir dozu %5, magnezyum sülfat ilacının bir dozu ise %100, inhibisyona sebep olmaktadır.

Sonuç olarak; sağlıklı insanlarda sodyum ampisilin ve magnezyum sülfat ilaçları kullanılırken çok dikkatli olunması gerekmektedir. Diğer ilaçların günde tek dozda kullanılması karbonik anhidraz izoenzimleri aktiviteleri açısından normal şahıslarda tehlikeli değildir. Bu durum hekimlerin dikkatine sunulmalıdır.



5. KAYNAKLAR

1. Lehninger, A.L., 1982, Principles of Biochemistry. Worth Puplishers, Inc., New York., s.207
2. Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 1997, Biyokimya, Şafak Yayınları, Erzurum., s.97.
3. Bingöl, G., 1983, Biyokimya, Güven Matbaası Ankara., s.285.
4. Gilbert, H.F., 1992, Basic Concepts in Biochemstry. Mc Graw-Hill Inc., Germany., p.81.
5. Telefoncu, A., 1986, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayını, İzmir., s.59.
6. Stryer, L., 1985 Biochemia, Vieweg, Braunschweig., p.90.
7. Çoban, T. A., Nalbantoğlu, B., Çil, M. Y., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö. İ., 1998, Investigation of the inhibition effects of some antibiotics on human erythrocyte carbonic anhydrase isozymes, Tr. J of Medical Sciences., (Baskıda)
8. Van Slyke, D.O., Hawkins, J.A., 1930, Studies of gas and electrolyte equilibria in blood. XVI. The evaluation of carbon dioxide from blood and buffer solutions. J. Biol. Chem., 80, 265.
9. Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W., 1933, Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. J. Physiol.,80,113.
10. Davenport, H.W., Wilhelmi, A.E., 1941, Renal carbonic anhydrase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48,53.
11. Davenport, H.W., 1946, Carbonic anhydrase in tissues other than blood. Physiol. Rev. 26,560.
12. Common, R.H., 1941, The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct.J. Agric. Sci., 31,412.
13. Pocker, Y., and Sarkanen, S., 1979, Carbonic anhydrase: Structure, Catalytic Versatilitiy and inhibition, Advances in Enzymology, Interscience, New York., 49,149.
14. Pocker, Y., and Joan, S.Y., 1974, Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. Biochemistry.,13, 5116.
15. Maren, T.H., 1967, Carbonic Anyhdrase: Physiologh and inhibition, Physiol. Rev., 47,595.

16. Carter, M.J., 1972, Carbonic Anhydrase: Isoenzymes, properties, distribution and functional significance., Biol. Rev. 42,465,
17. Carter, N.D., Jeffery, S. and Shiels, A., 1982, Immunoassay carbonic anhydrase III in rat tissues. FEBS lett., 139, 265.
18. Dodgson, S.J., Forster, R.E., Schwed, D.A. and Storey, B.T. 1993, Contribution of matrix carbonic anhydrase to citrulline synthesis in isolated guinea pig liver mitochondria. J.Biol. Chem., 258, 7696.
19. William, S., Sly., and Peiyi, Y. Hu., 1995 Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. Annu. Rev. Biochem., 64,375
20. Pocker. Y., Joan, S.Y., 1973, Plant carbonic anyhydrase. Properties and carbon dioxide hydration kinetics. Biochem., 12, 5127.
21. Sasaki S., and Marumo F., 1989, Effects of carbonic anhydrase inhibitors on basoteral base transport of rabbitproximal straiht tubule. Am. Physol. Soc. , 947, 951.
22. Lindskog, S., Henderson, L.E., Kannan, K.K., Liljas, A., Nynan, D.O. and Strandberg, B., 1971, The enzymes 5,3rd. ed. Boyer, P.D., Academic Press, New York., p.587.
23. Schear, A., and Dietsch, P., 1984, A 54.000 moleculer weight with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. In Tashian, E.R. and Hewett, D, ed. In Biology and Chemistry of the carbonic anhydrase The Annals of the New York Academy of Sciences., 429,241.
24. Tobin, A.J., 1970, Carbonic Anhydrase from parsley leaves. J.Biol. Chem., 245,2656.
25. Mc Intosh, J.E.A., 1969, carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and dorsolateral prostate of the rat. Biochem.J., 114,463.
26. Ricklt, E.E., Ghazanfar, S.A.S., Gibbons, B.H., and Edsall, J.T., 1964, carbonic anhydrase from human erythrocytes. J. Biol. Chem., 239,1065.
27. Nyman, P.O. and Lindskog, S., 1964, Amino acid compositions of the various forms of bovine and human erythrocyte carbon anhydrase. Biochim. Biophys.Acta., 85,141.
28. Edsall, J.T., 1968, Multipte molecular forms of carbonic anhydrase in erythrocytes. Annals New York Acad.Sci., 151, 41.

29. Pocker, Y., and Meany, J.E., 1965, The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. I. Kinetic studies of enzyme-catalysed hydration of acetaldehyde. *Biochemistry* 4, 2535.
30. Kaiser, E.T. and Lo, K.W., 1969, The carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitro-*p*-toluene sulfonic sulfonate. *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4912.
31. Mann, T. and Keilin, D., 1940, Sulphanilamide as a specific inhibitor of carbonic anhydrase. *Nature*, 146, 164.
32. Carter, M.J. and Parsons, D.S., 1972, The isoenzymes of carbonic anhydrase: Kinetic properties with particular reference to its functions in the gastrointestinal tract. *J. Physiol.*, 222, 465.
33. Roughton, F.J.W. and Booth, V.H., 1946 The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* 40, 319.
34. Magid, E., 1968, The dehydration kinetics of human erythrocyte carbonic anhydrases. B and C. *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 236.
35. Kondo, T., Murakami, K., Ohtsuka, Y., Tsuji, M., Gassa, S., Toniguchi, N. and Kawakami, Y., 1987, Estimation and Characterization of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta*, 166, 227.
36. Yıldırım, A., Bakan, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., Yiğitoğlu, R., Tek, V., 1990, Diabetes mellituslu hastalarda glikozillenmiş hemoglobin ve karbonik anhidraz miktarının tespiti. *Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni*. 22 (4), 925.
37. Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi, M., Özdemir, H., Gündoğdu, M., 1994, Affinity to some inhibitors of glycosylated carbonic anhydrase-I and II from red blood cells of diabetic patients. *Tr.J. of Medical Sciences* 21, 159.
38. Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948, Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 176, 147.
39. Philpot, F.J. and J., 1936, A modified colorimetric estimation of carbonic anhydrase *Biochem. J.*, 30, 2191.
40. Kayaalp, O., 1995, Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Feryal mat., Ankara, Kitabın muhtelif bölümleri.
41. Segel, I.H., 1968, *Biochemical Calculations: Enzyme kinetics*. John Wiley And Sons, Inc, New York, s.213.

42. Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72,248.
43. Maren, T.H., 1960, A Simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors, *J.Pharmac. exp. Ther.*, 130,26.
44. Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.*, 242,4221.
45. Armstrong, J., McD., Myers, D.V., Verpoort, J.A., and Edsall, J.T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase *J.Biol.Chem.*, 214,5137.
46. Kandel, M., Gonall, A.G., Wong, S., and Kondel, S.I., 1970, Some characteristics of human, bovine, and horse carbonic anhydrases as revealed by inactivation studies. *J. Biol. Chem.*, 245,2444.
47. Pocker, Y., and Sarkanen, S., 1978, Carbonic anhydrase: Structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in enzymology*, 49,149.
48. Kohn, J. and Wilchek, M.A., 1978, colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 7,14.
49. O'Carra, P., Barry, S. And Griffin, T., 1973, Spacer arms in affinity chromatography: The need for a more rigorous approach. *Biochem. Soc. Trans*, 289.
50. Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., 1997, A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography *Tr. J of Medical Sciences.*, 27,559.
51. Whitney, P.L., 1974, Affinity chromatography of carbonic anhydrases, *Anal. Biochem*, 57,467.
52. Laemmli, D.K., 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.*, 227,680.
53. Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. *J.Biol. Chem.*, 245,3059.
54. Bergtin, PC., Vaara, I., Loughren, S., Liliyas, A., Kannon, K.K., and Begisson, U., 1972, Oxygen affinity of hemoglobin and red cell acid-base status *Alfred benzon symposium ed. Röth, M.and Astrup, D., Copenhagen: Munsgaard*, 345.
55. Chirtensen, G.M. and Olsun, D.L., 1981, Effect of water pollutants and other chemicals upon ribonuclease activity in vitro. *Environmental Research*, 26,274.