



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**FARKLI ÇÖZÜCÜLERLE HAZIRLANMIŞ
BİTKİ ÖZÜTLERİNDEKİ KARBONİK
ANHİDRAZ (CA) İNHİBİSYON
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ; CA
ARAŞTIRMALARINDA YENİ
YAKLAŞIMLAR**

Derya CANSIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**FARKLI ÇÖZÜCÜLERLE HAZIRLANMIŞ
BİTKİ ÖZÜTLERİNDEKİ KARBONİK
ANHİDRAZ (CA) İNHİBİSYON
SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ; CA
ARAŞTIRMALARINDA YENİ
YAKLAŞIMLAR**

Derya CANSIZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

TRABZON-2016

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

.....

Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Derya CANSIZ 'nın hazırladığı “Farklı çözücülerle hazırlanmış bitki özütlerindeki karbonik anhidraz (CA) inhibisyon seviyelerinin belirlenmesi; CA araştırmalarında yeni yaklaşımlar” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’ nin ilgili maddeleri uyarınca, kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oybirliği/oy çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Yüksek Lisans Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Yrd. Doç. Dr. Arzu ÖZEL

Yrd. Doç. Dr. Kağan KILINÇ

Tarih: .../.../2016

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../.... tarih ve ...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

(.....)

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş zgn bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 24/ 05 /2016

Derya CANSIZ

TEŞEKKÜR

“Farklı çözücülerle hazırlanmış bitki özütlerindeki karbonik anhidraz (CA) inhibisyon seviyelerinin belirlenmesi; CA araştırmalarında yeni yaklaşımlar” adlı bu çalışmamız bir laboratuvar çalışması olup, yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini benden esirgemeyen, bana araştırma zevki ve bilimsel düşünce disiplini aşlamak için çaba gösteren, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ e

Yüksek lisansa başlamamdan bu güne kadar geçen sürede benden manevi desteğini esirgemeyen ve yanımda olan Doç. Dr. Ali GÜNDOĞDU’ ya

Çalışmalarım sırasında benden manevi desteği esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKAR, Yrd. Doç. Dr. Zehra CAN, Öğretim Görevlisi Ayça AKTAŞ KARAÇELİK, Dr. Öğr. Elif AYAZOĞLU DEMİR, Hacer DOĞAN, Damla POLAT’a

Deneysel çalışmalarım sırasında benden yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Semra ALKAN TÜRKUÇAR ve Uğur KARDİL’ e

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen çok değerli aileme, sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurtiçi Yüksek Lisans programı tarafından desteklenmektedir.

Derya CANSIZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER	xiv
ÖZET	1
SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4. 1. Karbonik Anhidraz Enzimleri	4
4.2. Karbonik Anhidrazların Sınıflandırılması	4
4.2.1. α -Sınıfı CA	4
4.2.2. β -Sınıfı CA	4
4.2.3. γ -Sınıfı CA	5
4.2.4. δ -Sınıfı CA	5
4.2.5. ζ -Sınıfı CA	5
4.2.6. η -Sınıfı CA	6
4.3. Karbonik Anhidrazların Katalitik Fonksiyonları	6
4.4. Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları	7
4.5. Karbonik Anhidraz I (CA I)	7
4.6. Karbonik Anhidraz II (CA II)	7
4.7. Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)	8
4.8. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri	8
4.8.1. Asetazolamid	9
4.8.2. Sülfanilamid	10
4.9. Ekstraktı Hazırlanan Bitkiler ve Özellikleri	10
4.9.1. Akasya (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	10

4.9.2. Çörekotu (<i>Nigella sativa</i>)	11
4.9.3. Ekinezya (<i>Echinacea angustifolia</i>)	12
4.9.4. İhlamur (<i>Tillia</i>)	12
4.9.5. Kekik (<i>Thymus</i>)	13
4.9.6. Mor Ormangülü (<i>Rhododendron ponticum</i>)	14
4.9.7. Sarı Ormangülü (<i>Rhododendron luteum</i>)	14
4.9.8. Sarısabır (<i>Aloe vera</i>)	15
4.9.9. Sinameki (<i>Cassia angustifolia</i>)	16
4.9.10. Tarçın (<i>Cinnamomun ceylanicum</i>)	16
4.9.11. Yaban Mersini (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	17
4.9.12. Yeşil Çay (<i>Camellia sinensis</i>)	18
4.10. Enzim aktivite Tayin Yöntemi	18
4.10.1. Esteraz Aktivitesi	18
4.10.2. Hidrataz Aktivitesi	19
4.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	19
4.11.1. Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı	20
4.11.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Kullanılan Dedektörler	21
4.11.2.1. Ultraviyole (UV) Dedektör	22
4.11.2.2. Diyot Dizili (DAD) Dedektör	22
5. GEREÇ ve YÖNTEM	23
5.1. Gereç	23
5.1.1. Kullanılan Cihazlar	23
5.1.2. Kullanılan Kimyasallar	24
5.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	24
5.1.4. Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması	26
5.2. Yöntem	27
5.2.1. Protein Saflaştırma Tekniği	27
5.2.1.1. Karbonik Anhidrazın Sığır Eritrositlerinden İzolasyonu	27
5.2.1.2. Afinite Jelinin Hazırlanması	27
5.2.1.3. Sepharose 4B' nin Aktifleştirilmesi	27
5.2.1.4. Tirozin Takılması	28
5.2.1.5. Sülfanilamid Kenetlenmesi	28

5.2.2. Kan numunelerinin Alınması	29
5.2.2.1. Hemolizat Hazırlanması	29
5.2.2.2. Kolonun Hazırlanması ve Hemolizatın Kolona Yüklenmesi	29
5.2.2.3. Sığır (Bovine) Karbonik Anhidrazın Elüsyonu	30
5.2.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Belirlenmesi	30
5.2.3.1. Esteraz Aktivitesi	30
5.2.3.2. Hidrataz Aktivitesi	31
5.2.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Ultraviyole (HPLC-UV) ile Fenolik Bileşenlerin Tayini	31
5.2.4.1. Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Ultraviyole (RP-HPLC-UV) Koşulları	31
6. BULGULAR	33
6.1. Saflaştırılan Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Hidrataz Aktivitesi ile Protein Konsantrasyonunun Tayini	33
6.2. Esteraz Aktivitesi	33
6.2.1. Tampon Konsantrasyonunun Optimizasyonu	33
6.2.2. Esteraz Aktivitesi ile Bitki Ekstraktlarında İnhibisyon	34
6.2.3. Esteraz Aktivitesi ile Üç Farklı Çözücünde Hazırlanmış Ekstraktlarla İnhibisyon	34
6.3. Hidrataz Aktivitesi	40
6.3.1. Hidrataz Aktivitesi ile Bitki Ekstraktlarında İnhibisyon	40
6.3.2. Üç Farklı Çözücü İçin 12 Bitki Ekstraktının Esteraz Aktivitesi ile Yüzde İnhibisyonlarının Karşılaştırılması	44
6.4. Hazırlanan Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Analizi	47
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
7.1. Ekstraktların Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)'nın Esteraz ve Hidrataz Aktiviteleri Üzerindeki % İnhibisyonları	56
7.2. Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Toplam Kromatografik Alan ile Korelasyonu	57
7.3. Ekstraktların Aktivite – Fenolik HPLC Profili Karşılaştırması	58
8. KAYNAKLAR	60
9. ETİK KURUL ONAYI	66
10. ÖZGEÇMİŞ	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan malzemeler ve cihazlar	23
Tablo 2. Kullanılan kimyasallar ve alındıkları firmalar	24
Tablo 3. Kullanılan kimyasalların hazırlanışı	25
Tablo 4. HPLC gradient koşulları	32



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	HPLC cihazının basit şeması	20
Şekil 2.	Tüplerdeki eluatların hidrataz aktiviteleri ve protein konsantrasyonları	33
Şekil 3.	Tris-SO ₄ tamponu ile üç farklı konsantrasyonda esterase aktivitesi	33
Şekil 4.	BCA'nın Asetazolamid % inhibisyonu	34
Şekil 5.	BCA'nın Sülfanilamid % inhibisyonu	35
Şekil 6.	BCA'nın Ormangülü (<i>R. luteum</i>) % inhibisyonu	35
Şekil 7.	Akasya ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	36
Şekil 8.	Çörek otu ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	36
Şekil 9.	Ekinezya ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	37
Şekil 10.	Ihlamur ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	37
Şekil 11.	Kekik ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	38
Şekil 12.	Ormangülü (<i>R. ponticum</i>) ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	38
Şekil 13.	Ormangülü (<i>R. luteum</i>) ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	38
Şekil 14.	Sarısabır ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	39
Şekil 15.	Sinameki ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	39
Şekil 16.	Tarçın ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	39
Şekil 17.	Yaban mersini ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	40
Şekil 18.	Yeşil çay ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu	40
Şekil 19.	Su ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	41
Şekil 20.	Su ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının esterase aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	41
Şekil 21.	Asetonitril ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	42

Şekil 22.	Asetonitril ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	42
Şekil 23.	Metanol ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	43
Şekil 24.	Metanol ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	43
Şekil 25.	Farklı 12 bitki ekstraktının üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	44
Şekil 26.	Farklı 12 bitki ekstraktının üç farklı çözücünde hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması	45
Şekil 27.	Su ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarının esteraz aktivitesi ile hidrataz aktivitesinin % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	46
Şekil 28.	Asetonitril ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarının esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesinin % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	46
Şekil 29.	Metanol ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarının esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesinin % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	47
Şekil 30.	Akasya çiçeği metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	48
Şekil 31.	Çörekotu metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	48
Şekil 32.	Ekinezya metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	49
Şekil 33.	İhlamur metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	49
Şekil 34.	Kekik metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	50
Şekil 35.	Ormangülü (<i>R. ponticum</i>) metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	50
Şekil 36.	Ormangülü (<i>R. luteum</i>) metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	51
Şekil 37.	Sarısabır metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	51

Şekil 38.	Sinameki metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	52
Şekil 39.	Tarçın metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	52
Şekil 40.	Yabanmersini metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	53
Şekil 41.	Yeşil çay metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)	53
Şekil 42.	Su ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarında görülen esteraz ve hidrataz aktivitelerinin toplam kromatografik alan ile korelasyonu	54
Şekil 43.	Asetonitril ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarında görülen esteraz ve hidrataz aktivitelerinin toplam kromatografik alan ile korelasyonu	54
Şekil 44.	Metanol ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarında görülen esteraz ve hidrataz aktivitelerinin toplam kromatografik alan ile korelasyonu	55

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Akasya ağacı (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	11
Resim 2. Çörek otu (<i>Nigella sativa</i>)	11
Resim 3. Ekinezya (<i>Echinacea angustifolia</i>)	12
Resim 4. Ihlamur (<i>Tillia</i>)	13
Resim 5. Kekik (<i>Thymus</i>)	13
Resim 6. Mor Ormangülü (<i>Rhododendron ponticum</i>)	14
Resim 7. Sarı Ormangülü (<i>Rhododendron luteum</i>)	15
Resim 8. Sarısabır (<i>Aloe vera</i>)	15
Resim 9. Sinameki (<i>Cassia angustifolia</i>)	16
Resim 10. Tarçın (<i>Cinnamomun ceylanicum</i>)	17
Resim 11. Yaban mersini (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	17
Resim 12. Yeşil çay (<i>Camellia sinensis</i>)	18

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER

BCA	Sığır Karbonik Anhidraz
CA I	Karbonik Anhidraz I
CA II	Karbonik Anhidraz II
DAD	Diyot Dizili Dedektör
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
UV	Ultraviyole



ÖZET

Farklı çözücülerle hazırlanmış bitki özütlerindeki karbonik anhidraz (CA) inhibisyon seviyelerinin belirlenmesi; CA araştırmalarında yeni yaklaşımlar

Karbonik anhidraz (CA) metabolizma sonucu oluşan karbondioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen (H^+) iyonuna dönüştürülerek ortamdan uzaklaştırılmasında hayati öneme sahip bir enzimdir. Bugün çok yaygın olan kanser, obezite, glokom, nörolojik bozukluklar, epilepsi gibi hastalıkların tedavisinde CA enziminin inhibitörleri ilaç etken maddesi olarak araştırılmakta veya kullanılmaktadır. Piyasada bulunan çoğu sentetik olan ilaçların yan etkileri fazla ve vücut sıvılarındaki çözünürlükleri düşüktür. Özellikle sentetik ilaçların yan etkilerinin ve biyoyumsuzluklarının fazla olması günümüzde bitkisel kaynaklı ilaçlara yönelimi artırmıştır. Bu tez çalışmasında bitki ekstraktlarının karbonik anhidraz inhibisyonları belirlendi. Bu amaçla karbonik anhidrazın aktivitesini belirlemek için kullanılan esteraz ve hidrataz aktivitesi kullanıldı. Hidrataz aktivitesi esterazdan farklı olarak enzimin fizyolojik aktivitesidir. Bu çalışma sırasında üç farklı çözücüde (su, asetonyitril ve metanol) ekstre edilmiş numuneler kullanılarak denemeler yapıldı. Tüm bunlarla beraber çalışılan numunelerden en iyi sonuç alınan numune seçilerek HPLC ile kromatografik profilleri belirlendi. Çözücünün aktif bileşen ekstraksiyonundaki etkisi farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların kromatogramları ve aktiviteleri karşılaştırılarak ortaya koyuldu. Bu çalışmanın yapılmasıyla ilaç etken maddesi olarak yeni CA inhibitörlerinin belirlenmesindeki önemli bir adım tamamlanmış oldu. Daha ileri yapılacak çalışmalarla birçok hastalığın tedavisi için yan etkileri daha az olan ya da hiç yan etkiye sahip olmayan vücutla biyoyumluluğu yüksek yeni ilaç hammaddeleri geliştirilebilecektir.

Anahtar Sözcükler: Afinite kromatografisi, Doğal bileşen, Esteraz aktivitesi, HPLC, İnhibisyon

SUMMARY

Determining the level of carbonic anhydrase (CA) inhibition of plant extracts prepared by different solvents; new approaches in CA research

Carbonic anhydrase (CA) is a vitally important enzyme in the removal of metabolically produced carbon dioxide (CO_2) from the medium through its conversion to bicarbonate (HCO_3^-) and hydrogen (H^+) ions. Today the inhibitors of CA found in mammalian blood are either used or investigated as drug active ingredient for the treatment of the widespread diseases such as cancer, obesity, glaucoma, neurological disorders and epilepsy. The common drugs, most of which are synthetic, found in the market have many side effects and low solubility in bodily fluids. The high bio-incompatibility and side effects of the synthetic drugs increased the tendency towards plant based drugs. In this study CA inhibitory activities of plant extracts were determined. For this purpose, esterase and hydratase activities commonly used to determine the carbonic anhydrase activity were utilized. Unlike hydratase activity, of esterase is the physiological activity of the enzyme. During this study, three different solvents (water, acetonitrile and methanol) were performed using the samples in the extraction experiments. Chromatographic profiles from the HPLC of the samples were determined along with the activity measurements. The effect of active composition of the extracts resulting from the type of solvent were demonstrated by comparing chromatographic profiles and activities. With this work, an important step in the determination of the pharmaceutically active substance was completed in finding new carbonic anhydrase inhibitors. With further investigations for the treatment of many diseases with fewer side effects or no side effects, new drug leads having high bio-compatibility with the body can be developed.

Key Words: Affinity chromatography, Esterase activity, HPLC, Inhibition, Natural composite

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde oldukça önemli bir yere sahip olması sebebiyle bu konu üzerinde geçmişte birçok çalışma yapılmış ve halen yapılmaya devam edilmektedir. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde kontrol mekanizması olarak görev almaktadır ve birçok ilaç ve zehirli bileşiğin de etkili olması bundan kaynaklanır. İlaç etken maddesi olarak kullanılan birçok kimyasal ve doğal bitki bileşenleri enzim inhibisyonu ile tespit edilmektedir. İnhibitörler enzim etki mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlamasının yanısıra metabolik yolların da aydınlatılmasına katkıda bulunması açısından biyokimya alanı için oldukça önemli bir yere sahiptir (1).

Karbonik anhidraz ya da karbonik dehidrataz (CA, EC.4.2.1.1.) memelilerde 16 farklı izoenzime sahip merkezinde çinko elementi taşıyan ve kanda karbondioksitin/bikarbonata hidrasyonunu ve dehidrasyonunu sağlayan spesifik bir metaloenzimdir. Karbonik anhidraz enzimi diğer birçok enzimde olduğu gibi inhibisyon çalışmalarında kullanılmış ve bunun sonucunda ilaç etken maddesi olarak kullanılabilir birçok sentetik ve doğal inhibitör belirlenmiştir (2). Karbonik anhidraz enzimi diğer birçok enzim gibi vücutta önemli reaksiyonlara dahil olması sebebiyle inhibisyonu oldukça merak uyandıran bir konudur. Bu sebeple her geçen gün enzim inhibisyonu konusunda yapılan çalışmalar artmaktadır. Literatürde CA' nın inhibitör ve aktivatörleriyle yapılmış birçok çalışma mevcuttur (3). Piyasada CA inhibitörü olarak bilinen ve ilaç etken maddesi olarak kullanılan birçok doğal ya da sentetik madde vardır (2).

Bu çalışma ile yeni doğal CA inhibitörleri belirleyerek literatüre ve sağlık alanına katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Böylece yüksek karbonik anhidraz inhibisyon etkisine sahip, doğal (bitkisel) kaynaklı, yan etkileri ve çözünürlük problemi olmayan, özellikle suda çözünebilen, ilaç etken maddeleri geliştirilebilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Karbonik Anhidraz Enzimleri

Karbonik anhidraz (CA, EC.4.2.1.1, karbonat hidrolizaz) prokaryot ve ökaryotlarda bulunan, merkezinde çinko elementi içeren ve beş farklı sınıftan oluşan ve memelilerde 16 farklı izoenzime sahip olan bir metaloenzimdir. Karbonik anhidrazlar α , β , γ , δ , ζ -CA olarak beş farklı sınıfa ayrıldığı belirlenmiştir fakat daha sonraları η -CA olarak adlandırılan bir sınıf daha eklenmiştir.

4.2. Karbonik Anhidrazların Sınıflandırılması

Karbonik anhidraz enzim sınıfına ait olan α -CA omurgalıları, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmalarında, β -CA bakteriler, algler, tek çenekliler (mono) ve çift çeneklilerin (dikotilodonlar) kloroplastında, γ -CA arkealar ve bakterilerde, δ -CA ve ζ -CA önemli bir alg grubu olan marina diatomlarında bulunur.

4.2.1. α -Sınıfı CA

α -CA enzimleri çoğunlukla memelilerde bulunan ve 16 izoenzime sahip olan bir sınıftır. Bu 16 izoenzim de kendi içinde bulundukları forma göre ayrılırlar. Bunlardan CA I-III, VII sitozolik form, CA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı form, CA V mitokondriyal form ve CA VI salgı formu olan karbonik anhidraz izoenzimleridir. Bu sınıfa ait olan enzimlerin aktif bölgesinde Zn (II) metal iyonu bulunur ve buna bağlı olan üç histidin (His94, His96, His119) birimi ve bir su molekülü vardır. Enzimin aktif formu Zn^{+2} iyonunun OH^- iyonu ile bağlanmasıyla meydana gelir.

4.2.2. β -Sınıfı CA

Birçok bakteri, alg, arkea ve gelişmiş bitkilerin kloroplastlarında bulunan CA enzimleri β -sınıfına aittir. Bu sınıfa ait olan enzimler α -CA sınıfı enzimlerine göre farklılık gösterir. Temelde her iki enzim sınıfında da aktif bölgede bulunan metal iyonu Zn (II) dir, fakat bu iyonun aktif bölgede bağlanma şekli farklıdır. Bunun yanında β -sınıfı CA enzimleri kendi içinde de bulundukları canlı türüne göre farklı bağlanma formlarına sahiptir. Prokaryotlarda bulunan β -CA'larda Zn (II) iyonuna bağlı iki Cys (cysteinate) birimi, His biriminden gelen imidazol halkası ve Asp birimi ile gelen karboksil grubu bulunurken bitkilerin kloroplastlarından elde edilen β -CA'larda Zn (II) iyonuna iki sistein, His biriminden gelen imidazol halkası ve su molekülü bağlanmıştır.

Bu iki sınıfta bahsettiğimiz bağlanmalarla oluşan polipeptid zincirinin katlanma şekli ve aktif bölgenin oluşum şekli farklılık gösterir.

4.2.3. γ -Sınıfı CA

Bir arkea olan *Methanosarcina thermophila*'dan elde edilen γ -sınıfına ait olan CA enzimi "Cam" olarak adlandırılır. Cam α ve β - CA sınıflarından farklı özelliklere sahiptir. Bu sınıfta protein sarmalı sol el β - sarmal motifine sahiptir ve bu motif üç lobla kesilir ardından uzun ve kısa α -sarmalı ile takip edilir. Aktif bölgesinde Fe (II) bulunabilirken bunun yanında Zn (II) ve Co (II) de bulunabilir. Aktif bölgesinde α -CA' larda olduğu gibi Zn (II) iyonuna üç histidin birimiyle bağlanmıştır. Farklı olarak α - CA' larda aktif bölgede tetrahedral bir geometrik dizilim varken γ - CA' ların aktif bölgesinde ek metal bağlı su ligandları bulunur çünkü geometrik dizilimde Zn içeren Cam için trigonal bipiramidal, Co ilaveli enzim için oktohedral yapı vardır (4).

4.2.4. δ -Sınıfı CA

δ -sınıfı CA' lar marina diatomu olan *Thalassiosira weissflogii* canlısından elde edilir. Bu sınıf memeli α - CA sınıfı ile oldukça benzerlik gösterir fakat δ -CA' larda Zn üç histidin ligandı ve bir su molekülüne sahipken β - CA' lar Zn iki sistein, bir histidin ve bir su molekülüne sahip olduğu için β - CA'lardan farklıdır. Aktif bölgesinde fizyolojik reaksiyonları katalizlemek için Co (II) ya da Zn (II) bulunabilir. Marina canlılarında çevresel duruma göre aktif bölgede Co (II) ile Zn (II) yer değiştirebilir ve bu sınıfa ait enzim TWCAI (*Thalassiosira weissflogii* CA) olarak da isimlendirilmektedir (5).

4.2.5. ζ -Sınıfı CA

Bu sınıf bir kadmiyum CA (CDCA1) ailesidir ve merkezindeki metal iyonunun bağlanması açısından β -CA ile benzerlik gösterir. Bu enzim δ -sınıfı CA' larda olduğu gibi *Thalassiosira weissflogii* diatomundan elde edilir. Bu sınıfa ait CA merkezinde Zn (II) ve Cd (II) metal iyonlarını bulundurarak fizyolojik reaksiyonlarda katalizör olarak görev yapabilir. Cys263, His315, Cys325 birimlerinin bağlı olduğu huni şekline sahip aktif bölgesi bulunur (2, 5). Bu enzim sınıfı literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında marina diatomlarında bulunduğu görülmektedir (6).

4.2.6. η -Sınıfı CA

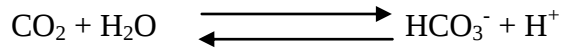
İnsanda sıtma hastalığına sebep olan *Plasmodium falciparum* canlısından 2004 yılında Krungkrai's ve grubu tarafından CA saflaştırılmıştır ve enzimin aktif olduğu esteraz aktivitesine bakılarak tespit edilmiştir (7). Bunun yanında inhibisyonuna bakmak içinde CA enziminin önemli inhibitörlerinden biri olan asetozolamid kullanılmıştır. Tüm bunlara bakıldığında bu canlıdan elde edilen CA' nın α sınıfına ait olduğu düşünülmüştür. Fakat daha sonra enzimin aminoasit dizilimi ve sayısına bakıldığından bu sınıf ile farklılık gösterdiği belirlenmiştir ve bunun sonucunda η -sınıfı CA olarak yeni bir CA sınıfı ortaya çıkmıştır (4).

4.3. Karbonik Anhidrazların Katalitik Fonksiyonları

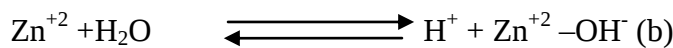
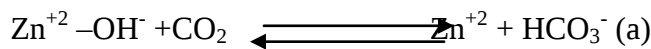
Karbonik anhidraz'lar canlı organizmalarda önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Prokaryotlarda CA' nın iki önemli fonksiyonu vardır;

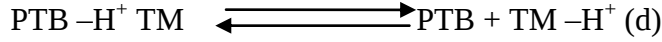
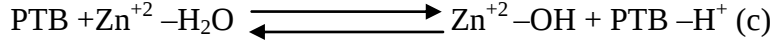
- 1) Organizmanın farklı dokuları arasında CO_2 /bikarbonat taşınmasını,
- 2) Enzimatik reaksiyonlar için $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ elde edilmesini sağlar.

Suda yaşayan fotosentetik organizmalarda CO_2 konsantrasyonunun sağlanmasında rol oynar. Omurgalı canlılarda bulunan CA asit/baz dengesinin düzenlenmesi, solunum olayına dahil olma gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Karbonik anhidrazın katalizlediği reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Karbonik anhidrazın tüm izoenzimlerinin iki basamaklı mekanizmaya sahiptir. İlk (a) basamakta Zn^{+2} ye bağlı olan hidroksil iyonu CO_2 ' ye verilerek nükleofilik saldırı olayını gerçekleştirmiş olur. İkinci (b) basamakta ise Zn^{+2} ye bağlı olan su molekülü iyonlaşarak protonunu verir ve böylece tekrar aktif bölge oluşmuş olur. Eritrositlerin plazmasında gerçekleşen bu olayda protonun dış çözücü ortamına aktarılması için enzimin aktif bölgesinde bulunan aminoasit birimini proton taşıyıcı (PTB) olarak kullanır (c). Bu aminoasitler de aldığı molekülleri ortamdaki tampon molekülüne (TM) aktarır (d).





4.4. Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz CO_2 in hidroliziyle HCO_3^- ve proton oluşumu reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon organizmada pH düzenlenmesinin ve homeostazinin sağlanabilmesinde, birçok biyosentetik işlemde CO_2 ve HCO_3^- taşınmasında, vücut sıvılarının üretiminde, kalsifikasyonda, kemik rezorpsiyonunda, tümör oluşumunda ve diğer birçok fizyolojik işlemlerde omurgalı canlılar için oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra bazı bakteri, bitkiler ve alglerin fotosentetik işlemlerinde oldukça önemli bir yere sahiptir.

4.5. Karbonik Anhidraz I (CA I)

Karbonik anhidraz I enzimi diğer izoenzimlerde olduğu gibi α -sınıfı CA' lardandır ve sitozoliktir. Karbonik anhidraz I enziminin aktif bölgesinde çok sayıda histidin birimleri mevcuttur. Bu özellik CA II ile CA I arasındaki ana farkı oluşturur. Zn^{+2} ligandı olarak His94, His96, His119 birimi bulundurur. Karbonik anhidraz izoenzimlerinde bulunan His64 birimi katalizde oldukça önemlidir. Karbonik anhidraz I enziminde bunlara ek olarak His67, His200, His243 birimi de bulunur. İnce bağırsak epitelinde, akciğer kılcallarının endotelyumunda, karaciğer ve mide bağırsak kanalında bulunur. Memelilerde CA I enzimi CA II' ye göre daha fazla bulunur ama aktivite olarak düşünüldüğünde CA II enzimi daha aktiftir. Bunların yanında iki izoenzim arasındaki bir diğer fark CA I enzimi anyonlara karşı yüksek afiniteye sahipken CA II enzimi sülfonamidlere karşı yüksek afinite özelliğine sahiptir. Karbonik anhidraz I' in kanda $150 \mu\text{M}$ konsantrasyona sahip olduğu bilinmektedir fakat fizyolojik fonksiyonları konusu hala tam olarak aydınlatılabilmiş değildir (8).

4.6. Karbonik Anhidraz II (CA II)

Karbonik anhidraz II enzimi üç histidin birimi (H94, H96, H119) ve bir hidroksil iyonunun koordinasyonu ile oluşan tetrahedral geometrik bir yapıya sahip olup α -sınıfı CA' lardandır. Bu sınıfa ait diğer izoenzimler gibi CA II de merkezinde Zn^{+2} bulunduran bir metaloenzimdir (9). Önemli polar birimleri (T119 birimi gibi) aktif bölgedeki Zn^{+2} ye bağlı hidroksilden hidrojen alır ve Zn^{+2} ye bağlı hidroksildeki suyun

korunmasında bir proton kılıfı olarak görev yapan H64 ve E106 birimlerine bir hidrojen verir. Zn^{+2} ye bağlı hidroksile bitişik hidrofobik boşluklar substrat CO_2 için katalitik birleşme yeri oluşturmayı sağlarken bunun yanında bu boşluklar fenol ve CO_2 hidrasyon reaksiyonu için sadece bilinen yarışmalı inhibitörün bağlanma yeridir (10). Karbonik anhidraz II enzimi CA I ile karşılaştırıldığında daha aktiftir ve BCA ile benzer aktivite gösterir bunun yanında yapısal olarak da BCA' ya yakındır. Karbonik anhidraz II yaygın olarak gözde, böbreklerde, merkezi sinir sisteminde ve iç kulakta bulunur.

Karbonik anhidraz II inhibitörleri günümüzde birçok ilaçta etken madde olarak kullanılmaktadır. Glokom denilen hastalığın tedavisinde CA II inhibitörleri kullanılmaktadır. Karbonik anhidraz II enzimi gözde iki aşamalı reaksiyonun birinci aşamasını katalizler ve CO_2 hidrasyonuna yardım ederek H_2CO_3 oluşumunu sağlar ve ardından reaksiyonun ikinci aşaması olan H^+ ve HCO_3^- iyonunun oluşumunu sağlar. HCO_3^- oluşumu göz içi sıvısının artışı sağlar ve göz içi basıncı meydana gelir, bunu engellemek için piyasada CA II inhibitörlerinin etken madde olarak kullanıldığı birçok ilaç mevcuttur. Karbonik anhidraz II enzimi inhibe edildiğinde reaksiyonun ilk aşaması durur ve böylece HCO_3^- oluşumu engellenmiş olur.

4.7. Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)

Sığır kanından elde edilen karbonik anhidraz (BCA) yapısal olarak CA II'ye benzemesinin yanında aktivite olarak da CA II' ye benzer. İnsan eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz izoenzimlerinde olduğu gibi bu enzim de CO_2 ' nin hidroliziyle HCO_3^- ve proton oluşumu reaksiyonunu katalizler. Sığır karbonik anhidraz sığır kanından saflaştırılırken kan taze olarak mezbahadan alınır ve hemolizat hazırlanarak afinite kromatografisiyle saflaştırma işlemi uygulanır.

4.8. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Karbonik anhidrazın sülfonamidlerle inhibisyonu ilk olarak 1948 yılında Mann ve Keilin tarafından keşfedilmiştir (11, 12). Daha sonraları potansiyel ilaç hammaddesi olabilecekleri düşüncesiyle bu konuda birçok çalışma yapılmış ve inhibitörler belirlenmiştir. Bunlar yapılırken karbonik anhidrazın moleküler yapısı, katalitik reaksiyonları üzerinde birçok araştırma yapılmıştır.

Karbonik anhidraz inhibitörleri günümüzde birçok ilaçta etken madde olarak kullanılmaktadır. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesi için

karbonik anhidraz izoenzimlerinin fizyolojik ve patolojik reaksiyonları aydınlatılmaya çalışılmış ve bunun ardından karbonik anhidraz inhibitör mekanizmaları geliştirilmiştir. Karbonik anhidraz inhibitörleri metal kompleks anyon ve yeri değiştirilemeyen sülfonamidler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Bu sınıflara dahil olan inhibitörler protein bağlı olmayan çinko ligandlarının yerine ya da metal koordineli alana eklenerek enzimin aktif bölgesinde bulunan çinko iyonuna bağlanırlar (8). Sülfonamidin nitrojen atomunun bağlı olduğu uca Zn iyonu protonlarına ayrılmış bölgede tetrahedral geometriyle bağlanmıştır. Anyonlar metal iyonuna tetrahedral geometriyle ya da trigonal bipiramidal eklenti şeklinde bağlanabilirler. Karbonik anhidraz inhibisyonunun çok güçlü bir şekilde sülfonamidler ile gözlenebildiği Man ve Keilin tarafından keşfedilmiştir (12). Bu bilgiler ışığında antiglokoma ajanları, antitiroid ilaçları, hipoglisemi sülfonamidleri ve son zamanlarda da anti kanser ilaçları geliştirilmiştir (8).

Glokom hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere CA inhibitörlerinden yararlanılmıştır. İlaç etken maddesi olarak kullanılan CA inhibitörleri oral ya da lokal olarak hastaya uygulanarak tedavi gerçekleştirilmektedir. Günümüzde bu amaçla kullanılan ilaçların en önemlileri sülfonamidler sınıfına ait olan asetazolamid ya da onun yapısı modellenerek oluşturulan sentetik ilaç etken maddeleridir.

Karbonik anhidraz aktivatörleri konusunda ilk olarak 1940 yılında Leiner tarafından çalışılmıştır. 1941 yılında Kiese tarafından yapılan ilk tanımlamadan sonra karbonik anhidrazın aktivatörleri konusunda birçok tartışma ortaya çıkmıştır (13, 14). Buna karşılık inhibitörler için yapılan çalışmalar sonrasında bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Karbonik anhidrazın histamin, aminoasitler, pürin türevleri gibi sınıflarda aktivatörlere sahip olduğu 1948 yılında Van Goor tarafından 2000 yılında ise Supuran ve Scozzafava tarafından belirlenmiştir (15). Bu konu araştırmacılar tarafından çok az ilgi görmüştür. Bunun nedenleri ise 1951 yılında Perrin ve Clark'ın karbonik anhidrazın aktivatöre sahip olmadığını söylemeleri ve bu konuda yazılanların ikna edici olmamasıdır(16). Son yıllarda ise Supuran ve grubu tarafından karbonik anhidraz aktivatörleri konusunda çalışmalar yapılmaktadır (11, 17, 18).

4.8.1. Asetazolamid

Sülfonamidlerin birçok sınıfı karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılır. Bunlardan bazıları asetazolamid, sülfanilamid, dorzolamid, metazolamid gibi

antiglokoma ve diüretik maddelerdir (19). Bunlara ek olarak birçok sentetik ilaç hammaddesi tasarlanmıştır. Asetazolamid 1954 yılından beri klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Glokom adıyla bilinen hastalık göz içi basıncının artmasıyla göz içi sinirlerin zarar görmesi durumudur. Karbonik anhidraz enzimi göz içinde bikarbonat üretimini artırır. Bunun artması göz içindeki basıncın artmasına ve gözde görmeyi sağlayan sinir hücrelerine baskıya neden olur. Bu hastalığın tedavisinde karbonik anhidraz inhibitörü olan asetazolamidin türevi ilaç etken maddeleri kullanılmaktadır. Bu etken maddeler gözde bulunan CA inhibe ederek göz içi basıncını düşürmeye yardımcı olur. Asetazolamid CA I, CA II, CA IX, CA XII inhibisyonunda oldukça etkilidir. Karşılaştırma yapıldığında CA I inhibisyonunda diğerlerine göre daha az etkiye sahip olduğu görülmektedir (20).

4.8.2. Sülfanilamid

Sülfanilamid de sülfonamid grubuna dahil olan bir inhibitördür. Bu inhibitör sülfonamid grubu ile türevlendirilmiş anilin içeren bir organik bileşiktir. İnsanda bakteriyel enfeksiyon tedavisi için oldukça etkili bir ilaç etken maddesidir. Bunun yanında menenjit, bademcik iltihabı, zatürre ve sinüs enfeksiyonu gibi hastalıkların tedavisinde de sıkça kullanılmaktadır. Sülfanilamid inhibitörü CA II enzimini inhibe etmede CA I' e göre çok daha etkilidir (21).

4.9. Ekstraktı Hazırlanan Bitkiler ve Özellikleri

Çalışmada kullanılan bitkiler akasya, çörekotu, ekinezya, ıhlamur, kekik, ormangülü, sarısabır, sinameki, tarçın, yaban mersini, yeşil çay olmak üzere 12 tanedir. Bu bitkilerin bir kısmı aktardan alınmış olup bir kısmı da daha önceki laboratuvar çalışmalarında kullanılan bitkilerdir.

4.9.1. Akasya (*Robinia pseudoacacia*)

Leguminosae diğer adıyla Fabaceae familyasına ait olan akasya bitkisinin anavatanı Kuzey Amerika'dır. Bunun yanında Türkiye'de de yol kenarlarını süslemek amacıyla yetiştirilmektedir. Akasya' nın çiçek kısımları beyaz, sarı ve pembe olmak üzere üç renkte görülebilmektedir. Gövde kısmı dikenli ve yaprakları kısadır ve meyve kısımları bakla ile benzerlik gösterir. Fabaceae familyasının Türkçe karşılığı da baklagillerdir. Akasya olarak isimlendirilmiş olan bu bitki aynı zamanda beyaz salkım, salkım ağ olarak da bilinir. Bu bitki sedative (yatıştırıcı), safra artırıcı etkiye sahip

olması bakımından tıbbi bitki olarak adlandırılabilir. Bunların yanında antioksidan ve antibakteriyal aktiviteye de sahiptir (22).



Resim 1. Akasya (*Robinia pseudoacacia*) (23)

4.9.2. Çörekotu (*Nigella sativa*)

Latince ismi Ranunculaceae olarak bilinen Düğün çiçeğigiller familyasına ait olan bu bitki tek yıllıktır. 20-50 cm kadar uzayabilen mavi çiçekli ve otsu bir bitkidir. Karaman ve Burdur gibi Orta Anadolu şehirlerinde yabani olarak bulunmasının yanı sıra ekimi de yapılmaktadır. Çörek otu bitkisi karacaotu, kara çörek, otçam, siyah kimyon, çöreotu gibi isimlerle de anılmaktadır. Bu bitki kas gevşetici, egzama ve migren önleyici, diüretik ve antimikrobiyal özelliğe sahiptir. Çörek otu % 30- 40 yağ % 20- 30 saponin gibi antioksidan ligandlı protein içerir (24) .



Resim 2. Çörekotu (*Nigella sativa*) (25)

4.9.3. Ekinezya (*Echinacea angustifolia*)

Kirpi otu olarak da bilinen Ekinezya bitkisi Papatyagiller (Asteraceae) familyasına aittir. Anavatanı Kuzey Amerika olmakla beraber ülkemizde bu familyaya ait 130 cins ve 1100'e yakın türü bulunmaktadır. Ekinezya bitkisinin ekşi çağlardan beri tıbbi olarak bağışıklığı güçlendirici, iltihap giderici, öksürük önleyici olduğu bilinmektedir. Bunların yanında solunum yolu enfeksiyonları ve soğuk algınlığı tedavisi için kullanılır (26).



Resim 3. Ekinezya (*Echinacea angustifolia*) (27)

4.9.4. İhlamur (*Tillia*)

Tillia (Tiliaceae/ıhlamurgiller) türlerini temsil etmekte olan ağaç türlerine verilen isimdir. Altmış civarında cinsi vardır. Bu türlerin uzunluğu 20-30 cm' ye ulaşabilmekte ve gölge alanlarda yetişmektedir. İhlamur bitkisi içeriğinde uçucu yağ, manganez, tanen, saponin ve C vitamini bulundurması sebebiyle tıbbi anlamda oldukça değerlidir. Bu bitki ıhlamur ismi dışında farklı yörelerde kullanılan Felenbur (Çayeli-Rize), Fambur (Güneyce-Rize), Filanbur, İlamur, Süğnük, Süğünük gibi isimlere de sahiptir. Haziran sonlarında toplanıp kurutularak kullanılmaktadır. Bu türlerin tıbbi olarak kullanımı oldukça yaygındır. İhlamur bitkisinin çiçekli kısmı soğuk algınlığı giderici, idrar sökücü, balgam giderici, iltihap kurutucu olarak kullanılmaktadır (28).



Resim 4. Ihlamur (*Tilia*) (29)

4.9.5. Kekik (*Thymus*)

Thymus türlerinin genel adı olan kekik Ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasına aittir. Türkiye’de 38 türü bulunan bu tür otsu, tabanda odunsu, sürünücü gövdeye sahiptir. Çayır alanlarında yetişip çok yıllık bir bitkidir ve mor- beyaz çiçeklere sahiptir. İçeriğinde karvakrol ve timol uçucu yağlarını barındırmaktadır. Kekik yaygın bir şekilde baharat olarak kullanılmasının yanında bronşit, astım, gastrit, diyare ve deri hastalıklarının tedavisi için de kullanılmaktadır (30).



Resim 5. Kekik (*Thymus*) (31)

4.9.6. Ormangülü (*Rhododendron ponticum*)

Ormangülü Fundagiller (Ericaceae) familyasına ait olup *Rhododendron* cinsinin 800 türünü barındıran türünü içeren bitkilerin ortak adını temsil eder. Ormangülü' nün ana vatanı Kuzeydoğu Asya ve Kuzey Amerika olmakla beraber Lübnan, Kafkasya, İspanya ve Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde doğal olarak yetişmektedir. Doğal olarak ülkemizde yetişen beş türü vardır. Bunlar Karadeniz bölgesinin çeşitli kısımlarına dağılmışlardır. Ormangülü ile yapılmış olan birçok çalışma literatürde mevcuttur (32, 33). Bu bitkinin boyu 3-4 m' ye kadar uzayabilmekte olup yaprakları bulunduğu iklimin şartlarına uygun şekilde sert, kalın, parlak ve tüysüzdür bunun yanında her dem yeşildirler. Bitkinin çiçekleri mor renklidir ve üst kısımlarında kahverengi lekeler mevcuttur (34).



Resim 6. Ormangülü (*Rhododendron ponticum*)

4.9.7. Ormangülü (*Rhododendron luteum*)

Rhododendron cinsinin bir başka türü olan bu bitki sarıçiçeklere sahiptir. *R. luteum* türünden farklı olarak yaprakları tüylü, dar ve daha sivridir. Orta ve Doğu Avrupa'da bulunurken aynı zamanda Türkiye ve Kafkasya'da da yayılım göstermektedir. Bu iki bitki türünden elde edilen bal Türkiye' de "deli bal" olarak adlandırılmaktadır. Fazla tüketilmesi halinde toksik özellik göstermekle beraber mide-bağırsak hastalıkları ve yüksek tansiyon hastalığının tedavisinde kullanılması bakımından tıbbi öneme sahiptir (35).



Resim 7. Ormangülü (*Rhododendron luteum*) (36)

4.9.8. Sarısabır (*Aloe vera*)

Asphodelaceae familyasına ait olan bu bitkinin anavatanı Afrika'dır. Yaklaşık olarak 300 türü vardır ve bunların sadece 3-4 türü tıbbi özelliğe sahiptir. En çok etkiye sahip olan türü ise *Aleo vera*'dır. Bu bitki etli yapraklara sahiptir ve yapraklarının içinde jelimsi sıvı bulundurur. Bu sıvının yara iyileştirici özelliği vardır ve bu özellik yaprak bitkinin kendisinden ayrıldıktan 3-4 saat sonra etkisini kaybetmektedir. Sarısabır içeriğinde uçucu yağ, reçine ve antresan türevleri barındırmaktadır. Tüm bu özellikleri sebebiyle kozmetik ve ilaç sanayisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (37).



Resim 8. Sarısabır (*Aloe vera*) (38)

4.9.9. Sinameki (*Cassia angustifolia*)

Sinameki bitkisi Baklagiller (Fabaceae) familyasına ait olup *Cassia* cinsinin türleridir. 60-100 cm kadar büyüeyebilen bu bitki türünün ana vatanı Arabistan ve Somali olmakla beraber Çin’de de tedavi amacıyla geleneksel olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bitkinin yaprak ve meyve kısımları eczacılık alanında müshil yapımı için kullanılır (39).



Resim 9. Sinameki (*Cassia angustifolia*) (40)

4.9.10. Tarçın (*Cinnamomum ceylanicum*)

Cinnamomum cinsine ait olan tarçın Defnegiller (Lauraceae) familyasındandır. Bu cins dünya çapında yaygın olup sadece Hindistan’ın farklı kısımlarında 25 türü vardır. Farklı kültür ve coğrafyalarda farklı kullanım şekilleri mevcuttur. Tarçın yapraklarını dökmez ve keskin, aromatik kokuya sahip bir ağaç cinsidir. Tarçın ağacının dış kabuğu ayrılarak içte kalan kısımların kurutulup toz haline getirilmesiyle kullanıma hazır hale gelir. Bunun yanında kabuk şeklinde de kullanılmaktadır. Yaygın olarak mide yangısı, solunum problemi, diyare, bulantı ve jinekolojik rahatsızlıkların giderilmesine yardımcı olduğuna düşünülmektedir.



Resim 10. Tarçın (*Cinnamomum ceylanicum*) (41)

4.9.11. Yaban Mersini (*Vaccinium myrtillus*)

Genel adı *Vaccinium* olan bir cinse ait olan bu tür Fundagiller (Ericaceae) familyasına aittir. Bu tür Avrupa, Sibirya, Kuzey Doğu Çin’de bulunmaktadır. Bu tür içeriğinde delfinidin, siyanidin, malvidin, peonidin, petunidin gibi antosiyanidinleri bulundurmaktadır. Bunun yanında birçok sağlık probleminin tedavisi için kullanılmaktadır (42).



Resim 11. Yaban Mersini (*Vaccinium myrtillus*) (43)

4.9.12. Yeşil Çay (*Camellia sinensis*)

Bu çay siyah çay olarak kullandığımız ve *Camellia sinensis* bitkisinin yapraklarından elde edilir. İşlenmesi sırasında geçirdiği uygulamalardan dolayı siyah çaya göre farklılık göstermektedir. *Camellia sinensis* türü Çin ve Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinin yanı sıra Türkiye'nin Doğu Karadeniz bölgesinde de yetiştirilmektedir. Yeşil çay kolesterol düşürücü, hipertansiyona karşı koruyucu, antimikrobiyal, antioksidan, kardiyovasküler hastalıklara ve kansere karşı koruyucu olması sebebiyle tıbbi açıdan büyük öneme sahiptir (44).



Resim 12. Yeşil Çay (*Camellia sinensis*) (45)

4.10. Enzim Aktivite Tayin Yöntemleri

4.10.1. Esteraz Aktivitesi

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktivitesine bakılırken kullanılan iki yöntemden biri esteraz aktivitesidir. Bu yöntem sırasında karbonik anhidraz enzimi *p*- nitrofenil asetatı hidroliz ederek *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat iyonlarını meydana getirmektedir. Bu reaksiyon sonunda oluşan iyonların verdiği absorbans UV' de 348 nm de ölçülerek aktivitenin bu değerlerden hesaplanması sağlanmaktadır (46).

Esteraz aktivitesi için 300 µL enzim, 100 µL saf su, 0.05 M Tris-SO₄ (pH: 7.4) 1100 µL ve 1500 µL *p*-nitrofenil asetat ile hazırlanan substrat ilave edilerek ve 348 nm dalga boyunda ölçüm yapılır.

4.10.2. Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz aktivitesini belirlemek için kullanılan ikinci yöntem ise hidrataz aktivitesidir. Bu yöntem fizyolojik açıdan karbonik anhidraz için oldukça önemlidir. Bu yöntemin temelinde CO_2 ' in hidrasyonu ile ortaya çıkan H^+ iyonlarının ortamın pH' sını 10' dan 7.4'e düşürmeye kadar geçen sürenin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. pH değişimi reaksiyonda kullanılan indikatör yardımıyla belirlenmektedir. Bir diğer hidrataz aktivitesi belirleme yöntemi ise Wilbur- Anderson yöntemidir (47). Bu yöntemde göre deney tüpü reaksiyon boyunca buzun içinde bekletilerek pH' ın 8.2'den 7.0'a düşene kadar geçen süre belirlenmektedir. Deney yapılırken 100 μL enzim, 2400 μL 2.5 mM HEPES (pH:8.8) tamponu ve 2500 μL saf su ile hazırlanmış olan doymuş CO_2 çözeltisi ilave edilerek pH değişimi takip edilmektedir.

4.11. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

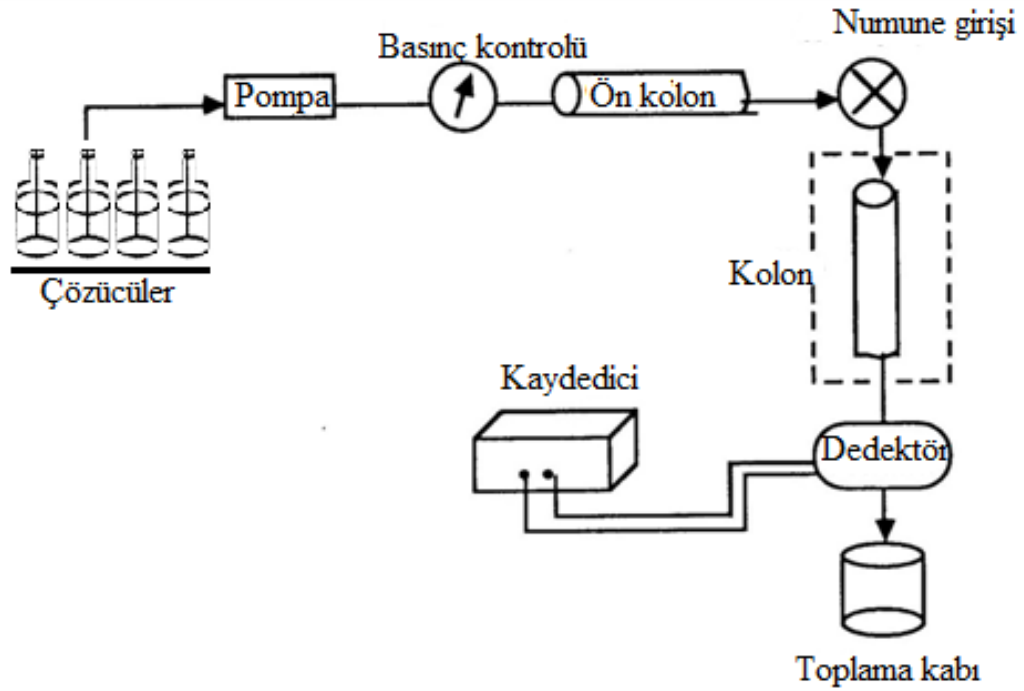
Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi ile hareketli (mobil) faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyümekte ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olmaktadır. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için akış hızını belli bir değerin altına düşürmeden basınç uygulanması gerekmektedir (48).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, günümüzde çok yaygın olarak kullanılan ve özellikle de uçucu olmayan bileşenlerin ayrılmasında en çok tercih edilen kromatografik ayırma yöntemlerinden birisidir. Yöntemin çalışma prensibi temel olarak, bir sıvı içerisinde çözölmüş örneğin sabit fazın katı olduğu kolona enjekte edilmesi ve bir pompa yardımıyla kolondan hareketli faz olarak bir çözöcö veya çözöcö karışımı geçirilmesi esasına dayanmaktadır (49). Bileşikler polarite farklılıklarından dolayı kolonu farklı hızlarda terk ederler. Böylelikle en hızlı hareket eden bileşen kolondan en önce çıkmakta, en yavaş hareket eden ise kolondan en son ayrılmaktadır. Kolondan çıkan hareketli faz bir dedektöre gelir ve yazıcıda zamana bağılı sinyalin kaydedildiğı kromatogramda görölmektedir. Bileşiğın kolondan çıktığı zaman alıkönma (tutulma) zamanıdır.

Bu yöntem ile aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, aromatik hidrokarbonlar, karbohidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler kolaylıkla analiz edilebilmektedirler (48).

4.11.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı yüksek basınç uygulanması nedeniyle diğer kromatografi cihazlarına göre daha karmaşık ve daha pahalıdır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı başlıca hareketli faz kabı, çözücü muamele sistemi, pompa sistemi, örnek enjeksiyon sistemi, kolon ve dedektör olmak üzere beş ana birimden oluşmaktadır. HPLC'nin basitleştirilmiş bir şeması aşağıda Şekil 1'de görülmektedir.



Şekil 1. HPLC cihazının basit şeması

Ayrılacak bileşenler için uygun olan hareketli faz çözücüsü seçilirken polarlık dikkate alınmakta ve hareketli fazın polarlığı bileşenlerinkine benzemelidir. Bu esasa göre daha polar bileşenleri yürütmek için daha polar çözücü, apolar bileşenler için apolar çözücü seçilmelidir. Çözücü karışımı cihaza gönderilmeden önce degaser ile çözücü içerisinde var olan gaz giderilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazlarında iki tane kolon vardır. Bunlardan biri ayrılmanın olduğu analitik kolon diğeri ise koruyucu kolondur. Koruyucu kolon analitik kolonun giriş kısmına takılarak

çözücülerden gelebilecek toz ve kirlilikleri tutmak suretiyle kolonun ömrünü uzatmaktadırlar. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin'de kolonların kolon fırınında olması gerekmektedir. Çünkü bazı ayırmalarda sıcaklık kromatograma etki etmektedir. Bu amaçla kolon ısıtıcıları ve fırınları kullanılmaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının çıkışında bulunan dedektörler analizi yapılacak örneğin cinsine uygun olmalıdır.

4.11.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Kullanılan Dedektörler

Dedektörler yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, cihazın en önemli kısımlarından birini oluşturmaktadır. Kolondan çıkan maddelerin derişimi kolon çıkışına yerleştirilen uygun bir dedektör ile ölçülmektedir. Dedektör seçimi doğru ve hassas bir analiz yapabilmek için son derece önemlidir (48).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazlarında, ayrılan bileşenleri tanımlamak üzere çok farklı dedektörler kullanılabilir. Sıvı kromatografisi sistemleri için çok çeşitli dedektörler geliştirilmiş olmasına rağmen burada, en yaygın kullanımı olan dedektörler: ultraviolet dedektör, refraktif indeks dedektörü, floresans dedektör ve kütle spektrometresidir. Bu çalışmada yalnızca UV ve Diyot dizinli dedektör (DAD) dedektörler kullanılmaktadır.

Maddelerin çoğu UV görünür bölgede çeşitli dalga boylarında absorbansa sahip oldukları için, UV dedektörler en çok kullanılan dedektörlerden biridir. Dedektör, içinden kolondan gelen akımın geçtiği silindirik bir hücredir. Uygun bir UV lambadan (veya görünür bölgede çalışılıyorsa görünür lamba) gelen ışık örnek hücresinden geçmekte ve bir fotoelektrik hücreye çarpılmaktadır. Sabit dalga boylu dedektörde ışığın dalga boyu kullanılan lambaya bağlıdır. Akış hücrelerinden geçen sıvının sabit ya da istenilen değere ayarlanabilir dalga boyundaki ışığın absorpsiyonunu ölçmekte ve kantitatif ölçümlerin esası Lambert-Beer yasasına dayanmaktadır.

Monokromatör ile ışık şiddetini ölçmede en çok kullanılan dedektör fotodiyot dizisi dedektörüdür. Lambadan gelen UV ışık demeti dalga boylarına ayrılmadan önce ışık hücresinden geçmektedir. Grating mekanizmasından sonra yerleştirilen yüzlerce fotodiyot dizisi ile her dalga boyunun yoğunluğu ölçülür. Böylece maddeye ait spektrum ile istenilen dalga boyunda kromatogram elde edilmektedir. Her bir fotodiyot başka bir dalga boyunda ışık şiddeti ölçebilmektedir ve monokromatör, ışık kaynağı ile

örnek arasında değil, örnek ile dedektör arasına yerleştirilmektedir. Bu tür bir optik yerleştirmede ışık kaynağından gelen ışınların tümü birden örneğe gönderilerek duyarlılık artırılmış olmaktadır. Fotodiyot dizisi dedektörü (PDA veya DAD) ile farklı dalga boyunda aynı anda çok hızlı bir biçimde ölçüm yapmak mümkün olduğundan bilgisayarlı cihazlarda bu tür dedektör tercih edilmektedir (48).

4.11.2.1. Ultraviyole (UV) Dedektör

Ultraviolet dedektörü en yaygın kullanılan dedektörlerden biridir. 180- 350 nm aralığında ışık absorblayabilen pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup için uygundur. Çözeltilerden sürekli olarak ışın demeti geçerken analitler tarafından ışığın bir kısmı adsorbe edilmekte böylece analiz edilmek istenen bileşiğin kalitatif veya kantitatif tayini yapılmış olmaktadır(50). Dört tip UV dedektör vardır; sabit dalga boylu, değişken (veya çoklu) dalga boylu, değişken (veya çoklu) dalga boylu dispersiv, diod dizili (diod array) dedektörleridir (48).

4.11.2.2. Diyot Dizili (DAD) Dedektör

Fotodiyot dizili dedektör UV/Vis dedektörünün daha gelişmiş bir modelidir. Bu dedektörün UV/Vis dedektöründen farkı 512 diyotdan oluşan bir yüzeyde, her diyodun ayrı bir dalga boyundaki absorbansı eş zamanlı ve anlık spektrum alabilme özelliğine sahiptir. Diyot dizili dedektörde lambadan gelen ışın farklı dalga boylarını ayıran optik ağa ulaşmadan önce numuneden geçmektedir. Diyot dizileri bir seri fotodiyot serileri içermektedir. Her bir diyot spektrumun dar bir bandını kaydetmek için tasarlanmıştır. Diyotlar öyle bağlanmışlardır ki tüm spektrum bir defada kaydedilmektedir. Bu sayede istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambalardır (48). Fotodiyotların sayısı sınırlı olduğundan hız ve güven çözünürlükte küçük bir kayıpla elde edilmektedir. Yine de pek çok uygulama için bu tip enstrümanların avantajları çözünürlük kaybına ağır basmaktadır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tezin deneysel çalışmaları yapılırken kullanılmış olan tüm cihazlar Karadeniz Teknik Üniversitesi laboratuvarlarından temin edilmiştir. Kullanılmış olan cihazlar satın alındıkları firmaların isimleriyle birlikte aşağıdaki Tablo 1’ de belirtilmektedir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan malzemeler ve cihazlar

Kullanılan Malzeme/Cihaz	Model
Afinite kolonu	GE Healthcare
Buzdolabı(+4°C)	Arçelik
Çeker ocak	Tez-San
Derin dondurucu	Vestel
Etüv	Helios
Hassas terazi	Mettler Toledo
HPLC	Agilent 1200
Isıtıcı	Heidolph
Mikrofiltre	Minisert RC 25
Otomatik pipet 10µL-100µL	Gilson
Otomatik pipet 100µL-1000µL	Gilson
Öğütücü	Waring Commercial Blender
Peristaltik pompa	Teledyne ISCD
pH metre	HANNA Instruments pH 211
Santrifüj	Universal 320 Hettich/Zentrifugen
Su trompu	Yerel
Süzgeç kağıdı	Whatman 6
UV spektrofotometre	Labomed Inc
Vorteks	Ika Genius

5.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma sırasında kullanılan kimyasalların isimleri ve alındıkları firmalar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kimyasallar ve alındıkları firmalar

Kullanılan Kimyasal	Firma
Asetazolamid ($C_4H_6N_4O_3S_2$)	Sigma Aldrich
Asetik Asit (CH_3COOH)	Sigma
Aseton	Birpa
Asetonitril	Merck
BCA	Sigma Aldrich
HEPES	Ambresco
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck
Karbondioksit (CO_2)	Karadeniz Oksijen
L-tirozin ($C_9H_{11}NO_3$)	Sigma Aldrich
Metanol	Merck
P-nitrofenil Asetat	Sigma Aldrich
Sepharose -4B	Sigma
Siyonojen Bromür (CNBr)	Fluka
Sodyum Asetat (CH_3COONa)	Merck
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Delta Kimya
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
Sodyum Perklorat ($NaClO_4$)	Sigma Aldrich
Sodyum Sülfat (Na_2SO_4)	Tekno Kimya
Sülfanilamid ($C_6H_8N_2O_2S$)	Sigma Aldrich
Sülfürik Asit (H_2SO_4)	Carlo Erba
Tris (hidroksimetil)-aminometan	Sigma Aldrich

5.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Çalışma boyunca kullanılan tüm çözeltilerin hazırlanış şekli aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasalların hazırlanışı

Çözelti	Hazırlanışı
Dengeleme tamponu: (pH: 8.7) 25 mM Tris/0.1 M Na ₂ SO ₄	0.7571 g Tris (hidroksimetil)-aminometan ve 3.55 g Na ₂ SO ₄ 240 mL saf su ile çözündürülüp, pH 1M HCl ile 8.7' ye ayarlandı ve hacim 250 mL' ye tamamlandı.
Yıkama Tamponu: (pH: 8.7) 25 mM Tris/22mM Na ₂ SO ₄	0.7571 g Tris (hidroksimetil)-aminometan ve 0.781 g Na ₂ SO ₄ 240 mL saf su ile çözündürülüp, pH 1M HCl ile 8.7' ye ayarlandı ve hacim 250 mL' ye tamamlandı.
4 M NaOH	4 g NaOH saf su ile çözündürülüp hacim 25 mL' ye tamamlandı.
0.1 M NaHCO ₃ (pH:10)	2.1 g NaHCO ₃ 200 mL saf su ile çözündürülüp ve pH 10' a ayarlandı ardından hacim 250 mL' ye tamamlandı.
0.2 M NaHCO ₃ (pH:8.8)	1.68 g NaHCO ₃ 90 mL saf su ile çözündürülüp, pH 8.8' e ayarlandı ve hacim 100 mL' ye tamamlandı.
0.05 M Tris SO ₄ Tamponu (pH:7.4)	1.5137 g Tris (hidroksimetil)-aminometan 240 mL saf su ile çözündürülüp, pH H ₂ SO ₄ ile 7.4' e ayarlandı ve hacim 250 mL' ye tamamlandı.
1 M HCl	8.29 mL % 37 HCl bir miktar saf su ile çözündürülerek hacim 100 mL' ye tamamlandı.
1N H ₂ SO ₄	5.43 mL % 96 H ₂ SO ₄ bir miktar saf su ile çözündürülerek hacim 100 mL' ye tamamlandı.
% 9 NaCl çözeltisi	0.9 g NaCl saf su ile çözündürülerek hacim 100 mL' ye tamamlandı.
BCA Elüsyon Tamponu (pH: 5.6) 0.1 M NaCH ₃ COO/ 0.5 M NaClO ₄	9.187 g NaClO ₄ ve 2.04 g NaCH ₃ COO.3H ₂ O 120 mL saf su ile çözündürülüp, 1M HCl ile pH 5.6' ya ayarlandı, hacim 150 mL' ye tamamlandı.

Tablo 3. Kullanılan kimyasalların hazırlanışı (devamı)

3 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat	27 mg <i>p</i> -nitrofenil asetat 1 mL aseton ile çözündürüldü. 49 mL saf su halka oluşturacak şekilde erlende hızlıca karıştırılırken aseton ile çözündürülen <i>p</i> -nitrofenil asetat yavaşça damla damla erlendeki saf suya eklendi.
50 mM NaHCO ₃	4.2 g NaHCO ₃ bir miktar saf su ile çözündürülerek hacim 100 mL' ye tamamlandı.
2.5 mM HEPES (pH: 8.8)	6.51 g HEPES 900 mL saf suda çözündürülür, ardından pH 8.8' e ayarlanarak hacim 1000 mL' ye tamamlandı.
Doygun CO ₂ çözeltisi	Buzlu su içerisinde bulunan erlenin içine 1 L saf su konularak 45 dakika boyunca içerisinden CO ₂ geçirildi.
0.025 M Sülfanilamid Çözeltisi	215 mg sülfanilamid 50 mL asetonitril ile çözündürüldü.
0.005 M Asetazolamid Çözeltisi	55 mg asetazolamid 50 mL asetonitril ile çözündürüldü.
0.1 mg/mL BCA Çözeltisi	1 mg BCA 10 mL 50 mM'lık Tris çözeltisinde çözündürüldü.

5.1.4. Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitkiler aktardan temin edildi. Bitkiler öncelikle varsa nemini ortadan kaldırmak için 40 °C'de kurutucu ünitesinde bekletildi. Kurutma işleminin sonlanması ardından bitkilerin her birinden 5 g alınıp 50 mL organik çözücüde iki saat karıştırıldı. Çalışma boyunca ekstraktlar için metanol, asetonitril ve saf su olmak üzere üç farklı organik çözücü kullanıldı. Asetonitril ve metanol % 40 asetonitril ya da metanol % 60 su karışımı oluşturularak ekstraktlar hazırlandı. İki saat süren karışma işleminin ardından numuneler adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Ardından tamamen berrak olması için şırıngayla filtreden geçirilerek süzme işlemi tamamlandı. Hazırlanan ekstraktların nihai hacmi tamamlandıktan sonra iki kısma ayrıldı. İlk kısım

enzim inhibisyonu için diğer kısım ise fenolik bileşenleri belirlemek için ayrıldı. Çalışmada enzim inhibisyonu için standart olarak asetazolamid ve sulfanilamid kullanıldı. Bu standartlar kullanılacağı zaman organik çözücü olarak asetonitril kullanıldı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Protein Saflaştırma Tekniği

5.2.1.1. Karbonik Anhidrazın Sığır Eritrositlerinden İzolasyonu

Sığır karbonik anhidraz (BCA) enzimini eritrositlerden elde edebilmek için sulfanilamidin sepharose-4B'ye kenetlenmiş şekilde kullanıldığı afinite kromatografisinden yararlanıldı. Bu işlem sonucunda elde edilen enzimler +4 °C' de bekletildi ve gerektiğinde çalışmamız için çözeltileri hazırlanarak kullanıldı.

5.2.1.2. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli hazırlanırken literatürde de çokça kullanılmış ve yerleşik bir yöntem haline gelmiş olan sepharose 4B 'deki serbest hidroksil gruplarının siyanojen bromür (CNBr) ile aktifleştirilmesinin ardından tirozin kovalent olarak takıldı. Ardından enzimin kolonda uzantı kolu olarak tutulmasını sağlamak amacıyla karbonik anhidraz enziminin güçlü inhibitörlerinden olan sulfanilamidin kenetlenmesiyle işleme devam edildi. Bu jel kullanılarak hayvan eritrositlerinden elde edilen BCA saflaştırıldı (51).

5.2.1.3. Sepharose 4B' nin Aktifleştirilmesi

Aktifleştirilmiş sepharose 4B jelini hazırlamak için 20 mL sepharose 4B alınarak soğuk saf su ile birkaç kez yıkandı ve sulu olan kısım her yıkama sonunda dekante edilerek ayrıldı. Bu işlem buz banyosunda uygulandı. Ardından sepharose 4B'ye kendi hacmi kadar saf su ilave edildi. Bu süspansiyon karıştırıcı ile karıştırılırken toz halindeki 4 g CNBr ilave edildi. CNBr zehirli olduğu için tartım ve ardından karıştırma işlemi çeker ocakta yapıldı. Bu işlem buz banyosunda devam ederken pH'yı 11'e getirmek için 4 M NaOH yavaşça ilave edildi. Bu işlemler sırasında ortam sıcaklığının düşmemesi için buz ilavesi yapıldı. pH 11'de sabitlenene kadar bu işleme devam edildi ve yaklaşık olarak 15 dakika sürdü. Ardından buchner hunisiyle süzme işlemi gerçekleştirildi. Son olarak da 250 mL pH 10 olan soğuk 0.1 M NaHCO₃ çözeltisi ile yıkama yapılarak jel bir behere aktarıldı (51).

5.2.1.4. Tirozin Takılması

Behere aktarılmış olan jelin yıkama işleminde kullanılmış olan 0.1 M NaHCO₃ çözeltisinin 40 mL' si ile 80 mg L- tirozin karıştırılarak yeni bir çözelti hazırlandı ve sepharose 4B üzerine ilave edildi. Aktifleştirilmiş sepharose 4B'nin pH'sının 11'e ayarlanmasının ardından L- tirozin ilave edilmesi işlemleri çok hızlı bir şekilde yapıldı. Bunun nedeni CNBr' nin jelin hidroksil gruplarına takılarak oluşturmuş olduğu –OCN yapısının kararlılığının çok düşük olmasıdır. Bu işlemler sırasında sürenin uzaması aktifleşmiş olan bu grupların tekrar –OH gruplarına dönüşmesine ve tirozin takılmasının gerçekleşmemesine neden olabilir (51).

Süspansiyon +4 °C'de iki saat boyunca yavaş bir şekilde karıştırıldı. Bu süre sonunda tirozin bağlanması gerçekleşmiş oldu ve iki saatlik karışmanın ardından yine +4 °C'de 16 saat boyunca bekletildi. Bu bekleme süresinin ardından jelin yıkama suyu 280 nm' de absorbans vermeyinceye kadar saf su ile yıkandı. Bu işlemin yapılma sebebi reaksiyona girmemiş olan tirozin varsa ortamdan uzaklaştırmaktır. Daha sonra jel 100 mL 0.2 M NaHCO₃ (pH:8.8) ile yıkandı. Bu işlemler sonunda tirozin takılması gerçekleşmiş olan jel 40 mL NaHCO₃ çözeltisinin içine ilave edildi (51).

5.2.1.5. Sülfanilamid Kenetlenmesi

Sülfanilamid 25 mg alınarak 10 mL 1 M HCl ile buz banyosunda çözüldü. Başka bir yerde buz banyosunda bekletilmiş olan 75 mg NaNO₂ içeren 5 mL çözelti yavaşça sülfanilamid çözeltisine ilave edildi. Yaklaşık 10 dakika içinde amonyağa benzer keskin bir koku hissedildi. Bu keskin koku sülfanilamidin diazolandığı anlamına gelir. Bu koku hissedildikten sonra sülfanilamid çözeltisi önceden hazırlanmış olan ve içerisinde sepharose-4B-L-tirozin bulunan 40 mL süspansiyon üzerine ilave edildi. Süspansiyonun pH'nın 9.5'e ayarlanması için 1 M NaOH çözeltisi kullanıldı. pH 8 civarına geldiğinde renk kırmızıya dönmeye başladı. Kırmızıya dönen 9.5 pH'a sahip olan jel oda sıcaklığında üç saat boyunca yavaşça karıştırıldı. Süspansiyon bu işlemlerden sonra buchner hunisiyle süzüldü ve ardından önce 100 mL saf su ile daha sonrada 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH:7.4) ile yıkandı. Bu işlemler boyunca jelin kurumamasına dikkat edildi. Jel bu yıkamalardan sonra Tris-SO₄ tamponu içerisinde kolona yüklenene kadar +4 °C' de bekletildi (51).

5.2.2. Kan Numunelerinin Alınması

Sığır kanından karbonik anhidraz enzimini saflaştırmak için kan mezbahadan taze olarak alındı ve bekletilmeden ayırma işlemine başlandı.

5.2.2.1. Hemolizat Hazırlanması

Kan numunelerinden eritrositleri ayırmak için önce 10 mL'lik tüplerde 2500 rpm' de 15 kan santrifüjlendi ve üst kısımdaki lökosit ve plazma kısımları atıldı. Bu işlemin ardından eritrositler % 0.9 NaCl çözeltisi ile üç kez yıkandı ve her yıkamanın ardından çalkalama, santrifüjleme ve üst kısmın atılması işlemi tekrarlandı.

İzotonik NaCl çözeltisiyle yıkanmış olan eritrositlerin üzerine hacimlerinin 1.5 katı kadar soğuk saf su ilave edildi. Soğuk saf su ilave edilmesinin sebebi hücre zarının kırılabilirliğini artırmaktır. Soğuk saf su ilave edilen eritrositler bir behere konularak +4 °C'de yarım saat boyunca karıştırılarak eritrositlerin tamamen hemoliz olması sağlandı. Bu işlemler sonunda elde edilen hemolizattan hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4 °C' de 20 000 rpm' de 40 dakika santrifüj edildi. Bu santrifüjleme işleminin ardından üst kısımlarda bulunan hemolizat alt kısımda bulunan hücre zarlarının alınmamasına dikkat edilerek pastör pipetle alınarak bir beherde biriktirildi. Bu işlem sonrasında biriken hemolizatın pH' sın 8.7'ye ayarlamak amacıyla içine katı Tris atılarak manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Hemolizatın pH' sı sabitlendikten sonra kolona verilene kadar +4 °C'de bekletildi. Hemolizat birkaç gün içinde kolona verildi.

5.2.2.2. Kolonun Hazırlanması ve Hemolizatın Kolona Yüklenmesi

Hazırlanıp +4 °C' de bekletilen jelin üzerindeki çözelti dekante edilerek uzaklaştırıldı ve dengeleme tamponu (25 mM Tris/0.1 M Na₂SO₄, pH=8.7) ilave edildi. Aynı zamanda dengeleme tamponu alt ucu sinterleşmiş camdan oluşmuş olan süzme sistemine sahip kolona dolduruldu ve peristaltik pompa çalıştırılarak boruların dengeleme tamponuyla dolması sağlandı. Bu sırada kabarcık kalmaması sağlanmaya çalışıldı. Kolondaki tampon seviyesi üst ucun biraz altına kadar ve seviyenin görülebilecek kadar olmasına dikkat edildi. Tampon seviyesi ayarlandıktan sonra peristaltik pompanın akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde ayarlandı ve kolona giden borunun boş ucu jel süspansiyonuna daldırılarak jel kolona yüklenmeye başlandı. Kolona jelin yüklenmesi sırasında kabarcık ve çatlak oluşmamasına dikkat edildi. Jelin

kolona sorunsuz bir şekilde yüklenmesinin ardından dengeleme tamponu 24 saat boyunca aynı hızda kolona verildi ve jelin tamamen kolona yüklenmesi sağlanmış oldu.

Dengeleme tamponu 24 saat kolona verildikten sonra hemolizatin kolona yüklenme işlemi gerçekleştirilmektedir. Bunun için dengeleme tamponuna daldırılmış olan boru ucu tampondan çıkarılarak hemolizata daldırıldı. Akış hızının aynı olmasına dikkat edildi. Yüklenecek hemolizat bittiğinde kolona hemolizattan kaynaklanan istenmeyen bütün bileşiklerden kurtulmak için yıkama tamponu (25 mM Tris / 22 mM Na₂SO₄, pH=8.7) verildi. Bu sırada elde etmek istediğimiz BCA kolona tutundu. Yıkama işlemine hemolizattan kaynaklanan kırmızı renk kaybolup 280 nm’de absorbansı 0.02’ nin altına düşene kadar devam edildi.

5.2.2.3. Sığır (Bovine) Karbonik Anhidrazın Elüsyonu

Sığır karbonik anhidraz enziminin kolondan alınması için BCA elüsyon tamponu (0.1 M CH₃COONa/0.5 M NaClO₄, pH=5.6) kolona verilir. Bu aşamada da akış hızı aynıydı. On beş dakikada bir tüp değiştirilerek her tüpte 5 mL enzim birikmesi sağlanmış oldu. Bu işleme 280 nm’de absorbans 0.02’ye düşene kadar devam edildi. Elde edilen BCA eluatları +4 °C’de saklandı. Elüsyon işlemi bittikten sonra kolona tekrar dengeleme tamponu verildi ve tekrar sisteme hemolizat yüklenene kadar kolon +4 °C’ de saklandı.

5.2.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Belirlenmesi

5.2.3.1. Esteraz Aktivitesi

Esteraz aktivitesi bitki ekstraktları ile yapılırken 24 dakika boyunca 12 dakikada bir okuma yapılarak absorbans takibi yapıldı. Esteraz aktivitesi ile inhibisyon bakılırken numune çözeltisinde enzim, bitki ekstraktı, Tris-SO₄ tamponu ve substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) kullanıldı. Kontrol olarak kullanılan çözeltide ise enzim, inhibitör çözücüsü, Tris-SO₄ tamponu ve substrat kullanıldı. Kontrol köründe enzim dışında kontrolde bulunan her şey kullanıldı. Numune köründe ise enzim yerine enzimin çözücüsü olan saf su ilave edildi. İnhibisyon yüzdesini bulmak için yapılan hesaplamada körler numune ve kontrolden çıkarılarak kontrol testine göre sonuçlar belirlendi. Çalışma boyunca her numune ve kontrolü için üç paralel kullanıldı. Kullanılan standartların ve bitki ekstraktlarının % inhibisyonunun belirlenmesi için hesaplamada kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

$\% \text{ inhibisyon} = ((\text{Kontrol absorbansı} - \text{Numune absorbansı}) / (\text{Kontrol absorbansı})) * 100$

5.2.3.2. Hidrataz Aktivitesi

Hidrataz aktivitesi Wilbur- Anderson yöntemi ile yapıldı (48). Bu yöntemle göre bitki ekstraktlarına hidrataz aktivitesi uygulanırken substrat olarak doymun CO₂ çözeltisi kullanıldı ve 50 µM enzim, 2400 µL HEPES tamponu, 2500 µL doymun CO₂ çözeltisi içeren karışımla hidrataz aktivitesi belirlendi. İnhibisyon çalışması yapılırken, hazırlanmış olan bitki ekstraktlarından 50 µL alınarak aktivite bakılırken hazırlanan karışıma ilave edildi ve inhibisyon belirlendi. Reaksiyon boyunca CO₂ ve reaksiyonun olduğu tüpler buzlu su içinde bekletildi. Bu yöntemle bitki ekstraktlarının BCA enzimi üzerindeki % inhibisyonuna bakılırken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((\text{Numune-Kontrol}) / (\text{Numune Köru- Kontrol})) * 100$$

5.2.4. Yüksek performanslı Sıvı Kromatografisi- Ultraviyole (HPLC-UV) ile Fenolik Bileşenlerin Tayini

5.2.4.1. Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi- Ultraviyole (RP-HPLC-UV) Koşulları

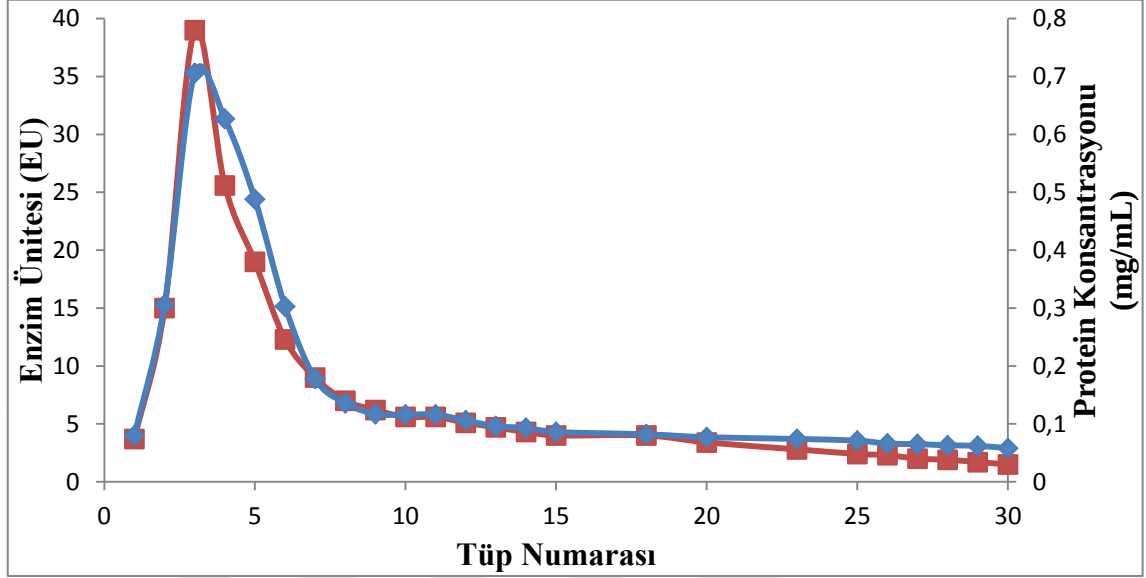
HPLC-UV analizleri 280 nm’de UV-Vis dedektör ile donanımlı Agilent chem station yazılımlı HPLC sisteminde gerçekleştirildi. Analizler ters faz C18 kolonu (25x 4.6 mm, 5 µm) kullanılarak ve asetonitril, su ve asetik asit gradient programı uygulanarak gerçekleştirildi. C rezervuarında % 3 asetik asit (ultra saf suda) ve D rezervuarında % 3 asetik asit, % 25 asetonitril, % 72 ultra saf su bulunan gradient programı Tablo 4’de verildi. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 20 µL’ ye mobil faz akışı ilk on dakika 0.6 mL.dk⁻¹, ya daha sonraki süre boyunca 0.8 mL.dk⁻¹ ya ve kolon sıcaklığı 20 °C ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı.

Tablo 4. HPLC gradient koşulları

Zaman (dk)	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Akış Hızı (mL/dk)
0	-	-	90	10	0.6
10	-	-	80	20	0.6
17	-	-	70	30	0.8
22	-	-	50	50	0.8
32	-	80	20	80	0.8
40	-	80	20	80	0.8
45	-	80	-	20	0.8
50	-	80	-	20	0.8
55	-	80	90	10	0.8
60	-	80	90	10	0.8

6. BULGULAR

6.1. Saflaştırılan Sığır Karbonik Anhidraz Enziminin Hidrataz Aktivitesi ile Protein Konsantrasyonunun Tayini

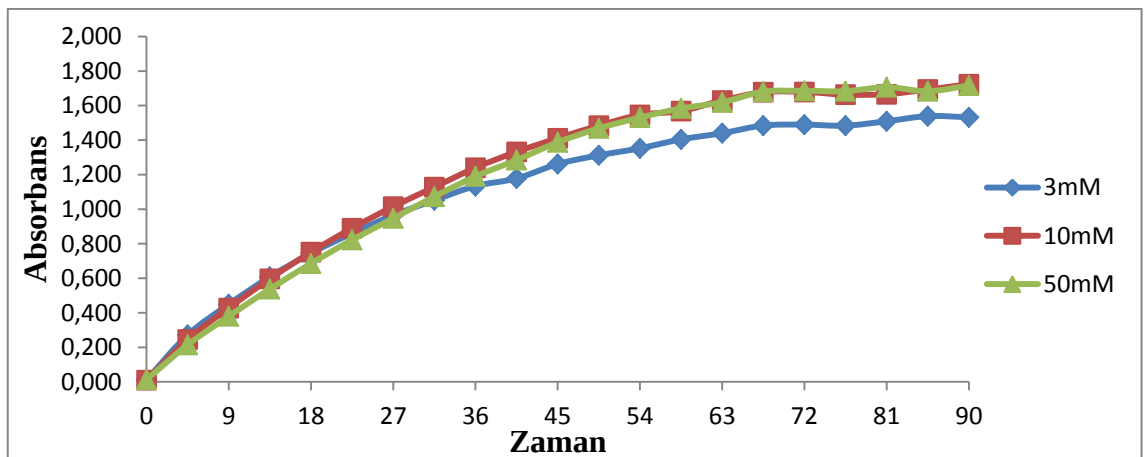


Şekil 2. Tüp numarasına göre hidrataz aktivitesi ile protein tayini

6.2. Esteraz Aktivitesi

6.2.1. Tampon Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Esteraz aktivitesinde kullanılan Tris-SO₄ tamponunun optimizasyonu için, 3 mM, 10 mM ve 50 mM olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda Tris-SO₄ hazırlandı ve enzim aktivitesine karşı spektrofotometrede 348 nm de ölçümler alındı.

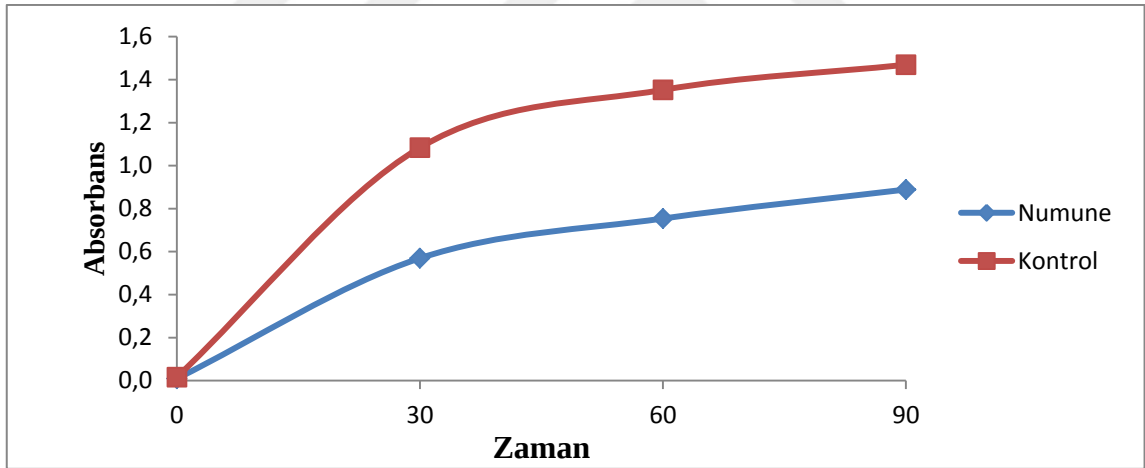


Şekil 3. Tris-SO₄ tamponu ile üç farklı konsantrasyonda esteraz aktivitesi

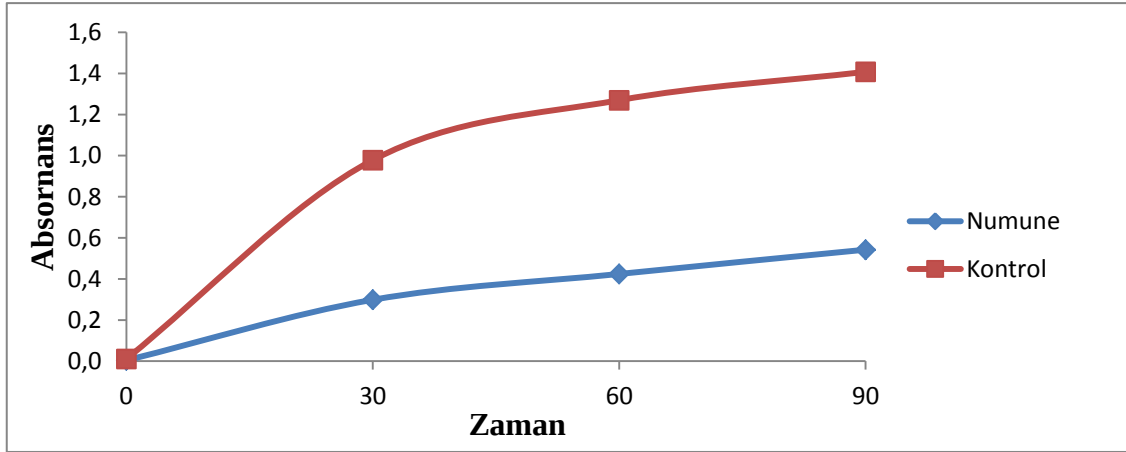
6.2.2. Esteraz Aktivitesi ile Bitki Ekstraktlarında İnhibisyon

Üç farklı çözücü (asetonitril, metanol, su) ile hazırlanan 12 bitki ekstraktı ile esteraz aktivitesi kullanılarak inhibisyon çalışması yapıldı. Öncelikle bazı ekstraktlar seçilerek 90 dakika boyunca esteraz aktivitesi 348 nm’de spektrofotometrede takip edildi. Bu çalışma sonucunda esteraz aktivitesinin kaçınıcı dakikaya kadar devam edileceğine karar verildi.

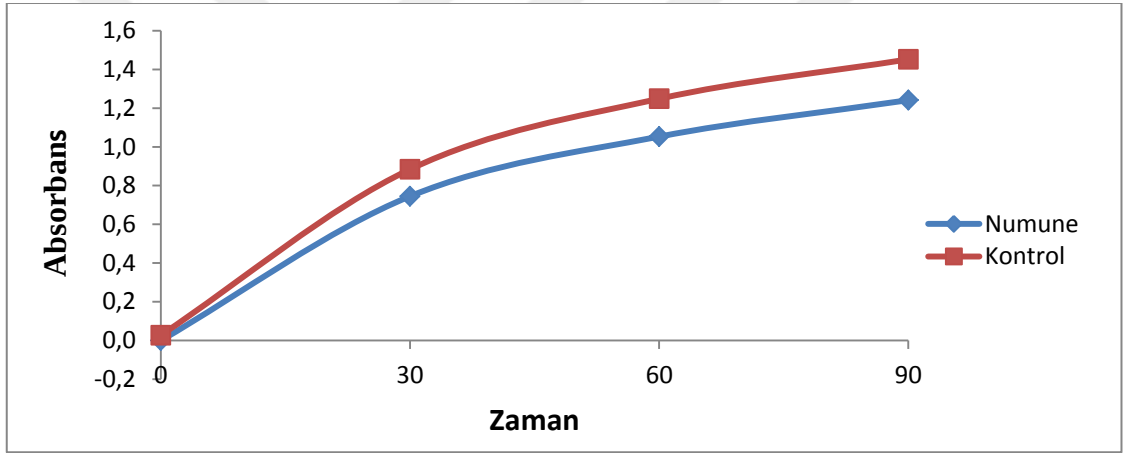
Esteraz aktivitesinde kullanılan Tris-SO₄ tamponunun konsantrasyonunu belirlemek için 3 farklı konsantrasyonda (3 mM, 10 mM, 50 mM) hazırlanan Tris-SO₄ tamponlarıyla yapılan çalışma sonucunda 50 mM Tris-SO₄ tamponunun uygun olduğu görüldü. Esteraz aktivitesi ile asetazolamid, sülfanilamid ve ormangülü (*R. luteum*) 90 dakika boyunca takip edildi ve Şekil 4, 5, 6’da görüldüğü gibi 30. dakikadan sonra lineerliğin bozulduğu görüldü. Bu sebepten dolayı esteraz aktivitesinin takip süresi 30 dakika olarak belirlendi. Otuzuncu dakikadan sonra numune ve kontrol absorbanslarının birbirlerine yaklaşması sebebiyle inhibisyon sonuçlarının anlamlı ifade edilemeyeceğine karar verildi. Bu sebeple 30 dakikalık esteraz aktivitesi takibi yapıldı.



Şekil 4. Asetazolamid % inhibisyonu (Sulu)



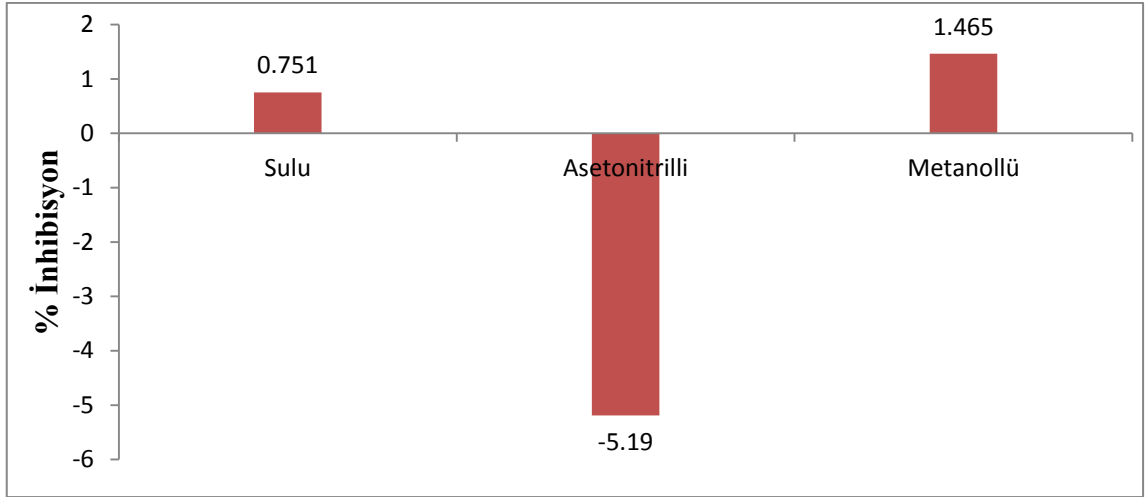
Şekil 5. Sülfanilamid % inhibisyonu (Sulu)



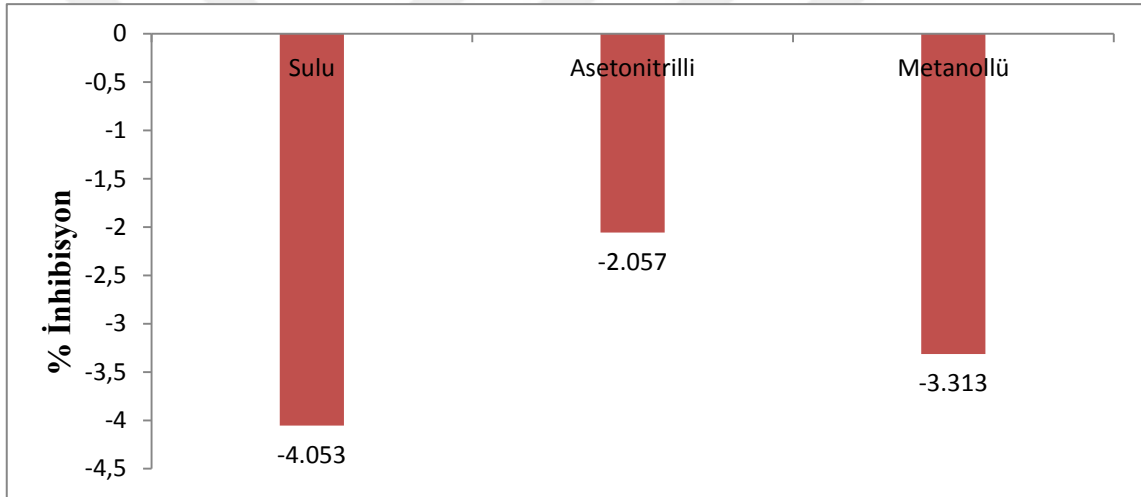
Şekil 6. Ormangülü (*R. luteum*) % inhibisyon (Sulu)

6.2.3. Esteraz Aktivitesi ile Üç Farklı Çözücüde Hazırlanmış Ekstraktlarla İnhibisyon

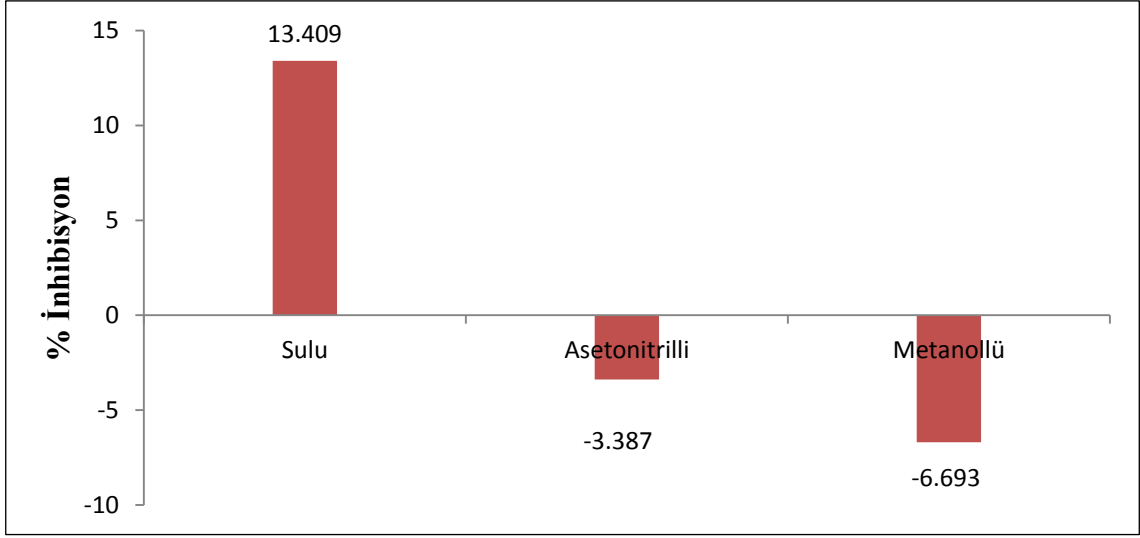
Esteraz aktivitesi 0.1 mg/mL BCA enzimi ile 50 mM Tris-SO₄ tamponu ve substrat olarak 3 mM *p*-nitrofenil asetat ile yapıldı. Bu çalışma sırasında kullanılan bitki ekstraktları su, asetonitril ve metanol ile çözündürüldü. Her bitkiden 5 g alınıp üç çözücüde de 50 mL ile çözündürüldü. Çözücü oranları asetonitril ve metanolde % 40 olarak belirlendi. Kalan kısmı su ile tamamlandı. Ekstraktların esteraz aktiviteleri dakikaya karşı % inhibisyon değeri olarak grafiğe geçirildi.



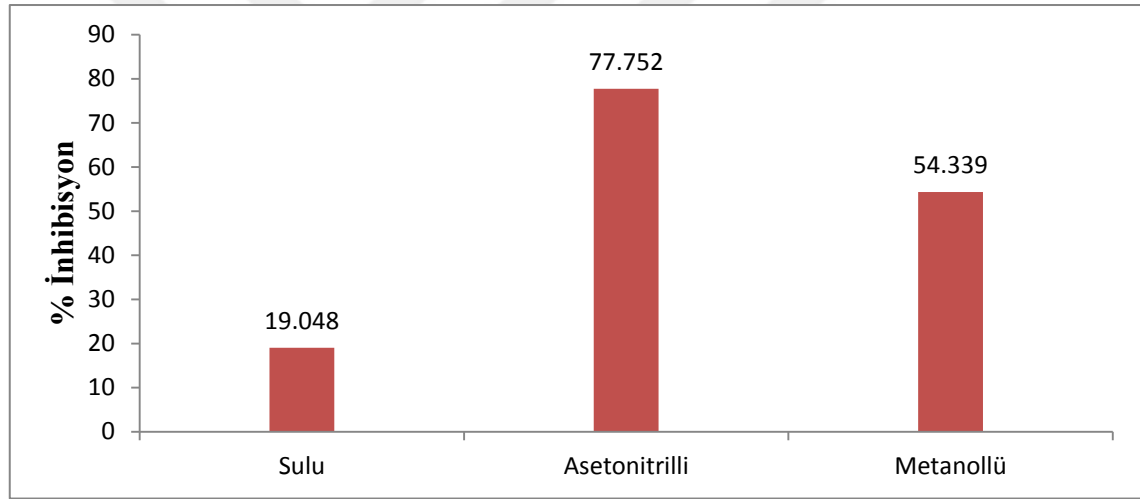
Şekil 7. Akasya ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



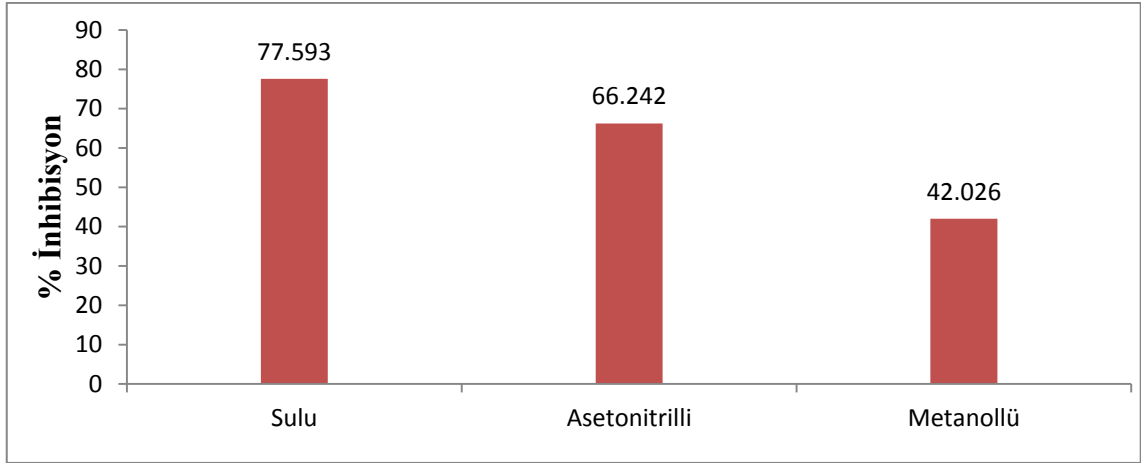
Şekil 8. Çörek otu ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



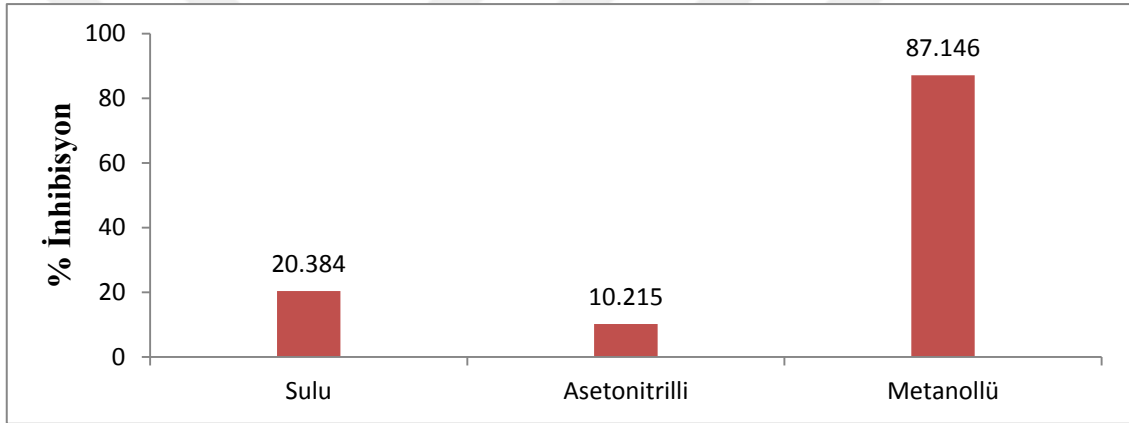
Şekil 9. Ekinezya ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



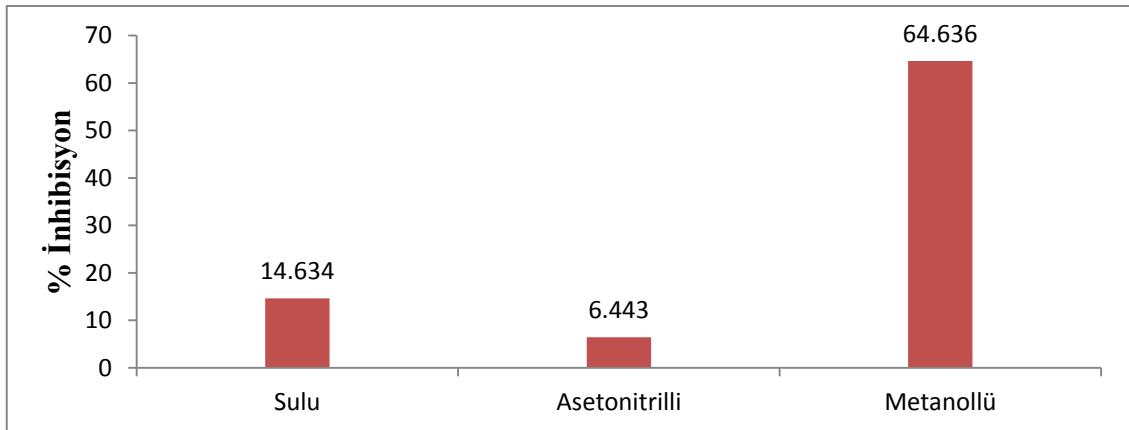
Şekil 10. Ihlamur ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



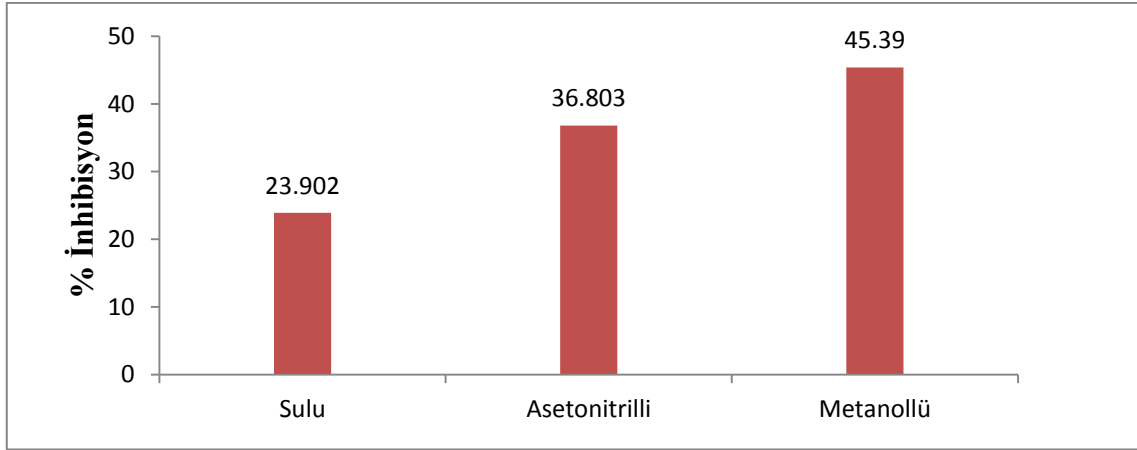
Şekil 11. Kekik ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu



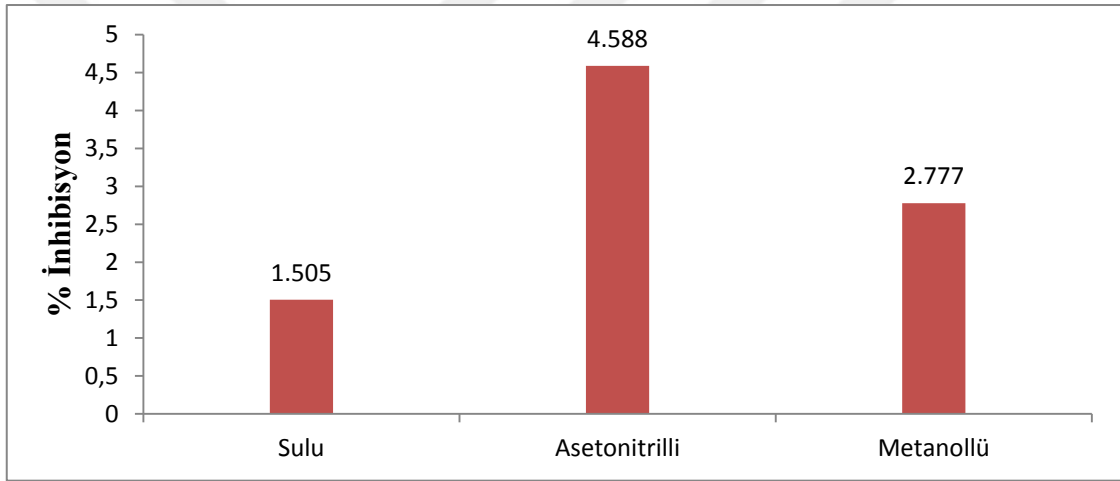
Şekil 12. Ormangülü (*R. ponticum*) ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu



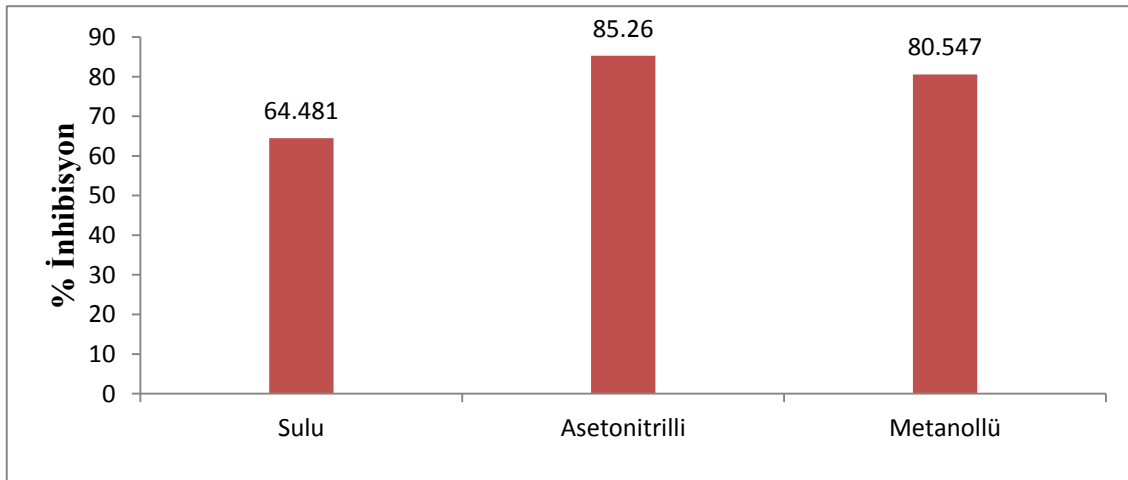
Şekil 13. Ormangülü (*R. luteum*) ile üç farklı çözücünde esterase aktivitesi ile % inhibisyonu



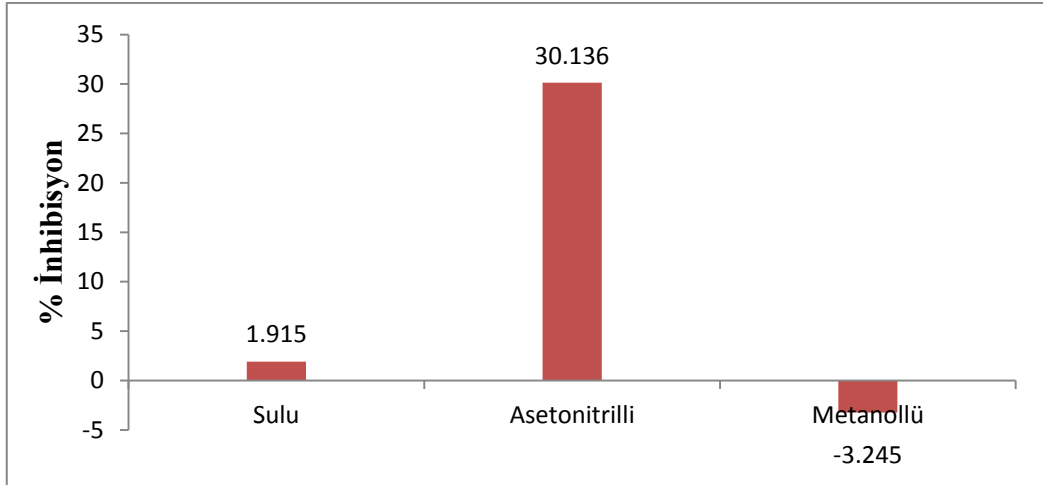
Şekil 14. Sarısabır ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



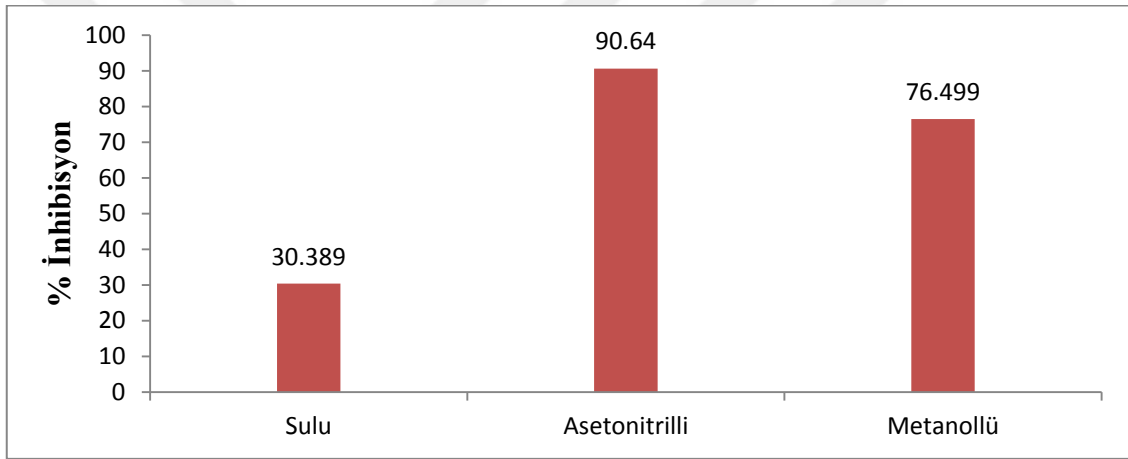
Şekil 15. Sinameki ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



Şekil 16. Tarçın ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



Şekil 17. Yaban mersini ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu



Şekil 18. Yeşil çay ile üç farklı çözücünde esteraz aktivitesi ile % inhibisyonu

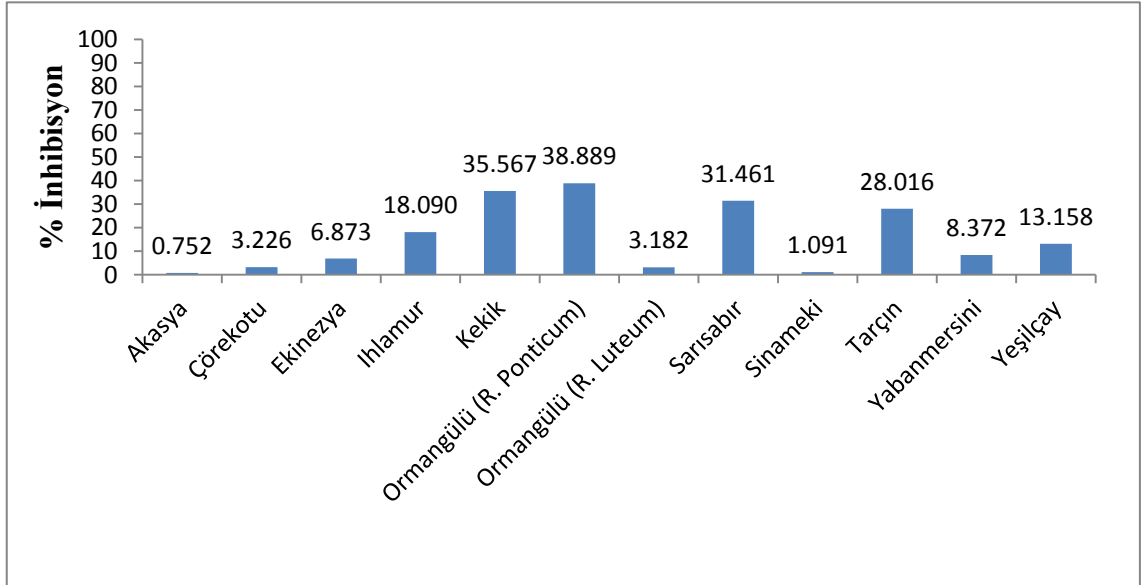
6.3. Hidrataz Aktivitesi

Hidrataz aktivitesi kullanılarak pH'ın 8.8'den 7.0' a düşene kadar geçen sürenin takibi yapıldı ve reaksiyon için 2.5 mM (pH: 8.8) HEPES tamponu, substrat olarak doymun CO₂ çözeltisi ve BCA enzimi kullanıldı.

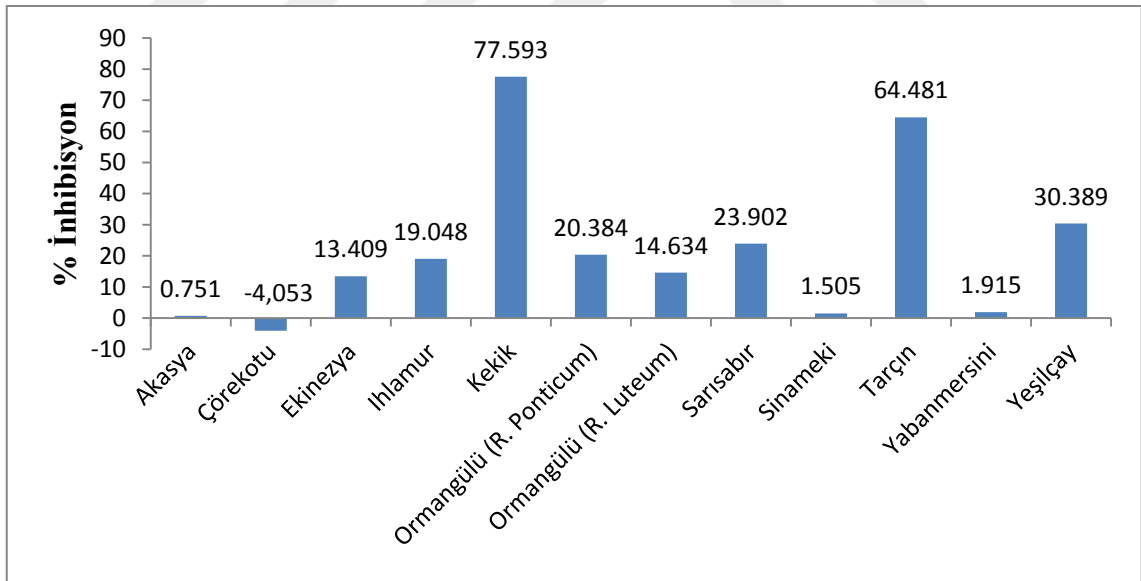
6.3.1. Hidrataz Aktivitesi ile Bitki Ekstraktlarında İnhibisyon

Hidrataz aktivitesi kullanılarak % inhibisyon değerlerine bakılması sırasında 2.5 mM (pH: 8.8) HEPES tamponu, substrat olarak doymun CO₂ çözeltisi ve BCA enzimi kullanıldı. Hidrataz ile aktivite bakarken kullanılan prosedürden farklı olarak 50 µL bitki ekstraktı kullanıldı. Reaksiyon boyunca karışımın bulunduğu tüp ve doymun CO₂

çözültisi buzlu su içerisinde bekletildi ve pH'nın 8.8'den 7.0'a düşmesine kadar geçen süre belirlendi.

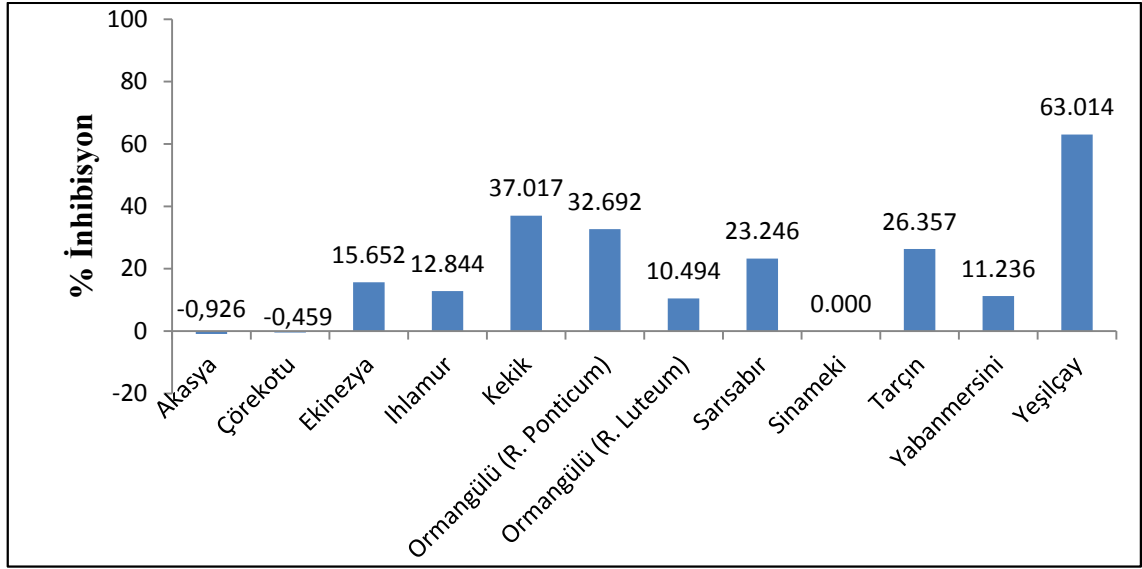


Şekil 19. Su ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

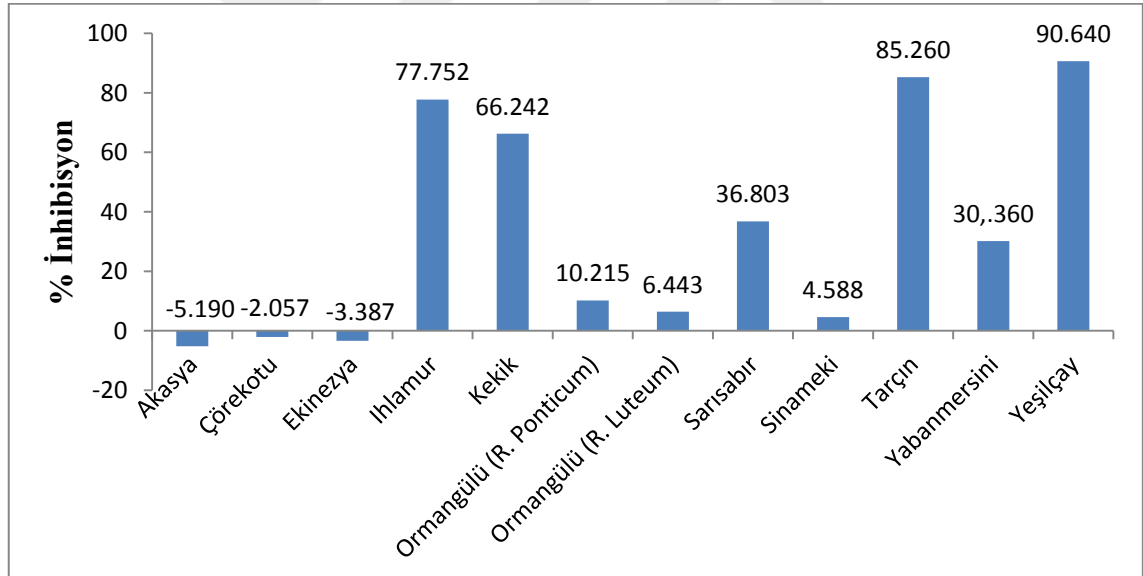


Şekil 20. Su ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

Sulu bitki ekstraktlarının BCA üzerindeki yüzde inhibisyonuna esteraz ve hidrataz aktivitesi ile bakıldı ve sonuçlar Şekil 19 ve Şekil 20'deki gibi gösterildi.

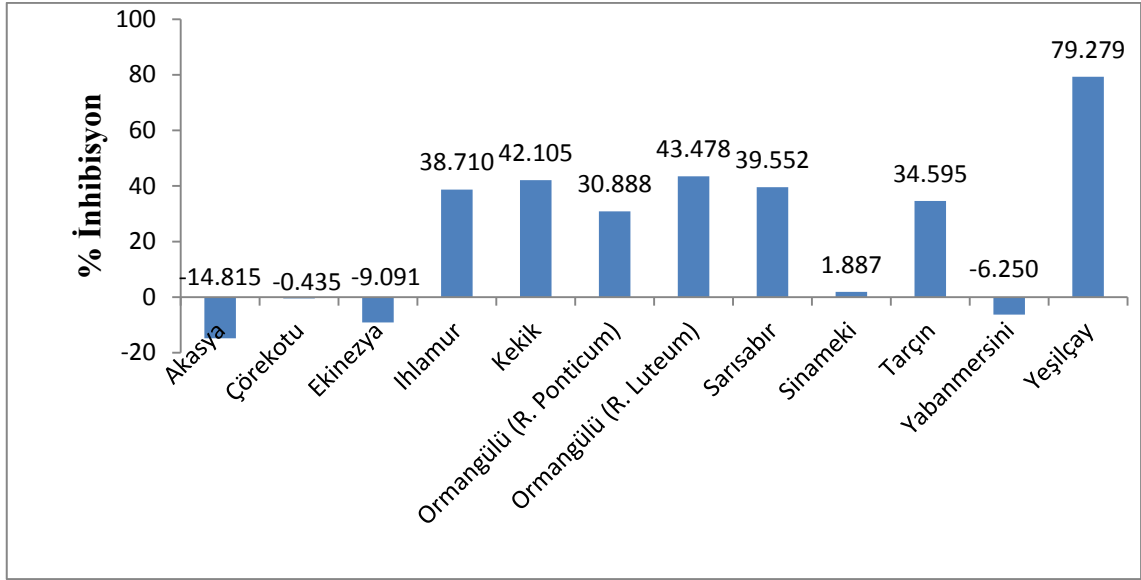


Şekil 21. Asetonitril ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

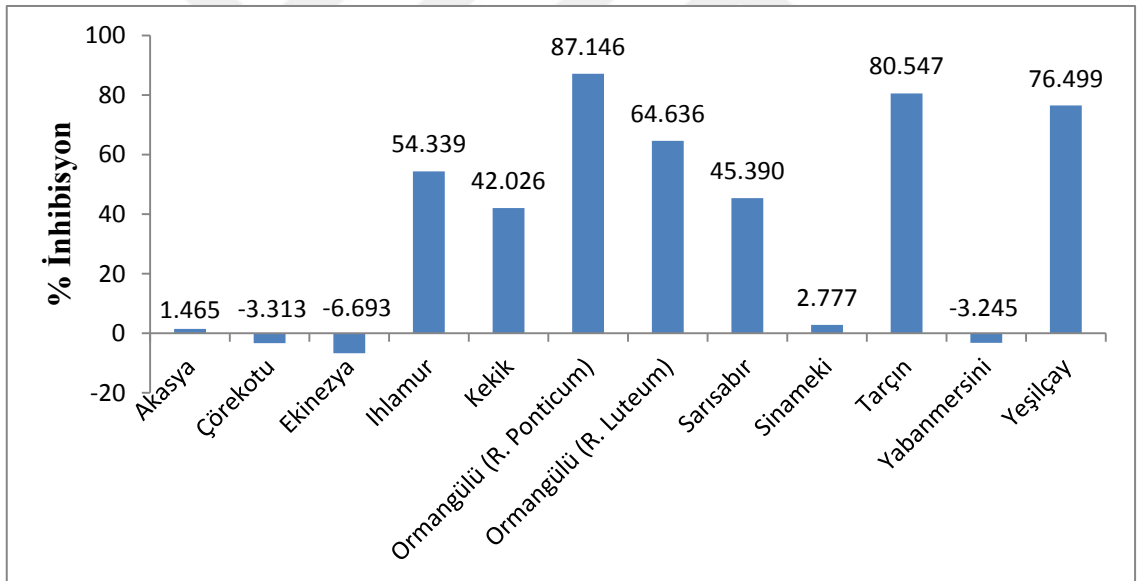


Şekil 22. Asetonitril ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

Asetonitrilli bitki ekstraktlarının BCA üzerindeki % inhibisyonuna esteraz ve hidrataz aktivitesiyle bakıldı ve sonuçları Şekil 21 ve Şekil 22’ deki gibi gösterildi.



Şekil 23. Metanol ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

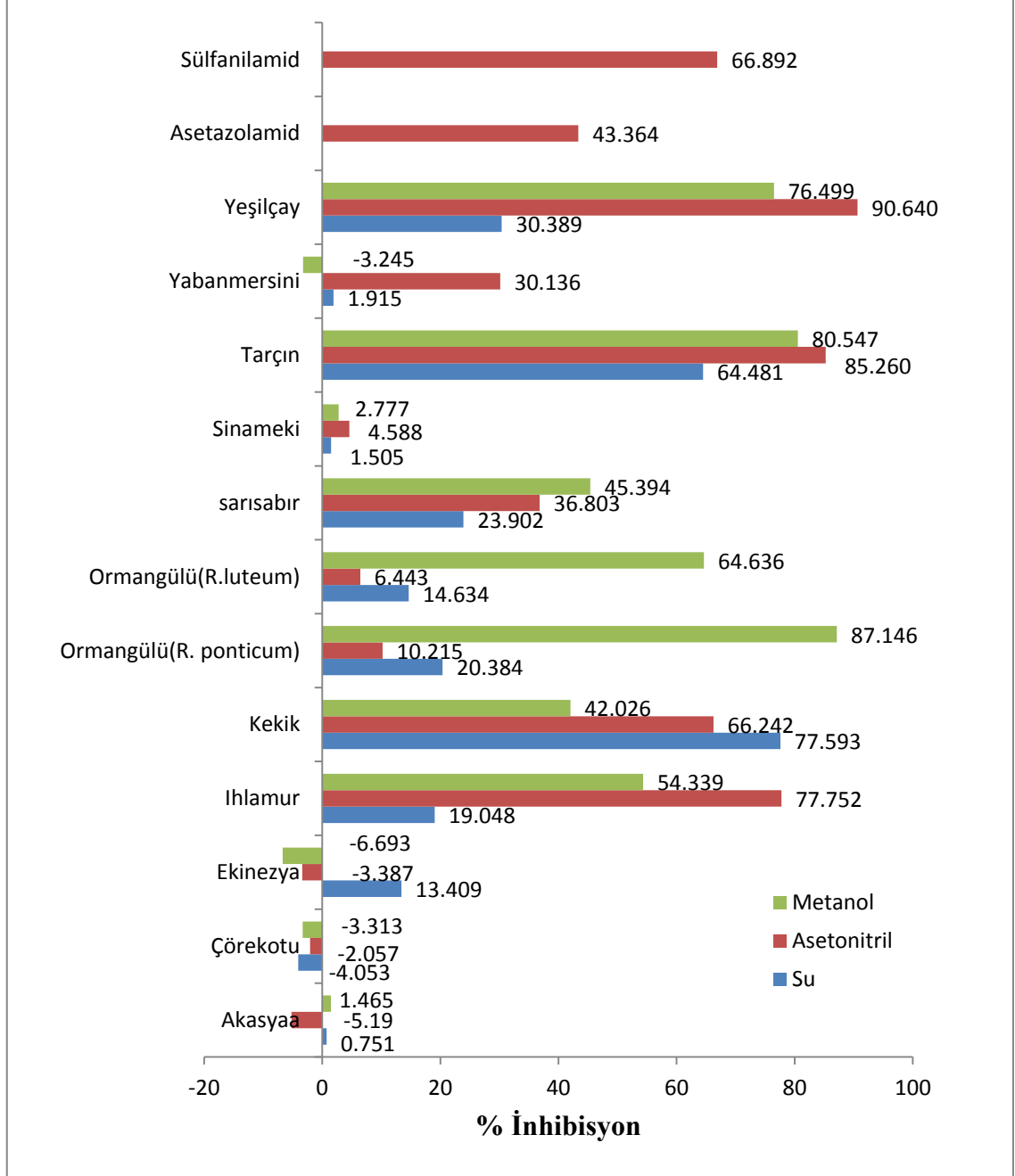


Şekil 24. Metanol ile çözündürülmüş 12 farklı bitki ekstraktının esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

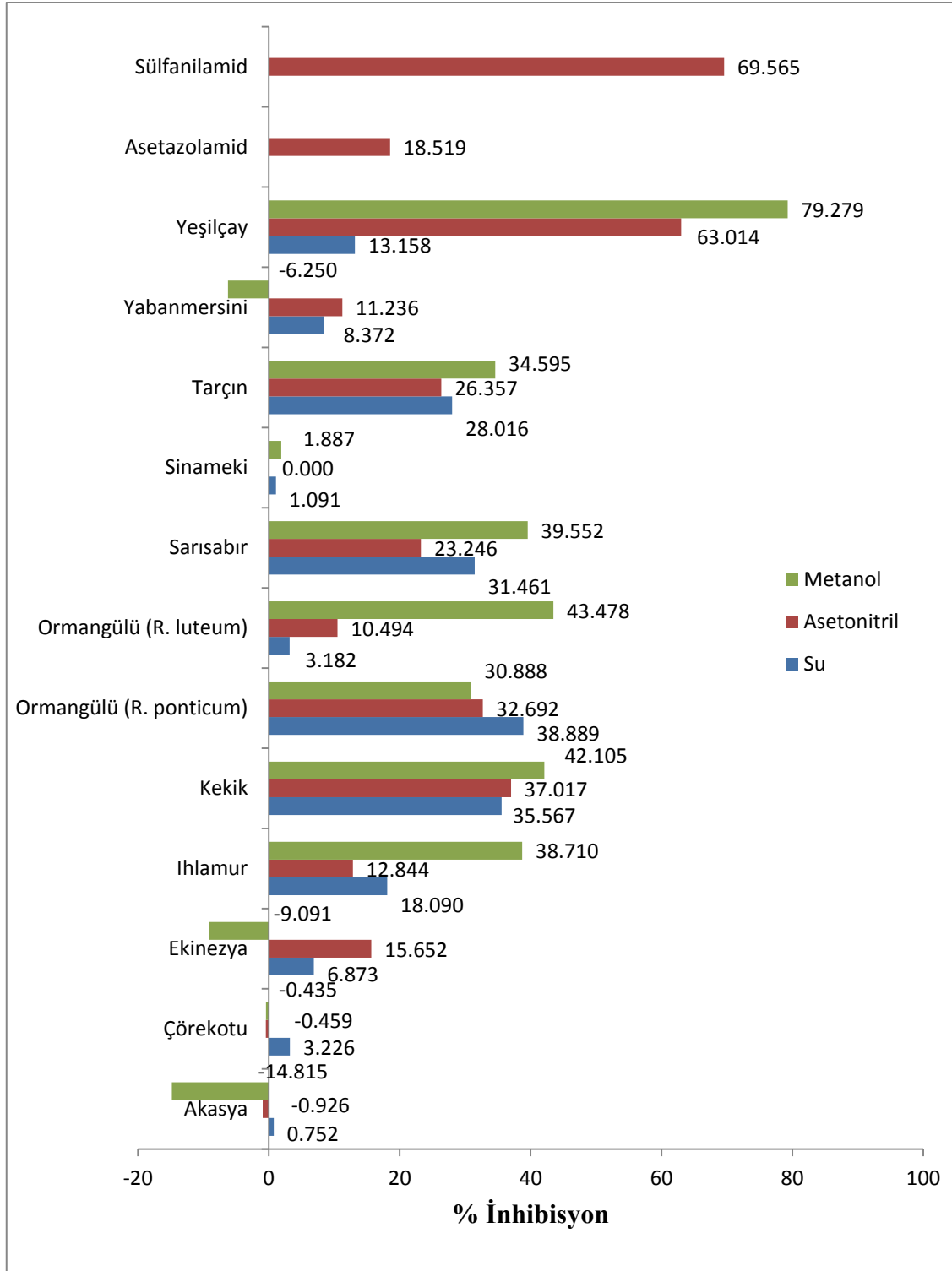
Metanollü bitki ekstraktlarının BCA üzerindeki % inhibisyonuna esteraz ve hidrataz aktivitesiyle bakıldı ve sonuçlar Şekil 23 ve Şekil 24' deki gibi gösterildi.

6.3.2. Üç Farklı Çözücü İçin 12 Bitki Ekstraktının Esteraz Aktivitesi ile Yüzde İnhibisyonlarının Karşılaştırılması

Su, asetonitril ve metanol ile çözündürülmüş olan 12 bitki ekstraktının esteraz aktivitesi kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplandı ve Şekil 25'teki gibi grafikte gösterildi.

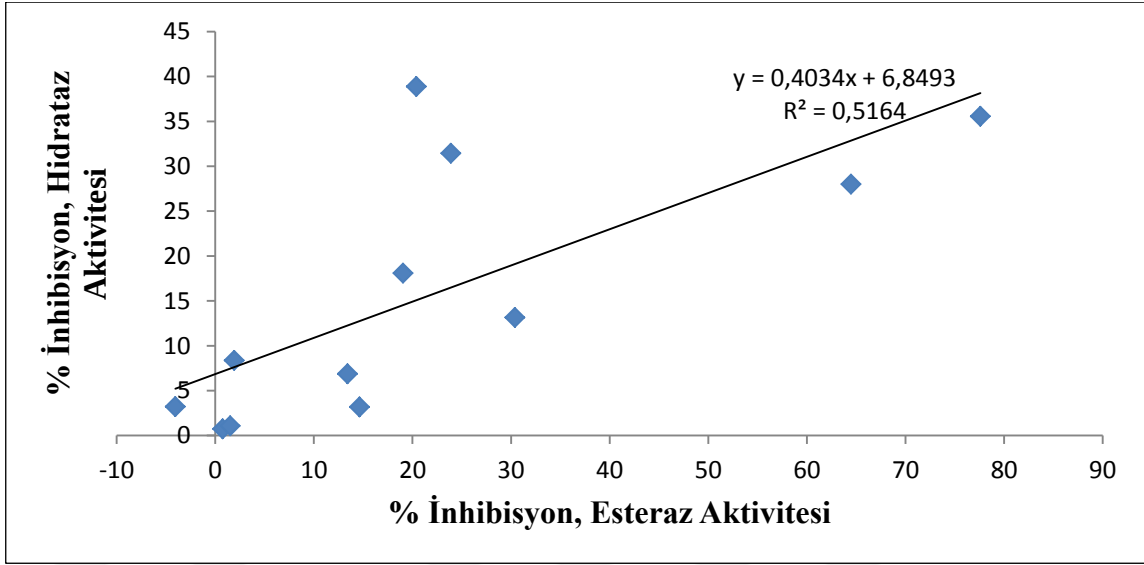


Şekil 25. Farklı 12 bitki ekstraktının üç farklı çözücüde esteraz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması



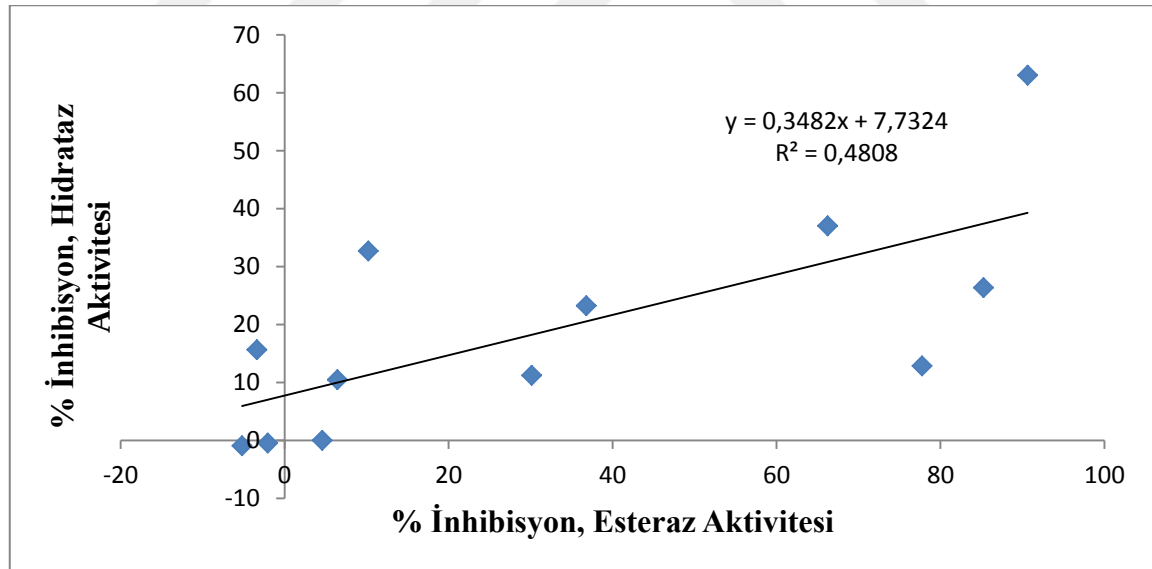
Şekil 26. Farklı 12 bitki ekstraktının üç farklı çözücünde hidrataz aktivitesi ile % inhibisyon değerlerinin karşılaştırılması

Üç farklı çözücünde hazırlanmış olan 12 ekstraktın BCA üzerindeki % inhibisyonları hidrataz aktivitesi kullanılarak bakıldı ve sonuçları Şekil 26'da olduğu gibi gösterildi.

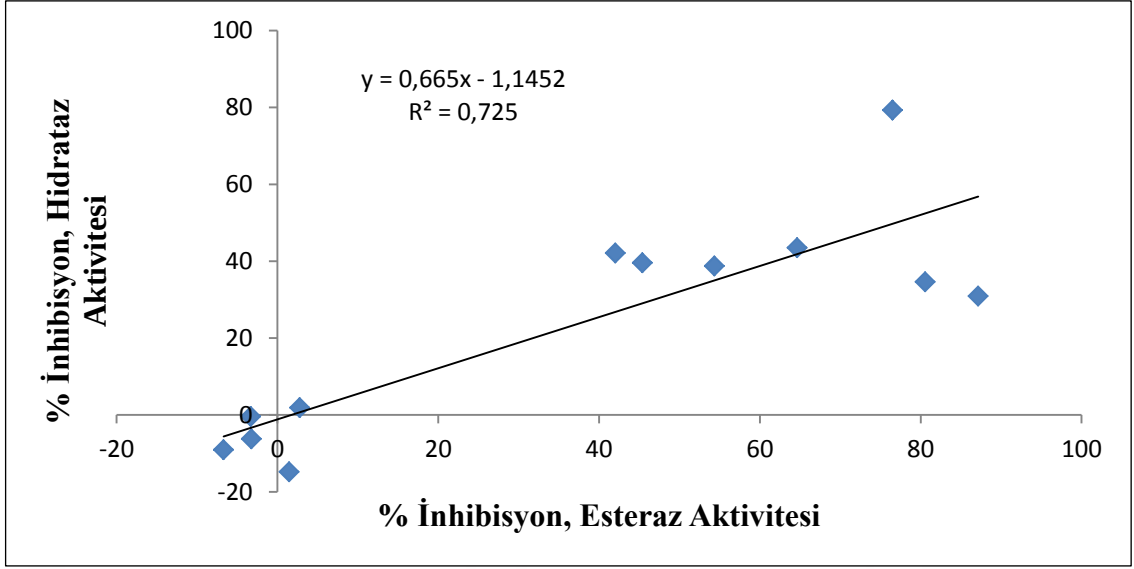


Şekil 27. Su ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarının esteraz aktivitesi ile hidrataz aktivitesinin % inhibisyon değerlerinin korelasyonu

Esteraz ve hidrataz aktivitesi kullanılarak su ile hazırlanmış 12 bitki ekstraktının BCA üzerindeki % inhibisyon değerlerinin korelasyon grafikleri Şekil 27’de verildi.



Şekil 28. Asetonitil ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarının esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesinin % inhibisyon değerlerinin korelasyon

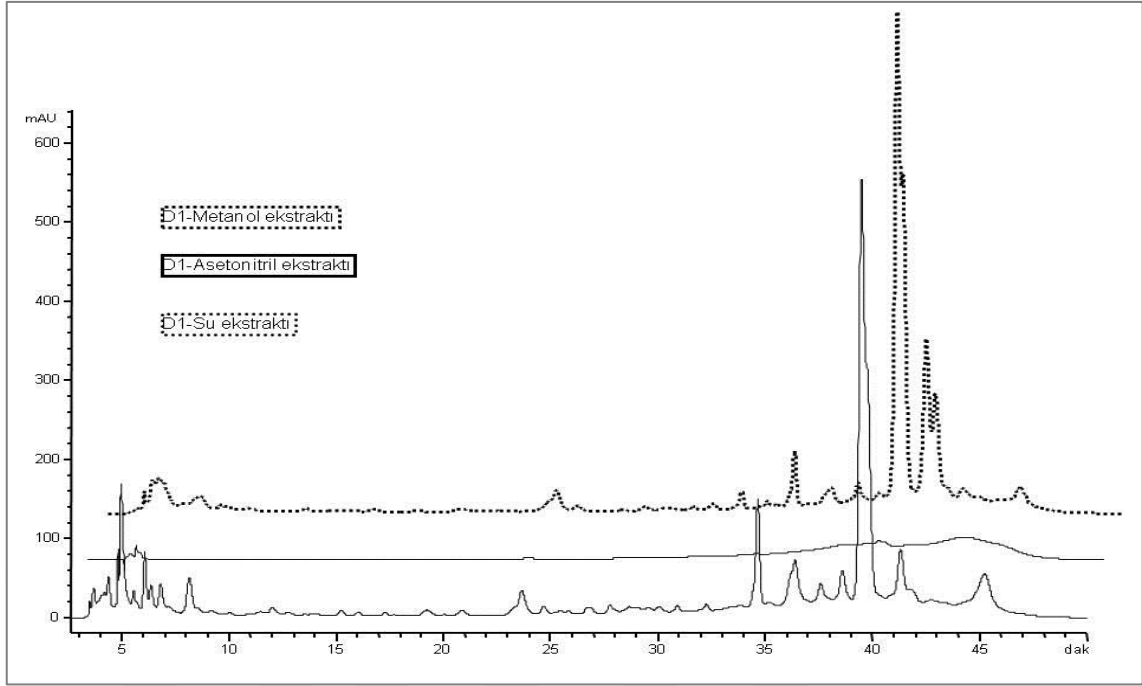


Şekil 29. Metanol ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarının esteraz aktivitesi ve hidrataz aktivitesinin % inhibisyon değerlerinin korelasyonu

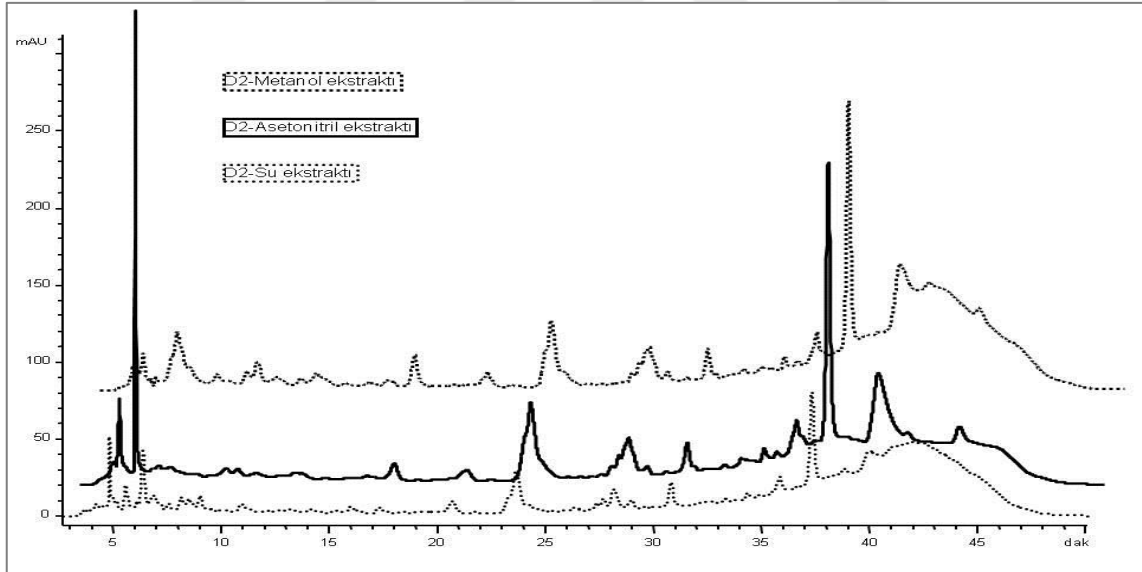
Üç farklı çözücü ile 12 bitki ekstraktı için % inhibisyon değerlerinin korelasyon grafikleri Şekil 27, 28, 29'daki gibi gösterildi. Bu grafiklerin sonuçlarına göre en yüksek korelasyon metanollü ekstraktlarda görüldü.

6.4. Hazırlanan Bitki Ekstraktlarının Kromatografik Analizi

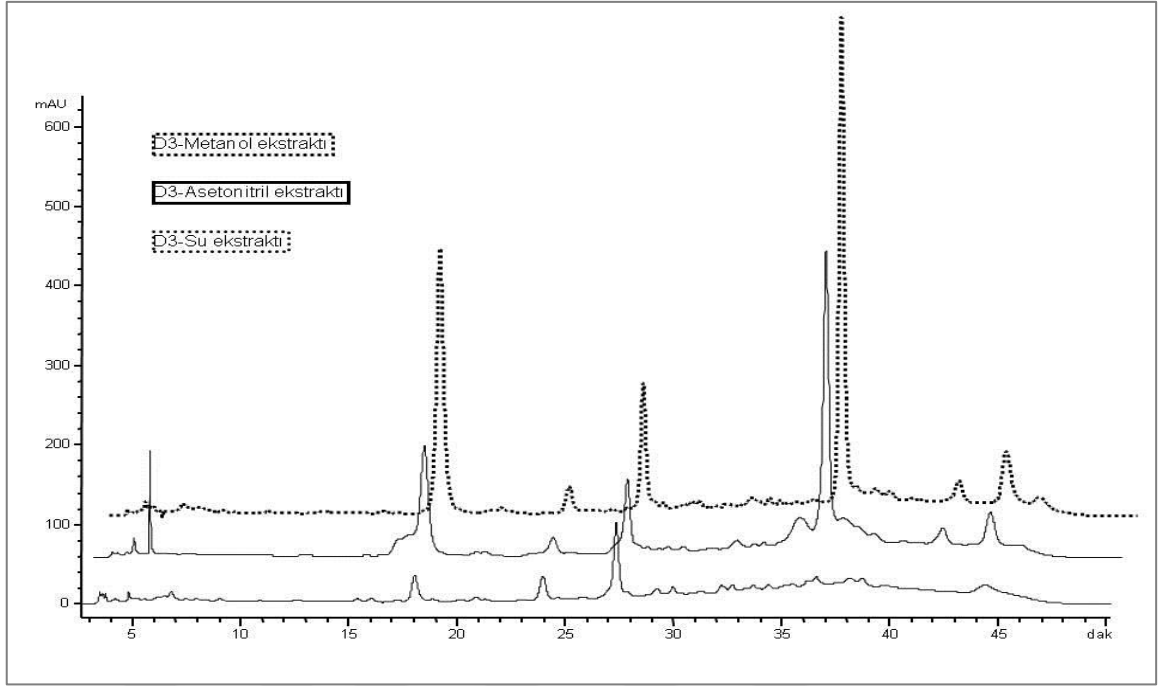
Karbonik anhidraz enzimi üzerine etkilerini araştırmak üzere üç farklı çözücü kullanılarak 12 bitki numunesinden hazırlanan ekstraktların fenolik profilleri ile ekstraktların gösterdikleri enzim inhibitör etkileri arasında bir ilişkinin olup olmadığını belirlemek amacıyla ekstraktların C18 kolon kullanılarak ters faz mantığıyla HPLC ayırımları yapılarak, fenolik bileşiklerin absorbands gösterdiği 280 nm'de kromatogramlar elde edildi. Her bir bitki numunesi için üç farklı çözücü ile elde edilmiş olan ekstraktlar karşılaştırmanın sağlanabilmesi için birleştirilerek şekillerle verildi. Her bir şekilde verilen kromatogramlar aynı ölçeğe verildiği için pik boyutları ya da toplam alan göz önüne alınarak karşılaştırma yapılabilir. Şekillerde üç kromatogramın görünürlüğünün sağlanması için kromatogramlar yukarı doğru hafif sağa kaydırılarak verildi.



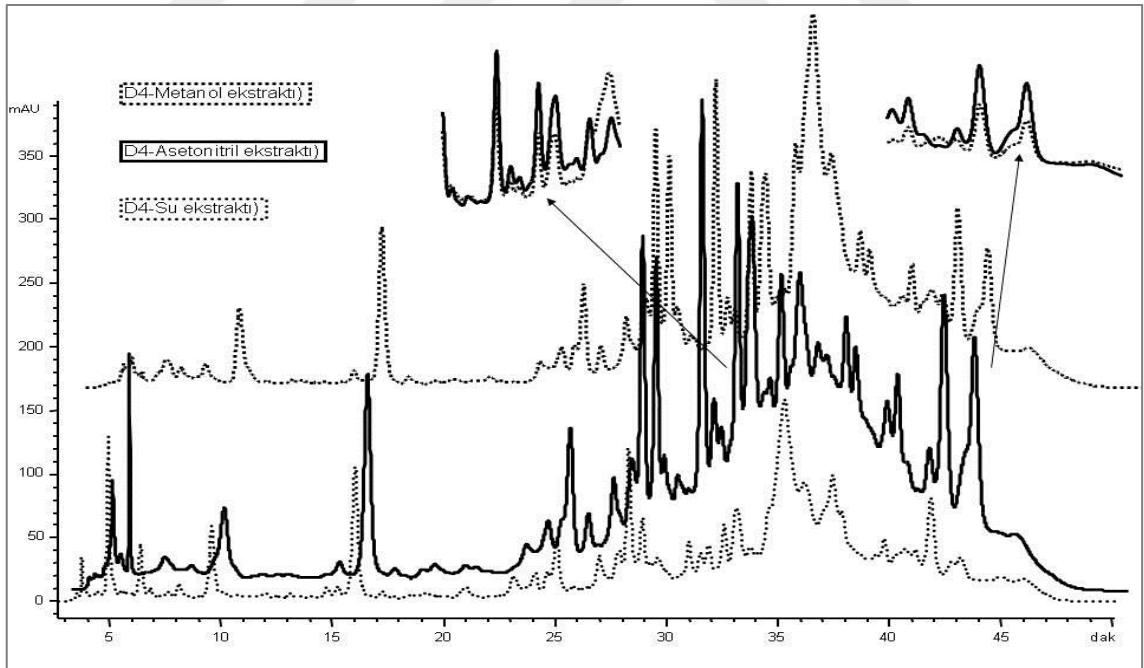
Şekil 30. Akasya çiçeği metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



Şekil 31. Çörekotu metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)

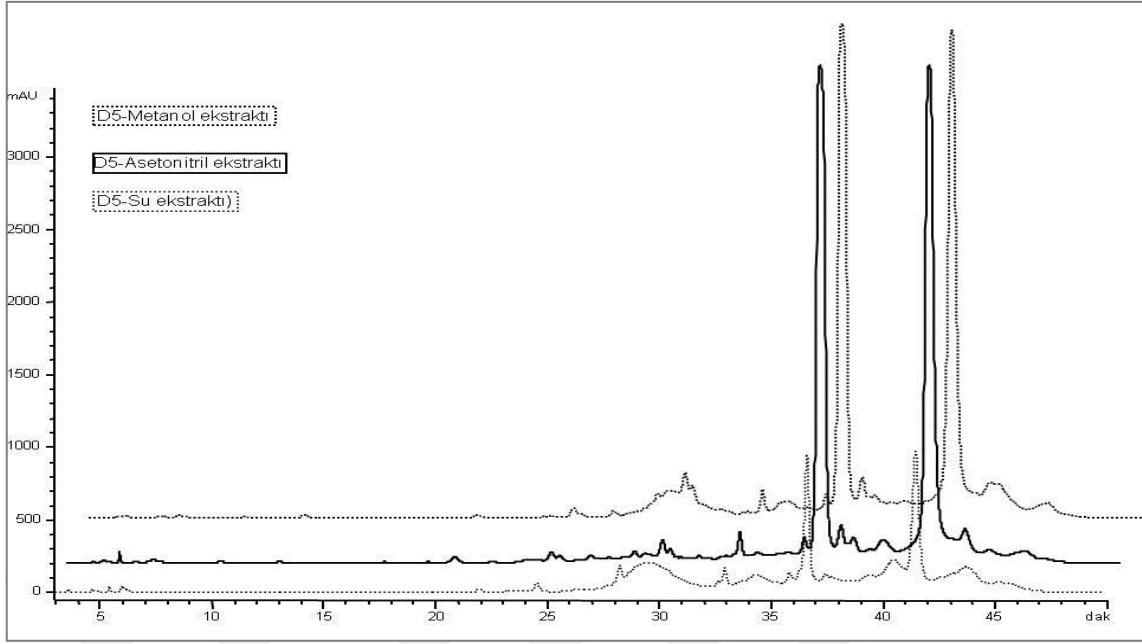


Şekil 32. Ekinetia metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm).

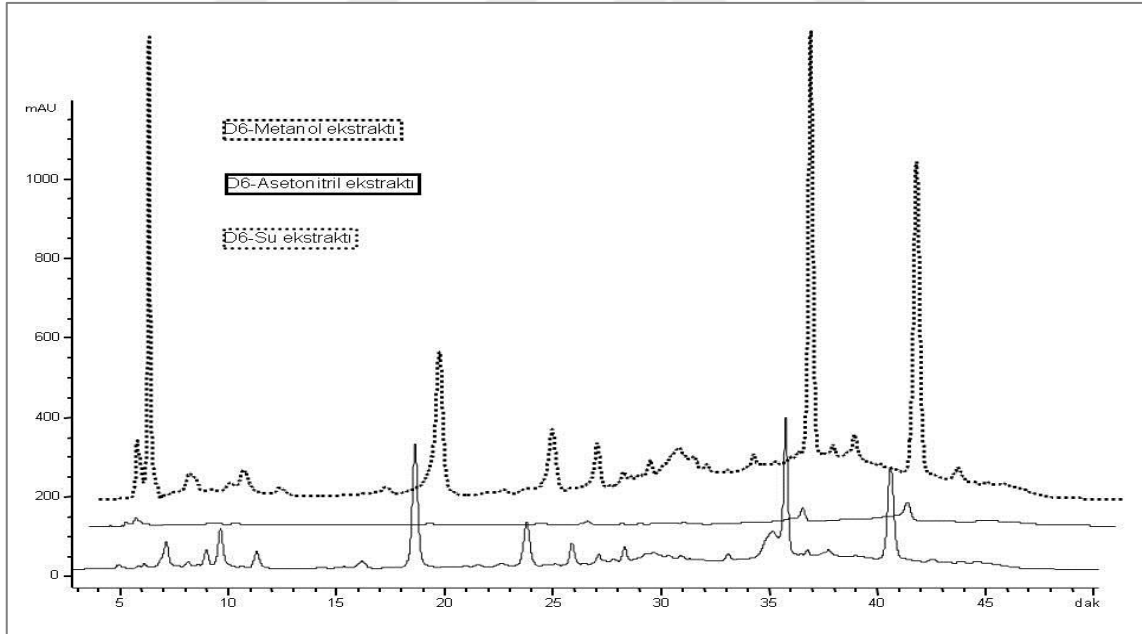


Şekil 33. Ihlamur metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)

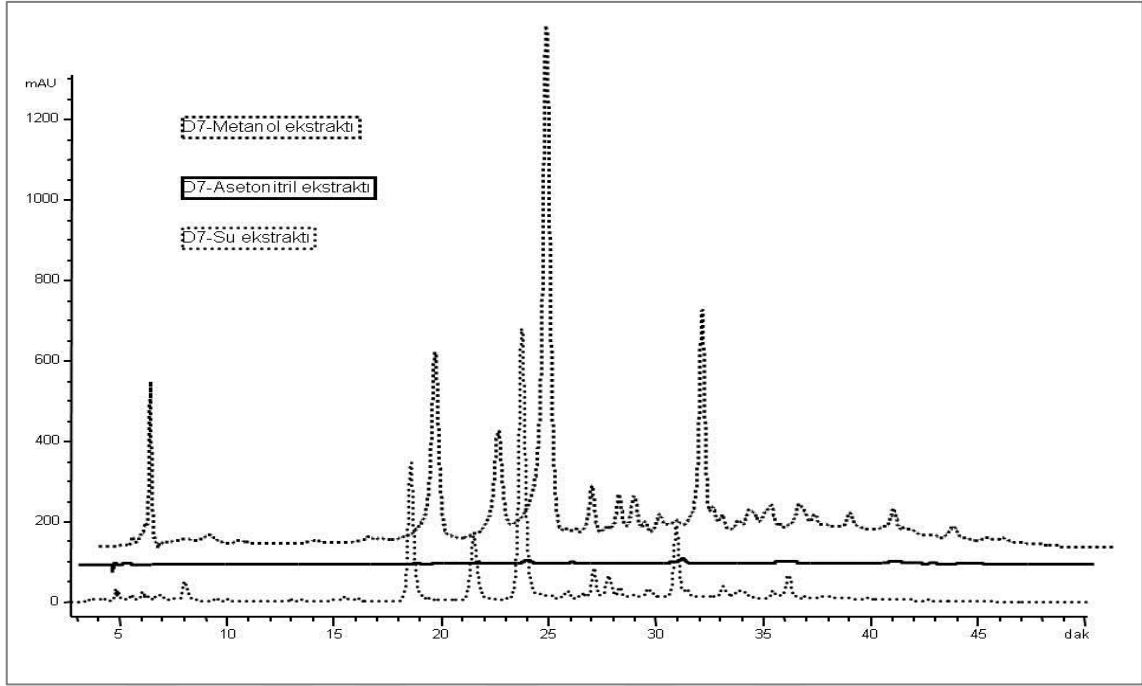
Metanol ve asetonitril ekstraktlarının belli bölgeleri farkın görülmesi için şekil 32' de ayrıca verildi.



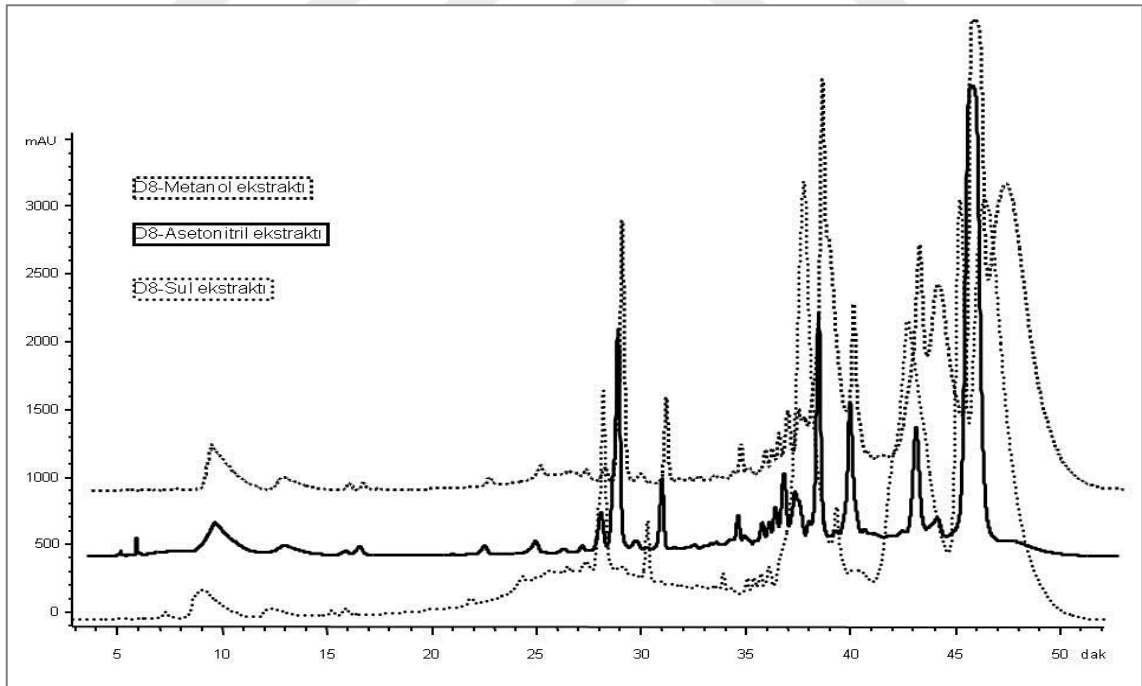
Şekil 34. Kekik metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



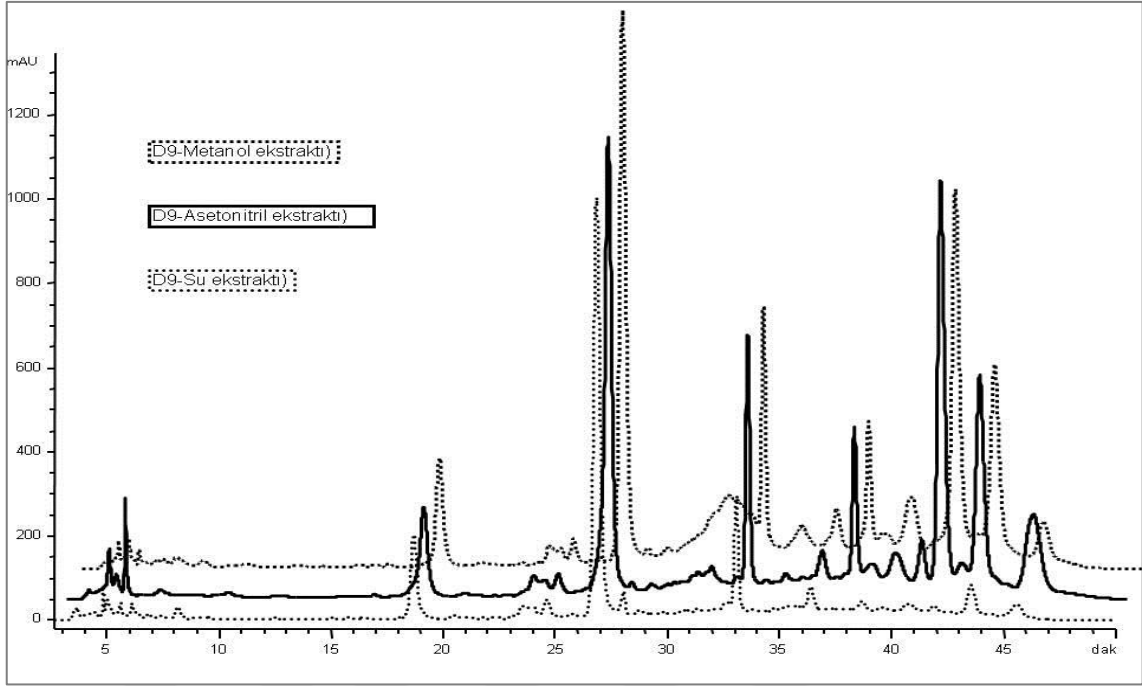
Şekil 35. Ormangülü (*R. ponticum*) metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



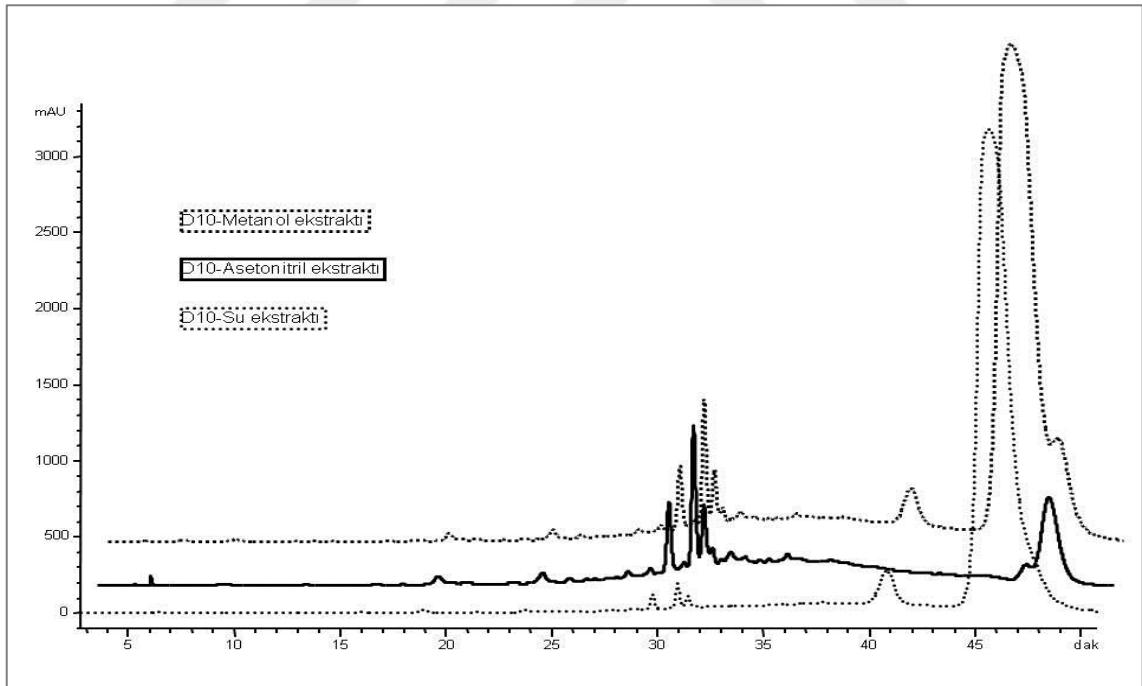
Şekil 36. Ormangülü (*R. luteum*) metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



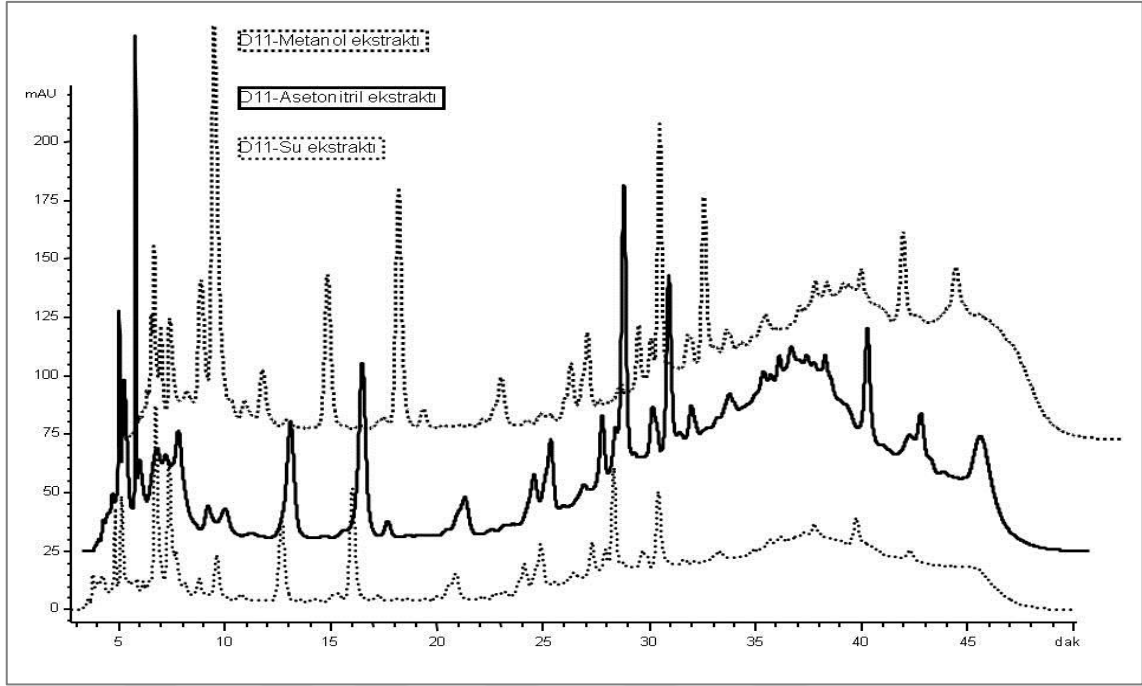
Şekil 37. Sarısabır metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



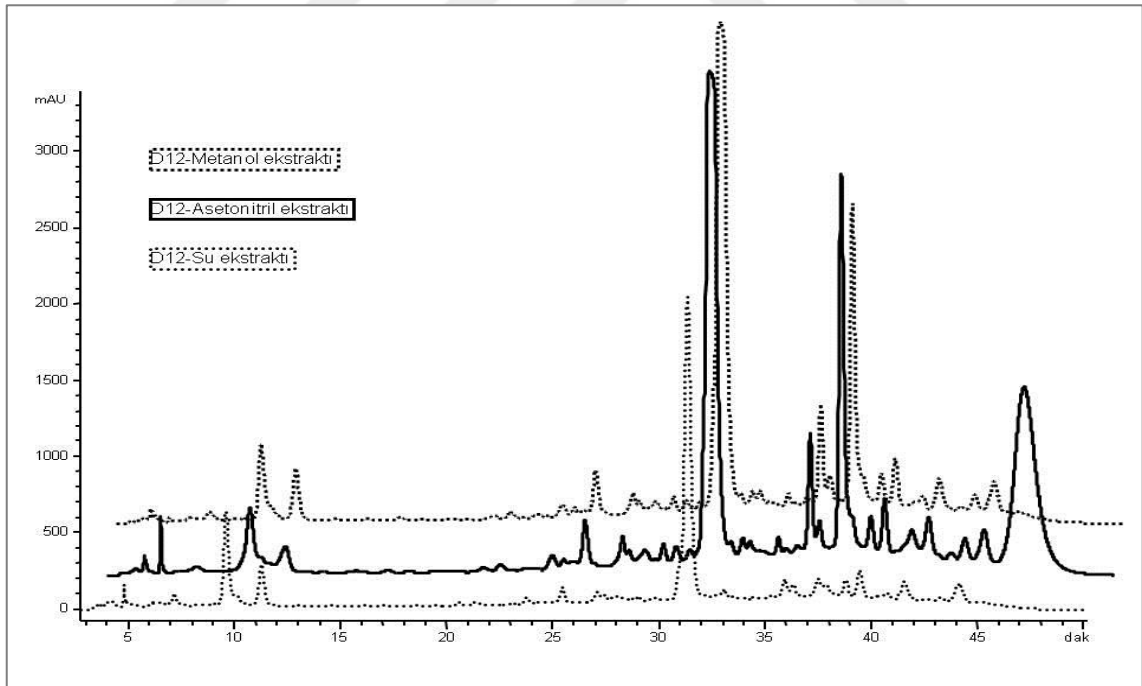
Şekil 38. Sinameki metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



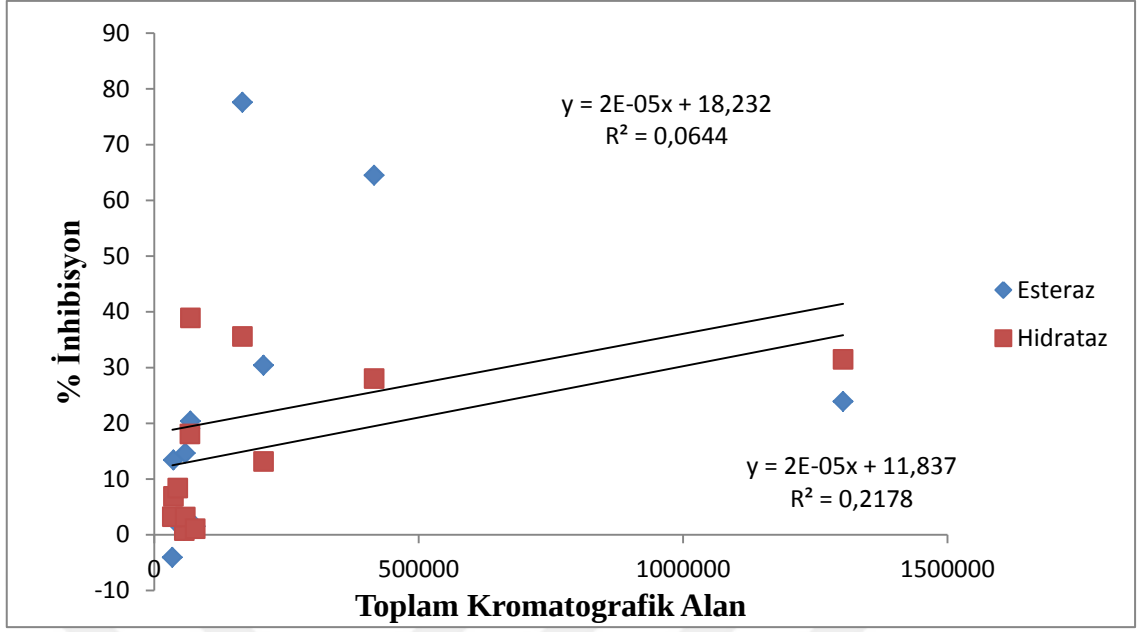
Şekil 39. Tarçın metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



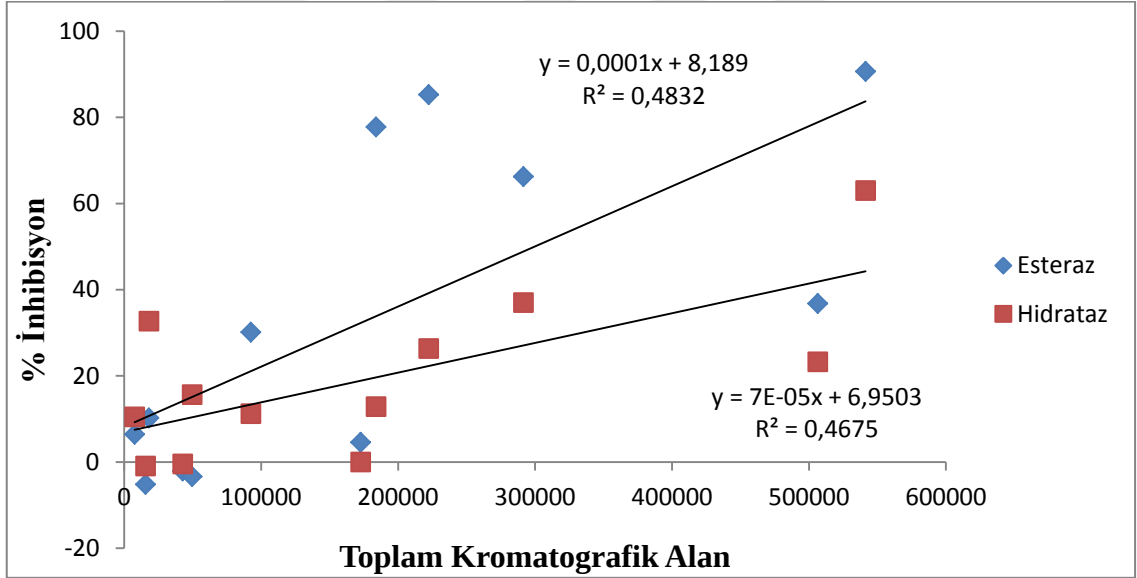
Şekil 40. Yabanmersini metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)



Şekil 41. Yeşil çay metanol, asetonitril ve su ekstraktlarının HPLC kromatogramları (280 nm)

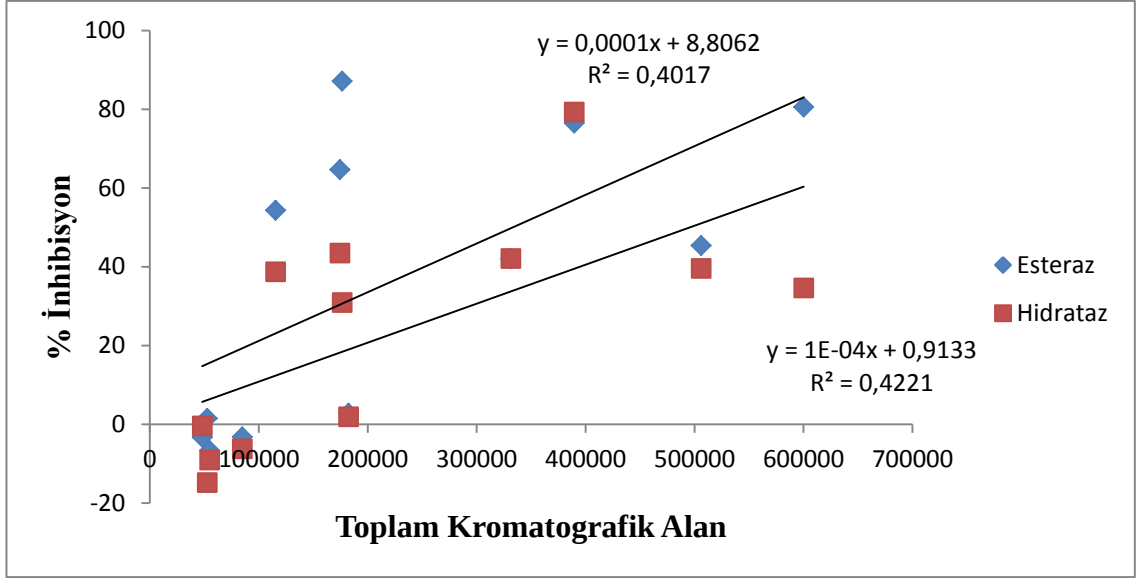


Şekil 42. Su ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarında görülen esteraaz ve hidrataaz aktivitelerinin toplam kromatografik alan ile korelasyonu



Şekil 43. Asetonitril ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarında görülen esteraaz ve hidrataaz aktivitelerinin toplam kromatografik alan ile korelasyonu

Asetonitrilli bitki ekstraktlarının hidrataaz ve esteraaz aktivite sonuçlarını toplam kromatografik alan ile karşılaştırmak için şekil 43'teki gibi korelasyon grafiği çizildi.



Şekil 44. Metanol ile çözündürülmüş bitki ekstraktlarında görülen esteraz ve hidrataz aktivitelerinin toplam kromatografik alan ile korelasyonu

Çözücüsü metanol olan bitki ekstraktlarıyla yapılan hidrataz ve esteraz aktivitesi ile inhibisyon çalışmalarının sonuçları HPLC yürütmeleri sonucu belirlenen fenolik bileşiklerin toplam kromatografik alanları hesap edilerek korelasyon grafiği çizildi. Karşılaştırmalı olarak hidrataz ve esteraz aktiviteleri için toplam fenolik miktarları Şekil 44'teki gibi kıyaslandı.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

7.1. Ekstrakların Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)'nın Esteraz ve Hidrataz Aktiviteleri Üzerindeki % İnhibisyonları

Doğal ürün kütüphanelerinden ve mantarlar ve bitkiler gibi doğal kaynaklardan izole edilmiş bileşenlerin kullanımıyla ilgili yapılan son çalışmalar, karbonik anhidraz aktivitesine sahip olan yeni kemotiplerin keşfedilmesini sağlamıştır. Bu doğal kaynaklar yeni ve daha etkili karbonik anhidraz inhibitörleri arayışında yeni imkanlar sunarak gelecekte ilaçların tasarımı ve geliştirilmesi için potansiyel inhibitör olarak kullanılmasına imkan sağlar (52). Son yıllarda sülfonamid ve sülfonamid biyoizoeesterleri gibi klasik CA inhibitörlerine ek olarak önemli CA aktivitesi gösteren ve yeni CA etki mekanizmasına sahip birçok yeni kemotip keşfedilmiştir. Bu yeni kemotiplerin çoğu doğal ürünlere dayalı ve doğada bolca bulunan kumarinler, fenoller, polifenoller, poliaminlerdir. Yakın gelecekte doğal ürün tabanlı enzim inhibitörlerinin belirlenmesiyle yeni tedavi uygulamaları geliştirilebilir. Doğal ürünler artık tüm dünyada, popüler olan tamamlayıcı ve alternatif tıp yöntemlerindendir (53).

Üç farklı çözücü ile hazırlanan 12 farklı bitki ekstraktının BCA üzerine olan inhibisyonuna esteraz aktivitesi ile bakıldı ve grafikleri (Bkz. Şekil 5-16) verildi. Kekik ve ekinezya'ın sulu ekstraktlarının BCA üzerindeki % inhibisyon değerinin diğer çözücü ekstraktlarındaki BCA inhibisyonundan daha yüksek olduğu görüldü. Asetonitrilli ekstraktlardan yeşil çay, yaban mersini, tarçın, sinameki ve ıhlamur' da bu ekstraktların diğer çözücülerine oranla daha yüksek inhibisyon gözlemlendi. Metanollü ekstraktlarda ise akasya, ormangülü (*R. ponticum*), ormangülü (*R. luteum*) ve sarısabır BCA üzerinde yüksek inhibisyon gösterdi. Bu sonuçlara bakılarak çözücü etkisine bağlı olarak BCA üzerindeki % inhibisyonlarda farklılık olduğu görüldü. Hidrataz ve esteraz aktivitesi ile BCA üzerindeki % inhibisyon değeri karşılaştırmalı olarak incelendi ve bunun sonucunda çözücü ve kullanılan aktiviteye göre % inhibisyon değerlerinde farklılık olduğu görüldü. Çözücüsü su olan akasya, ıhlamur ve sinameki ekstraktlarında esteraz ve hidrataz aktivitelerinin vermiş olduğu % inhibisyon değerlerinin paralellik gösterdiği belirlendi. Çözücüsü asetonitril olan ekstraktlarda ise sarısabır, sinameki ve yeşil çay'ın esteraz ve hidrataz aktiviteleri kıyaslandığında birbirleriyle uyumlu olduğu görüldü. Son olarak metanol ile çözüldürülmüş ve esteraz ile hidrataz aktivitelerinin

paralellik gösterdiği ekstraktlar kekik, sarısabır, sinameki ve yeşil çay olarak tespit edildi.

Esteraz ve hidrataz aktiviteleri sonucunda asetonitrilli yeşil çay, kekik, sarısabır ve tarçında % inhibisyonun diğerlerine oranla daha fazla olduğu görüldü. Bunun yanısıra akasya, çörek otu ve sinameki ekstraktlarında % inhibisyon değerlerinin her iki aktivitede de çok düşük olduğu görüldü. Metanollü ekstraktlarda % inhibisyonu diğerlerine oranla daha yüksek olanların yeşil çay, tarçın, ıhlamur, kekik, ormangülü (*R. ponticum*), ormangülü (*R. luteum*) ve sarısabır olduğu görüldü. Genel olarak değerlendirildiğinde en yüksek inhibisyon sayısına sahip olan çözücünün metanol olduğu tespit edildi.

Potansiyel CA modölatörlerinin araştırılmasında suyun yanında organik çözücülerin de kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Organik çözücüler enzimin üç boyutlu yapısında değişikliğe sebep olarak enzimi inhibe edebilirler. Bu çalışmada da görüldüğü gibi organik çözücülerle hazırlanmış olan bitki ekstraktlarında daha yüksek inhibisyon tespit edildi.

7.2. Yüzde İnhibisyon Değerlerinin Toplam Kromatografik Alan ile Korelasyonu

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile bitki ekstraktlarında fenolik bileşiklere bakılmasının ardından kromatogramlardaki piklerin altında kalan toplam alan hesaplanarak esteraz ve hidrataz aktivitesi ile korelasyon grafiği çizildi. Bu sonuçlara göre su ile çözündürülmüş olan bitki ekstraktlarının bulunduğu Şekil 39' daki grafiğe bakıldığında hidrataz aktivitesinin toplam kromatografik alanla uyumu daha yüksek görüldü. Çözücüsü asetonitril olan bitki ekstraktlarıyla yapılan esteraz ve hidrataz aktivitelerindeki inhibisyon değerlerinin toplam kromatografik alanla korelasyonunda Şekil 40' da görüldüğü gibi R^2 değeri esteraz aktivitesi için 0.4832 hidrataz aktivitesi için ise 0.4675' dir. Bu da asetonitrilli ekstraktlarda korelasyonun esteraz aktivitesinde daha iyi olduğunu gösterdi. Son çözücü olan metanolde ise hidrataz aktivitesinin R^2 değerinin esteraz aktivitesine göre daha iyi olduğu görüldü.

Genel olarak korelasyon grafiklerine bakıldığında çözücüsü asetonitril olan bitki ekstraktlarında inhibisyon değerleri ile toplam kromatografik alan korelasyonu daha yüksek çıktı. Bu da suya göre daha apolar olan asetonitrilde çözünen fenoliklerin apolar olmasından kaynaklanmaktadır. Bitki ekstraktlarındaki bileşenlerin apolar çözücüde

çözünme yüzdeleri daha yüksek olması sebebiyle apolar çözücüdeki bitki ekstraktlarının korelasyon değerleri daha iyi çıktı. Bu da apolar fenolik bileşiklerin yüzde inhibisyonunun daha iyi olduğu sonucunu verdi.

7.3. Ekstraktların Aktivite – Fenolik HPLC Profili Karşılaştırması

Çalışılmış olan ekstraktlarda gözlenen CA enzimi üzerine olan etki çok farklılık gösterdi. Bazı bitkiler için farklı çözücü kullanılması durumunda birbirine benzer inhibisyon seviyeleri gözlemlenmişken, bazılarında önemli farklar görüldü. Bir bitkiden hazırlanmış olan numuneden farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların CA aktivitesi üzerine etkisinin fenolik bileşimi ile ilişkisinin belirlenmesi amacıyla bütün numunelerde HPLC çalışması yapıldı. 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümle elde edilen kromatogramlar fenolik bileşimi yansıtabilmektedir. Kromatogramlarda görülen pik zenginliği ve taban çizgisi (baseline) üzerinde kalan toplam alan fenolik zenginlik konusunda önemli bilgi sağlamaktadır. Hazırlanan ekstraktlarda HPLC çalışmasında kullanılan dedeksiyonda tespit edilemeyecek çok sayıda bileşiğin bulunabileceği unutulmamalıdır.

Çalışmada incelenen akasya, çörekotu, ekinezya ve sinameki ekstraktlarının önemli bir enzim inhibisyon etkisi görülmedi, hatta bu numunelerin bazılarında az da olsa bir aktivasyonun olduğu görüldü. Akasya örneğinde metanol ve su ekstraktlarında çok düşük inhibisyon görülürken, asetnonitril ekstraktı % 5.19 aktivasyon gösterdi. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kromatogramları değerlendirildiğinde aksayanın metanol ve sulu ekstraktlarının fenolik bileşiminin birbirine benzediği, asetnonitril ekstraktının ise fenolik içerik açısından fakir olduğu görüldü. Bu bilgiler aksayadaki fenolik bileşiklerin az da olsa inhibisyon etkisinin olduğunu, fenolik olmayan tespiti yapılamamış olan diğer bileşenlerin ise CA aktivasyonuna sebep olduğunu göstermektedir. Çalışılan 12 bitki ekstraktlarının HPLC kromatogramları değerlendirildiğinde, kromatogramlardaki pik sayısı ve taban çizgisi üstünde kalan alanlar (pik boyutları) göz önüne alınınca CA inhibisyon etkisi düşük olan akasya, çörekotu, ekinezya, ve yaban mersini ekstraktlarının fenolik profilinin diğer numunelere göre zayıf olduğu görülmektedir. Bu da çalışılan bitki örneklerindeki fenolik bileşenlerin inhibisyon yaptığıının önemli bir delilidir.

Karbonik anhidraz aktivitesini önemli ölçüde inhibe eden ıhlamur, kekik, mor ormangülü, sarı ormangülü, sarısabır, tarçın ve yeşil çay ekstraktlarının kromatografik profili değerlendirildiğinde fenolik zenginliğin tek başına enzim inhibitör aktivitesini gösteren bir kriter olmadığı anlaşılmaktadır. Örneğin kekik sulu ekstraktı metanol ekstraktına göre fenolik açıdan daha fakir gözükmekte iken, enzim üzerine etkiye bakıldığında metanolik ekstraktın çok daha etkin inhibisyon gösterdiği görülmektedir. Bu da sulu ekstraktta fenolik yapıda olmayan, tespiti yapılamamış aktif bileşenlerin olduğu anlamına gelmektedir. Benzer şekilde ormangülü ekstraktlarının durumu incelendiğinde metanol ve asetonitril fenolik profilleri birbirine benzemesine rağmen metanol ekstraktlarının inhibisyon etkisi önemli ölçüde yüksektir. Her iki ormangülü metanol ekstraktında 5-6 dakikalar civarında görülen bileşenin inhibisyona katkısının önemli olduğu ve bu bileşenin yapı ve aktivitesinin ayrıca belirlenmesinin değerli olabileceği düşünülmektedir. Tarçın ekstraktları değerlendirildiğinde üç çözücüyle elde edilen ekstraktların inhibisyon seviyeleri birbirine yakın iken fenolik profilleri arasında önemli bir fark görülmektedir. Metanol ve sulu ekstraktlarda 46. dakikada görülen büyük pik, asetonitril ekstraktında görülmektedir. Bu bileşiğin inaktif bir fenolik olduğu anlaşılmaktadır. Yeşil çay ekstraktlarının kromatogramları fenolik bileşim açısından metanol ve asetonitril ekstraktlarının benzerlik gösterdiğini, sulu ekstrakttan daha zengin olduklarını ortaya koymaktadır. Enzim aktivitesi üzerine etkilerine bakıldığında da benzer ilişki görülmektedir. Asetonitril ekstraktında görülen yüksek etkinin kromatogramda 47. dakikada görülen ve diğer iki ekstraktta olmayan bileşenin sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin kromatogramlarının fenolik bileşimle ilgili sağladığı bilgi ve numunelerle elde edilen CA inhibisyon verilerinin birlikte değerlendirilmesi bazı fenolik bileşiklerin aktiviteden sorumlu olduğunu, ancak sadece fenolik bileşenlerin aktiviteden sorumlu olmadığını göstermektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisinin çalışmasında tespit edilememiş fenolik olmayan bileşenlerin de CA enzimini inhibe ettiği aşıkardır. Biyoaktiviteden sorumlu bu bileşiklerin belirlenmesi için yapılacak olan daha ileri çalışmaların çok değerli sonuçlar vereceği anlaşılmaktadır. Çalışmanın bir sonucu da bir bitkide hem inhibitör hem de aktivatör bileşiklerin olacağıdır.

8. KAYNAKLAR

1. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ (2000). *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, Erzurum, 118.
2. Innocenti A, Sarikaya SBO, Gulcin I, Supuran CT (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorg & Med Chem Lett* 18: 2159-2164.
3. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 7: 168-181.
4. Del Prete S, Vullo D, Fisher GM, Andrews KT, Poulsen SA, Capasso C, Supuran CT (2014). Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen *Plasmodium falciparum* the eta-carbonic anhydrases. *Bioorg & Med Chem Lett* 24: 4389-4396.
5. Viparelli F, Monti SM, De Simone G, Innocenti A, Scozzafava A, Xu Y, Morel FMM, Supuran CT (2010). Inhibition of the R1 fragment of the cadmium-containing zeta-class carbonic anhydrase from the diatom *Thalassiosira weissflogii* with anions. *Bioorg & Med Chem* 20: 4745-4748.
6. Park H, Song B, Morel FMM (2007). Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ Microbiol* 9: 403-413.
7. Suraveratum N, Krungkrai SR, Leangaramgul P, Prapunwattana P, Krungkrai J (2000). Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* succinate dehydrogenase. *Mol and Biochem Parasitol* 105: 215-222.
8. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* 23: 146-189.
9. Lesburg CA, Huang CC, Christianson DW, Fierke CA (1997). Histidine carboxamide ligand substitutions in the zinc binding site of carbonic anhydrase II alter metal coordination geometry but retain catalytic activity. *Biochem* 36: 15780-15791.

10. Nair SK, Krebs JF, Christianson DW, Fierke CA (1995). Structural Basis of Inhibitor Affinity to Variants of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochem* 34: 3981-3989.
11. Şentürk M, Çavdar H, Talaz O and Supuran CT (2012). Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators: Small Organic Molecules as Drugs and Prodrugs. *Med Chem and Drug Des* (Ed: Ekinici PD), 315-328.
12. Mann T, Keilin D (1940). Sulphanilamide as a Specific Inhibitor of Carbonic Anhydrase. *Nat* 146 164-165.
13. Hadida S, Van Goor F, Grootenhuis PDJ (2010). CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Annu Rep in Med Chem* 45: 157-173.
14. Dave K, Ilies MA, Scozzafava A, Temperini C, Vullo D, Supuran CT (2011). An inhibitor-like binding mode of a carbonic anhydrase activator within the active site of isoform II. *Bioorg & Med Chem Lett* 21: 2764-2768.
15. Supuran CT, Scozzafava A (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion on Ther Pat* 12: 217-242.
16. Clark AM, Perrin DD (1951). A Re-Investigation of the Question of Activators of Carbonic Anhydrase. *Biochem J* 48: 495-503.
17. Vullo D, Del Prete S, Capasso C, Supuran CT (2016). Carbonic anhydrase activators: Activation of the beta-carbonic anhydrase from *Malassezia globosa* with amines and amino acids. *Bioorg & Med Chem Lett* 26: 1381-1385.
18. Saada MC, Vullo D, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT, Winum JY (2014). Mono- and di-halogenated histamine, histidine and carnosine derivatives are potent carbonic anhydrase I, II, VII, XII and XIV activators. *Bioorg & Med Chem Lett* 22: 4752-4758.
19. Sethi KK, Vullo D, Verma SM, Tanc M, Carta F, Supuran CT (2013). Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, IX and XII with benzene sulfonamides incorporating 4,5,6,7-tetrabromophthalimide moiety. *Bioorg & Med Chem Lett* 21: 5973-5982.

20. Biswas S, McKenna R, Supuran CT (2013). Effect of incorporating a thiophene tail in the scaffold of acetazolamide on the inhibition of human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. *Bioorg & Med Chem Lett* 23: 5646-5649.
21. Actor P, Chow AW, Dutko FJ, McKinlay MA (2000). Chemotherapeutics. *Ullmann's Encyclopedia of Ind Chem* 490.
22. Hosseinihashemi SK, HosseinAshrafi SK, Goldeh AJ, Salem MZM (2016). Antifungal and Antioxidant Activities of Heartwood, Bark, and Leaf Extracts of *Robinia pseudoacacia*. *Bioresources* 11: 1634-1646.
23. Electronic resources [online]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/Robinia_pseudoacacia#/media/File:Robinia_\(Robinia_pseudoacacia\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/Robinia_pseudoacacia#/media/File:Robinia_(Robinia_pseudoacacia).jpg). [Accessed 20 Mayis 2016].
24. Adam GO, Rahman MM, Lee SJ, Kim GB, Kang HS, Kim JS, Kim SJ (2016). Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* seed extract against acetaminophen-induced oxidative stress. *Asian Pacific J of Trop Med* 9: 217-222.
25. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/Nigella_sativa#/media/File:Nigella_Sativa_HG,_Huntington.jpg. [Accessed 20 Mayis 2016].
26. Dogan Z, Ergul B, Sarikaya M, Filik L, Gonultas MA, Hucumenoglu S, Can M (2014). The antioxidant effect of *Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea* in rat colitis model induced by acetic acid. *Bratisl Med J-Bratislavske Lekarske Listy* 115: 411-415.
27. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/Echinacea_angustifolia#/media/File:Echinacea_angustifolia_g1.jpg. [Accessed 20 Mayis 2016].
28. Bhat RB (1995). Taxonomic Significance of Vessel Elements in the Tiliaceae. *South African J of Bot-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Plantkunde* 61: 49-52.
29. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lime_tree.jpg. [Accessed 19 Mayis 2016].

30. Petrovic NV, Petrovic SS, Dzamic AM, Ciric AD, Ristic MS, Milovanovic SL, Petrovic SD (2016). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus praecox* supercritical extracts. *J of Supercritical Fluids* 110: 117-125.
31. Electronic resources [online]. Available from: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d4/Thymus_vulgaris0.jpg. [Accessed 19 Mayis 2016].
32. Erdemoglu N, Akkol EK, Yesilada E, Calis I (2008). Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. *J of Ethnopharmacol* 119: 172-178.
33. Erdemoglu N, Kupeli E, Yesilada E (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J of Ethnopharmacol* 89: 123-129.
34. Esen D, Zedaker SM, Kirwan JL, Mou P (2004). Soil and site factors influencing purple-flowered rhododendron (*Rhododendron ponticum* L.) and eastern beech forests (*Fagus orientalis* Lipsky) in Turkey. *For Ecol and Manage* 203: 229-240.
35. Sibel S, Enis YM, Huseyin S, Timucin AA, Duran O (2014). Analysis of grayanotoxin in *Rhododendron* honey and effect on antioxidant parameters in rats. *J of Ethnopharmacol* 156: 155-161.
36. Electronic resources [online]. Available from: <http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/mavica/high/3500/03404.html>. [Accessed 19 Mayis 2016].
37. Radha MH, Laxmipriya NP (2015). Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of Aloe vera: A systematic review. *J Tradit Complement Med* 5: 21-26.
38. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/Aloe_vera#/media/File:Aloe_Vera.jpg. [Accessed 19 Mayis 2016].
39. Kundu S, Roy S, Lyndem LM (2014). Broad spectrum anthelmintic potential of Cassia plants. *Asian Pacific J Trop Biomed* 4: 436-441.
40. Electronic resources [online]. Available from: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Senna_alexandrina_Mill.Cassia_angustifolia_L._\(Senna_Plant\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Senna_alexandrina_Mill.Cassia_angustifolia_L._(Senna_Plant).jpg). [Accessed 19 Mayis 2016].

41. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cinnamomum_zeylanicum_2c.JPG. [Accessed 19 Mayıs 2016].
42. Babova O, Occhipinti A, Capuzzo A, Maffei ME (2016). Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent. *J of Supercritical Fluids* 107: 358-363.
43. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/Vaccinium_myrtillus#/media/File:Vaccinium-myrtillus-0175.jpg. [Accessed 19 Mayıs 2016].
44. Choi SJ, Park SY, Park JS, Park SK, Jung MY (2016). Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chem* 204: 94-101.
45. Electronic resources [online]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/Camellia_sinensis#/media/File:%C3%87ay-1.jpg. [Accessed 15 Mayıs 2016].
46. Verpoort JA, Mehta S, Edsall JT (1967). Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *J of Biol Chem* 242: 4221-4229.
47. Wilbur KM, Anderson NG (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 176: 147-154.
48. Snyder L, Kirkland JJ, Glajch JL (2012). Practical HPLC method development. (Ed: John Wiley & Sons Inc.). Canada, 57-59.
49. Snyder LR, Dolan JW (2007). High-Performance Gradient Elution: The practical application of the linear-solvent-strength model. (Ed: John Wiley & Sons Inc.). New jersey, 137.
50. Mattu TS, Royle L, Langridge J, Wormald MR, Van den Steen PE, Van Damme J, Opdenakker G, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM (2000). O-glycan analysis of natural human neutrophil gelatinase B using a combination of normal phase-HPLC and online tandem mass spectrometry: Implications for the domain organization of the enzyme. *Biochem* 39: 15695-15704.
51. Arslan O, Nalbantoğlu B, Demir N, Özdemir H, Küfrevioğlu Öİ (1996). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turk J of Med Sci* 26: 163-166.

52. Karioti A Carta F, Supuran CT (2016). An update on natural products with carbonic anhydrase inhibitory activity. *Curr Pharm Des* 22: 1570-1591.
53. Supuran CT (2011). Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Mol Divers* 15: 305-316.



9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ BİLİMSSEL
ARAŞTIRMALAR
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE
ETHIC COUNCIL

Sayı: 24237859- 123
Konu: Onay Belgesi

Tarih:12/01/2016

Sayın; Prof.Dr.Murat KÜÇÜK
Kimya / Biyokimya

“Yeni Bir On-Line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi ve Biyoaktif Bitki Ekstraktlarına Uygulanması” başlıklı etik kurul 2015/153 no.lu tez çalışması raportör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Faruk AYDIN
Etik Kurul Başkanı

Eki : 1 onay belgesi

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

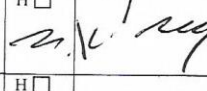
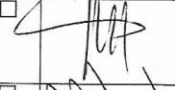
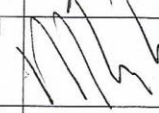
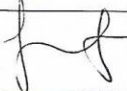
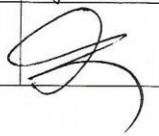
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	“Yeni Bir On-Line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi ve Biyoaktif Bitki Ekstraktlarına Uygulanması”		
	ARAŞTIRMANIN PROTOKOL/PLAN KODU	2015/153		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Murat KÜÇÜK		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kimya / Biyokimya		
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, UNVANI/ADI/SOYADI	Doktora Öğr.Semra ALKAN TÜRKUÇAR, Derya CANSIZ		
	DESTEKLEYİCİ			
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☐			

**KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU**

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 5	Tarih: 28/12/2015
	Prof.Dr.Murat KÜÇÜK'ün sorumluluğunda yürütülmesi planlanan Doktora Öğr.Semra ALKAN TÜRKÜÇAR'a s "Yeni Bir On-Line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi ve Biyoaktif Bitki Ekstraktlarını Uygulanması" başlıklı 2015/153 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen <u>araştırma/tez</u> başvuru dosyası ile ilg belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde et sakinca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİMLİ
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİMLİ
Doç.Dr. Evrim Ö. KARAGÜZEL Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	Derya CANSIZ
Uyruğu	T C
Doğum Tarihi ve Yeri	Çaykara, 28.04.1988
Medeni Hali	Bekâr
E-posta	cstdry@hotmail.com
Yazışma Adresi	Karadeniz Teknik Üniversitesi Kanuni Kampüsü Kimya Bölümü/ TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ/ Eczacılık Biyokimya	2013-Halen
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2007-2012
Lise	Bağcılar Lisesi	2002-2005

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Enzim inhibisyonu, Karbonik anhidraz, Afinite kromatografisi

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	KTÜ/ Eczacılıkta Biyokimya	2013-Halen
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2007-2012
Lise	Bağcılar Lisesi	2002-2005

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Akman S, Arıcı M, Bayındır N, **Cansız D**, Dalagan V, İnci G, Yıldız M, İkinci N (2013). Traditional Folk Medicine in Balı Village Kıbrısık/Bolu (Turkey). Emirates Journal of Food and Agriculture Suppl. Issue: Abstracts of “11th International Ethnobotany Symposio, November 2-5, 2013 Antalya, Turkey” 25: 141.

2. **Cansız D**, Küçük M, Alkan Türkuçar S, İskefiyeli Z (2015). Bitki özütleri ve sentetik karışımlardaki karbonik anhidraz enzim inhibitörlerinin belirlenmesi için yeni bir tlc biyootografi yöntemi geliştirilmesi.
3. Küçük M, Arslan Burnaz N, İskefiyeli Z, Aktaş Karaçelik A, Eyupoğlu OE, Alkan Türkuçar S, Doğan H, Polat D, **Cansız D**, Kardil U (2015). Biyoaktivite tayin yöntemlerinin yenilikçi yaklaşımlarla geliştirilmesi.
4. Alkan Türkuçar S, Küçük M, **Cansız D**, Eyupoğlu OE (2015). Organik çözücülerin karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkisi.
5. Kardil U, Küçük M, **Cansız D**, Doğan H, İskefiyeli Z, Polat D (2015). Bitki özütleri ve doğal ürünlerin tereyağında antioksidan olarak kullanılmaları.
6. İskefiyeli Z, Küçük M, **Cansız D**, Eyupoğlu, OE (2015). Damlatma ile yeni frap antioksidan tayin yönteminin geliştirilmesi ve uygulanması.