

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YENİ BİR ON-LİNE HPLC-CA İNHİBİTÖR BELİRLEME YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOAKTİF BİTKİ EKSTRAKTLARINA
UYGULANMASI

DOKTORA TEZİ

Semra ALKAN TÜRKUÇAR

ŞUBAT 2018
TRABZON



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YENİ BİR ON-LİNE HPLC-CA İNHİBİTÖR BELİRLEME YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOAKTİF BİTKİ EKSTRAKTLARINA
UYGULANMASI**

Semra ALKAN TÜRKUÇAR

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
“DOKTOR (KİMYA)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 05.02.2018
Tezin Savunma Tarihi : 23.02.2018**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Trabzon 2018

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Kimya Anabilim Dalında
Semra ALKAN TÜRKUÇAR Tarafından Hazırlanan

YENİ BİR ON-LİNE HPLC-CA İNHİBİTÖR BELİRLEME YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE BİYOAKTİF BİTKİ
EKSTRAKTLARINA UYGULANMASI

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 06 /02 /2018 gün ve 1739 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

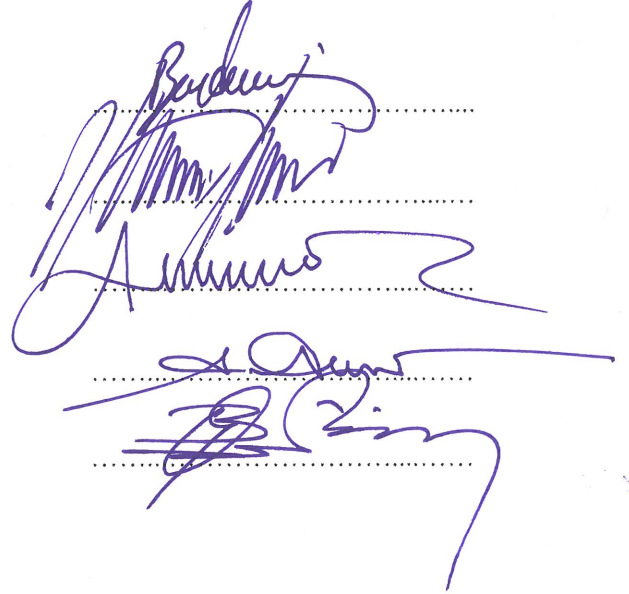
Başkan : Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Prof. Dr. Ahmet ALVER

Üye : Prof. Dr. Olcay BEKİRCAN



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“Yeni Bir On-Line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi ve Biyoaktif Bitki Ekstraktlarına Uygulanması” adlı bu çalışma TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt içi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Öncelikle çalışmalarımnda her zaman bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, akademik ve insani yönden kendime daima örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’e derin minnet ve sevgilerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında laboratuvar imkanlarından faydalandığım her türlü yardım ve desteği sağlayan hocalarım Sayın Prof. Dr. Ahmet ALVER, Sayın Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI’ya ve öğrenim hayatım boyunca bana emeği geçen tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, sevgi ve desteklerini her zaman hissettiren Doktora Öğrencisi Derya CANSIZ, Öğretim Görevlisi Ayça AKTAŞ KARAÇELİK ve Uğur KARDİL, Dr. Ozan Emre EYUPOĞLU, Doktora Öğrencisi Ümit UZUN, Yüksek Lisans Öğrencisi Melek KAYA, lisans öğrencisi Berna Senem KEFELİ başta olmak üzere Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoaktivite Araştırma Laboratuvarı (BAL)’nda çalışan bütün arkadaşlarıma ve Kimya Bölümünün tüm çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm hayatım boyunca benden dualarını ve yardımlarını esirgemeyen canım babam Muzaffer ALKAN’ a, çok büyük özlem duyduğum ve hala dualarını hissettiğim rahmetli canım annem Hatice ALKAN’ a, ablalarım Hülya ALKAN CEYLAN, Ayla ALKAN YAVUZ ve ağabeyim Serdar ALKAN’ a, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren canım eşim Uğur TÜRKUÇAR’a ve bu zorlu süreçte yanımda olan tüm sevenlerime minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Semra ALKAN TÜRKUÇAR
Trabzon, 2018

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Yeni Bir On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi ve Biyoaktif Bitki Ekstraktlarına Uygulanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

23/02/2018

Semra ALKAN TÜRKUÇAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	XI
SUMMARY	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
TABLolar DİZİNİ.....	XXII
SEMBOLLER DİZİNİ	XXIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Karbonik Anhidraz (CA)	2
1.2.1. Literatürde CA Çalışmaları.....	2
1.2.2. CA Sınıfları ve Organizmalardaki Dağılımı	4
1.2.2.1. α -Sınıfı CA.....	4
1.2.2.2. β -Sınıfı CA.....	4
1.2.2.3. γ -Sınıfı CA	5
1.2.2.4. δ -Sınıfı CA	5
1.2.2.5. ζ -Sınıfı CA	6
1.2.2.6. η -Sınıfı CA.....	6
1.2.3. CA'ların Aktif Bölgesi ve Katalitik Mekanizması	7
1.2.4. Memelilerdeki CA İzoenzimleri	9
1.2.5. CA'ların İşlevsel ve Fizyolojik Önemi	9
1.2.6. CA İnhibitörleri ve Aktivatörleri	10
1.2.7. CA'ların İnhibisyon Mekanizmaları	11
1.3. Fenolik Bileşikler.....	15
1.3.1. Flavonoidler	16
1.3.2. Fenolik Asitler	20
1.3.3. Stilbenler	21
1.3.4. Tanninler	21
1.4. Kromatografi.....	22
1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	24

1.5.1.	HPLC'nin Temel Prensipleri ve Temel Kavramlar	25
1.5.1.1.	Hareketli Faz	26
1.5.1.1.1.	İzokratik Elusyon	26
1.5.1.1.2.	Gradient Elusyon	26
1.5.1.2.	Gaz Giderici (Degasser).....	27
1.5.1.3.	Pompa	27
1.5.1.4.	Enjeksiyon Ünitesi	28
1.5.1.5.	Kolon.....	28
1.5.1.5.1.	Ters Faz Kolon.....	29
1.5.1.5.2.	Normal Faz Kolon.....	29
1.5.1.6.	Dedektör.....	29
1.5.1.6.1.	UV-Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS)	30
1.5.1.6.2.	Diyot Serili Dedektör (PDA)	30
1.5.1.6.3.	Floresans Dedektör	31
1.5.1.6.4.	İletkenlik Dedektörü	32
1.5.1.6.5.	Kırılma İndisi Dedektörü (RID).....	32
1.5.1.6.6.	Elektrokimyasal Dedektör	32
1.5.1.6.7.	Kütle Spektrometri Dedektörü (MS)	32
1.5.2.	Yüksek Çözünürlüklü Tarama Yöntemleri ve Kombine Teknikler (High Resolution Screening Methods and Hyphenated Techniques)	33
1.5.3.	On-line HPLC-Biyokimyasal Dedeksiyon Sistemleri	33
1.5.3.1.	On-line HPLC-Biyokimyasal Dedeksiyon Sistemleri İçin Kurulum Şemaları	34
1.5.3.2.	Laboratuvarımızda Geliştirilen On-line HPLC-BCD Yöntemleri.....	38
1.5.4.	On-line HPLC-Enzim Aktivite Dedeksiyonu (HPLC-EAD) ile İlgili Literatür Araştırması	39
1.6.	Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri.....	42
1.6.1.	Ebegümeçi (<i>Malva sylvestris</i>).....	42
1.6.2.	Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>).....	43
1.6.3.	Sumak (<i>Rhus coriaria</i>).....	44
1.6.4.	Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>)	44
1.6.5.	Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>).....	45
1.6.6.	Keçiboynuzu (<i>Ceratonia siliqua</i>)	46
1.6.7.	Ballıbaba (<i>Lamium purpureum</i>).....	46
1.6.8.	Sarı Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>).....	47

1.6.9.	Karayemiş (<i>Prunus laurocerasus</i>)	48
1.6.10.	Adaçayı (<i>Salvia officinalis</i>).....	49
1.6.11.	Sarımsak (<i>Allium sativum</i>).....	49
1.6.12.	Karanfil (<i>Syzygium aromaticum</i>)	50
1.6.13.	Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>).....	51
1.6.14.	Lavanta (<i>Lavandula officinalis</i>).....	51
1.6.15.	Nane (<i>Mentha piperita</i>).....	52
1.6.16.	Mercanköşk (<i>Origanum onites</i>)	53
1.6.17.	Kına (<i>Lawsonia inermis</i>).....	53
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	55
2.1.	Materyal	55
2.1.1.	Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	55
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
2.2.	Yöntem.....	57
2.2.1.	Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması	57
2.2.2.	Deneyde Kullanılan Kanın Temini	58
2.2.3.	Enzim Saflaştırma Çalışmaları	58
2.2.3.1.	Afinite Jelinin Sentezlenmesi	58
2.2.3.1.1.	Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi.....	58
2.2.3.1.2.	Tirozin Takılması.....	59
2.2.3.1.3.	Sülfanilamid Kenetlenmesi	61
2.2.3.2.	Afinite Kolonunun Paketlenmesi	62
2.2.3.3.	Hemolizatın Hazırlanması	63
2.2.3.4.	Afinite Kolonuna Hemolizat Tatbiki	63
2.2.3.5.	İnsan Karbonik Anhidraz I (hCAI) Elusyonu	65
2.2.3.6.	İnsan Karbonik Anhidraz II (hCAII) Elusyonu	66
2.2.3.7.	Sığır Karbonik Anhidraz (BCA) Elusyonu.....	66
2.2.4.	Protein Tayini.....	67
2.2.4.1.	Kalitatif Protein Tayini	67
2.2.4.2.	Kantitatif Protein Tayini	67
2.2.5.	Diyaliz.....	68
2.2.5.1.	Diyaliz Torbasının Aktifleştirilmesi	68
2.2.5.2.	Diyaliz İşlemi.....	69
2.2.6.	Liyofilizasyon	69

2.2.7.	SDS-Page Elektroforezinin Uygulanması.....	69
2.2.7.1.	Jelin Hazırlanması.....	70
2.2.7.2.	Örneklerin Hazırlanması ve Jele Uygulanması.....	71
2.2.7.3.	Jelin Boyanması	71
2.2.8.	Karbonik Anhidraz Enzim Aktivite Tayin Metotları.....	71
2.2.8.1.	Hidrataz Aktivitesi	71
2.2.8.1.1.	Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	72
2.2.8.1.2.	Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	73
2.2.8.1.3.	BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	75
2.2.8.1.4.	Hidrataz Aktivite Tayin Metoduyla IC ₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sülfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	75
2.2.8.2.	Esteraz Aktivitesi	76
2.2.8.2.1.	Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	78
2.2.8.2.2.	Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	79
2.2.8.2.3.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	81
2.2.8.2.4.	Esteraz Aktivite Tayin Metoduyla IC ₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sülfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	81
2.2.9.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini	83
2.2.10.	On-line HPLC-Biyoaktivite Çalışmaları.....	83
2.2.10.1.	On-line HPLC-Frap Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi	83
2.2.10.2.	On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yöntemi	84
2.2.10.2.1.	On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yöntemi Geliştirilmeden Önce Bazı Parametrelerin BCA Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	84
2.2.10.2.1.1.	BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi	84
2.2.10.2.1.2.	BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	84
2.2.10.2.1.3.	BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	85

2.2.10.2.1.4.	Substrat Çözeltisinin Bekleme Süresinin Bozunmaya Etkisi	85
2.2.10.2.2.	On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi.....	85
2.2.10.2.2.1.	HPLC-DAD-UV-CA İnhibitör Belirleme Yöntem Koşulları.....	85
2.2.10.2.2.2.	HPLC ile On-line CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi İçin Standartların Belirlenmesi	86
2.2.10.2.2.3.	Bitki Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşik Analizi için Standartların Belirlenmesi	86
2.2.10.2.2.4.	Analiz Örneğinin Hazırlanması	92
2.2.10.2.2.5.	Kromatografik Ayırma Üzerine Mobil Faz İçeriğinin ve Akış Hızının Etkisi	93
2.2.10.2.2.6.	HPLC Çözücü Sistemi	94
2.2.10.2.3.	Kombine HPLC-DAD Spektrofotometrik CAI Yöntemi	95
3.	BULGULAR.....	97
3.1.	Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları	97
3.1.1.	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	97
3.1.2.	İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCAI, hCA II ve Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	97
3.1.3.	İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCAI, hCAII ve Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	99
3.2.	Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	100
3.2.1.	Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	100
3.2.2.	Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	109
3.2.3.	Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi ile Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Korelasyonu	120
3.3.	Organik Çözücülerin Sığır Karbonik Anhidraz (BCA) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri	122
3.3.1.	Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	122
3.3.2.	Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	127
3.3.3.	BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	132

3.3.4.	Hidrataz Aktivite Tayin Metoduyla IC ₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sulfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	134
3.3.5.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sulfanilamidin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	135
3.3.6.	Esteraz Aktivite Tayin Metoduyla IC ₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sulfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	136
3.4.	Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini Bulguları	137
3.5.	On-line HPLC-Biyoaktivite Çalışma Bulguları.....	140
3.5.1.	On-line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Bulguları.....	140
3.5.2.	On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yöntem Bulguları	146
3.5.2.1.	BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi	146
3.5.2.2.	BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	147
3.5.2.3.	Substrat Çözeltisinin Bozunmasına Bağlı Absorbans Değişimi	149
3.5.2.4.	Farklı Yüzdelerde Hazırlanan Asetik Asitin pH Değerleri.....	150
3.5.2.5.	BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	150
3.5.2.6.	Kromatografik Ayırma Üzerine Mobil Faz İçeriğinin ve Akış Hızının Etkisi	152
3.5.2.7.	On-line HPLC-DAD-CAI ve Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI Yöntem Bulguları	159
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	168
5.	ÖNERİLER.....	178
6.	KAYNAKLAR	179
7.	EKLER.....	199
	ÖZGEÇMİŞ	

Doktora Tezi

ÖZET

YENİ BİR ON-LİNE HPLC-CA İNHİBİTÖR BELİRLEME YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ
VE BİYOAKTİF BİTKİ EKSTRAKTLARINA UYGULANMASI

Semra ALKAN TÜRKUÇAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2018, 198 Sayfa, 3 Sayfa Ek

Karbonik anhidraz (CA) inhibitörleri (CAI) çeşitli tedavilerde kullanılmaktadır. Doğal CAI araştırmaları giderek artan oranda ilgi görmektedir. Doğal biyoaktif bileşenlerin tespitinde on-line HPLC uygulamaları önemli avantajlar sunmaktadır. Ayrılan bileşenlerin aktivitelerinin belirlenmesinde antioksidan ve enzim inhibisyon araştırılması en fazla karşılaşılan çalışmalardır. Bu çalışmada 17 bitkiden üç çözücüyle hazırlanan 51 ekstraktın CAI aktiviteleri belirlenmiş ve yeni on-line (kombine) HPLC-DAD-CAI yöntemi geliştirilmiştir. Klasik ve HPLC yöntemlerinde kullanılabilen beş çözücünün (metanol, etanol, aseton, asetonitril, DMSO) CA aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Öncelikle sığır CA'sı (BCA), insan hCA-I ve hCA-II izoenzimleri afinite kromatografisiyle eritrositlerden saflaştırılmış, diyaliz ve liyofilizasyon sonrası SDS-PAGE kullanılarak saflık kontrolü yapılmıştır. Beş çözücünün CA enzimlerinin esteraz ve hidrataz aktivitelerini azalttığı gözlemlenmiştir. %10-15 çözücü konsantrasyonlarına kadar aktivitenin değerlendirilebileceği tespit edilmiştir. Bitki ekstraktlarının CA enzimlerinin esteraz ve hidrataz aktivitelerini baskıladığı belirlenmiştir. Ayrıca bu ekstraktların toplam fenolik madde miktarları da belirlenmiştir. Bu iki ölçüm arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Hidrataz ve esteraz aktivite inhibisyon verilerinde de ileri derecede uyum görülmüştür. Çözücünün inhibitör bileşiklerin etkilerinde yapabileceği değişiklik de araştırılmıştır. On-line HPLC sisteminde etkili olabilecek sıcaklık, pH, tampon konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle esteraz aktivitesi için araştırılmış ve uygun şartlar belirlenmiştir. Standart inhibitörler sülfanilamid ve asetazolamid kullanılarak on-line HPLC-DAD-CAI yöntemi geliştirilmiş, yöntemle konsantrasyonu bilinen bileşiğin tek konsantrasyonda uygulamayla IC₅₀ değerinin nasıl belirlenebileceği gösterilmiştir. Daha önce geliştirilmiş olan on-line HPLC-FRAP antioksidan yöntemi CAI yöntemiyle birlikte kullanılarak kombine HPLC-DAD-FRAP-Spektrofotometrik CAI yöntemi uygulaması yapılmış, yöntemin getirdiği avantajlar ortaya konmuştur. Seçilen bitki ekstraktları geliştirilen yöntemle değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntemin yüksek aktiviteye sahip, IC₅₀ değeri 50 µM'in altında olan klinik değeri yüksek bileşiklerin tespitinde kullanılabilenliği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: on-line HPLC, karbonik anhidraz, inhibitör, bitki, ekstrakt, çözücü, esteraz, hidrataz.

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NEW ON-LINE HPLC-CA METHOD FOR DETERMINING
INHIBITORS AND APPLICATION OF BIOACTIVE PLANT EXTRACTS

Semra ALKAN TÜRKUÇAR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2018, 198 Pages, 3 Pages Appendix

Carbonic anhydrase inhibitors (CAI) are used in various therapies. Investigating natural CAIs attract increasing attention. On-line HPLC applications provide advantages in identifying bioactive compounds. Antioxidant and enzyme inhibitory studies with separated compounds are frequently encountered. In this study, CAI activities of 51 extracts prepared with three solvents from 17 plants were determined, and new on-line (combined) HPLC-DAD-CAI method was developed. Effect of solvents (methanol, ethanol, acetone, acetonitrile, DMSO) used in classical and HPLC methods on CA activities was tested. Bovine CA (BCA), human hCA-I and hCA-II isozymes were isolated from erythrocytes by affinity chromatography; purity was checked with SDS-PAGE after dialysis and lyophilization. Solvents decreased esterase and hydratase activities of CAs. Activities could be evaluated below 10-15% solvent concentrations. Extracts inhibited esterase and hydratase activities. Extract total phenolic contents were also determined. Results of two measurements correlated. High correlation was observed between esterase and hydratase inhibitions. Change on effect of inhibitors by solvents was studied. Temperature, pH and buffer concentration were evaluated for on-line HPLC using spectrophotometric esterase activity, and appropriate conditions were determined. On-line HPLC-DAD-CAI method was developed using standard inhibitors sulfanilamide and acetazolamide; IC_{50} value of compounds of known concentration was determined with single concentration run. Previously developed on-line HPLC-DAD-FRAP antioxidant method was combined with CAI method, and advantages of combined HPLC-DAD-FRAP-Spectrophotometric CAI method were explored. Selected extracts were evaluated with the developed method. The new method can be utilized in identification of high activity CAI compounds with IC_{50} values lower than 50 μ M with high clinical value.

Key Words: on-line HPLC, carbonic anhydrase, inhibitor, plant, extract, solvent, esterase, hydratase.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Farklı sınıf CA'ların aktif bölgelerinin şematik gösterimi.....	8
Şekil 2. Çinko bağlayıcılar	12
Şekil 3. Çinko iyonuna bağlanan su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan inhibitörler.....	13
Şekil 4. Aktif bölge kavitesinin girişini kapatan inhibitörler	14
Şekil 5. Aktif bölge kavitesinin dışına bağlanan inhibitörler	14
Şekil 6. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	16
Şekil 7. Difenilpropan yapısı.....	17
Şekil 8. Flavan yapısı	17
Şekil 9. Flavon yapısı	17
Şekil 10. Flavonoller	18
Şekil 11. Flavanoller.....	18
Şekil 12. Flavonlar.....	19
Şekil 13. Flavanonlar.....	19
Şekil 14. İzoflavonlar	19
Şekil 15. Antosiyanidinler	19
Şekil 16. Benzoik asit türevi.....	20
Şekil 17. Sinamik asit türevi.....	20
Şekil 18. trans-Stilbenler	21
Şekil 19. cis-Stilbenler.....	21
Şekil 20. Tanninler	22
Şekil 21. Kumarinin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 22. HPLC cihazının şematik gösterimi	25
Şekil 23. Gradient programlama sisteminin şematik gösterimi.....	27
Şekil 24. Lupa örnek yüklenmesi ve mobil faz akışıyla pompadan kolona gönderilmesi	28
Şekil 25. Değişken dalga boylu UV dedektörünün şematik gösterimi.....	30
Şekil 26. Diyot serili dedektörün şematik gösterimi	31
Şekil 27. HPLC-BCD sistemleri için temel kurulum şeması	35
Şekil 28. EAD ve RAD yöntemleri için homojen kurulum şeması.....	36
Şekil 29. HPLC-BCD sistemleri için heterojen kurulum şeması	36
Şekil 30. Metabolit görüntüleme yöntemlerinde kullanılan kurulum şeması.....	37

Şekil 31.	On-line HPLC-FRAP antioksidan yöntemi için kurulum şeması	38
Şekil 32.	HPLC ile proteinlerin ayrılmasında deteksiyon amaçlı on-line yöntemin kurulum şeması	39
Şekil 33.	Ebegümecei (<i>Malva sylvestris</i>)	43
Şekil 34.	Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	43
Şekil 35.	Sumak (<i>Rhus coriaria</i>)	44
Şekil 36.	Kuşburnu (<i>Rosa canina</i>).....	45
Şekil 37.	Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)	45
Şekil 38.	Keçiboynuzu (<i>Ceratonia siliqua</i>).....	46
Şekil 39.	Ballıbaba (<i>Lamium purpureum</i>)	47
Şekil 40.	Sarı Kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>)	48
Şekil 41.	Karayemiş (<i>Prunus laurocerasus</i>)	48
Şekil 42.	Adaçayı (<i>Salvia officinalis</i>)	49
Şekil 43.	Sarımsak (<i>Allium sativum</i>)	50
Şekil 44.	Karanfil (<i>Syzygium aromaticum</i>)	50
Şekil 45.	Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>)	51
Şekil 46.	Lavanta (<i>Lavandula officinalis</i>)	52
Şekil 47.	Nane (<i>Mentha piperita</i>)	52
Şekil 48.	Mercanköşk (<i>Origanum onites</i>)	53
Şekil 49.	Kına (<i>Lawsonia inermis</i>)	54
Şekil 50.	Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi.....	59
Şekil 51.	Aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması	60
Şekil 52.	Diazolama aracılığıyla sepharose-4B-L-tirozin'e sülfanilamidin kenetlenmesi reaksiyonları	62
Şekil 53.	Afinite kromatografisi ve fraksiyon toplama düzeneği	65
Şekil 54.	Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi aracılığıyla <i>p</i> -Nitrofenil asetatın <i>p</i> -Nitrofenole dönüşüm reaksiyonu.....	77
Şekil 55.	Geliştirilen on-line HPLC-CA inhibitör belirleme sistemi (RP-HPLC-DAD-UV).....	95
Şekil 56.	Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI belirleme sistemi.....	96
Şekil 57.	Bradford metoduyla protein tayini için kullanılan standart grafik.....	97
Şekil 58.	Afinite kromatografisi ile hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin elusyon grafiği.....	98
Şekil 59.	Afinite kromatografisi ile BCA enziminin saflaştırılmasına ilişkin elusyon grafiği.....	99

Şekil 60.	SDS-PAGE elektroforezi, 1- Moleküler ağırlık markerleri (Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker), 2- hCA I, 3- hCA II, 4- BCA	100
Şekil 61.	Üç farklı çözücüde hazırlanan ebegümeci ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	101
Şekil 62.	Üç farklı çözücüde hazırlanan zerdeçal ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	101
Şekil 63.	Üç farklı çözücüde hazırlanan sumak ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	102
Şekil 64.	Üç farklı çözücüde hazırlanan kuşburnu ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	102
Şekil 65.	Üç farklı çözücüde hazırlanan zencefil ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	103
Şekil 66.	Üç farklı çözücüde hazırlanan keçiyoynuzu ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	103
Şekil 67.	Üç farklı çözücüde hazırlanan ballıbaba ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	104
Şekil 68.	Üç farklı çözücüde hazırlanan sarı kantaron ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	104
Şekil 69.	Üç farklı çözücüde hazırlanan karayemiş ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	105
Şekil 70.	Üç farklı çözücüde hazırlanan adaçayı ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	105
Şekil 71.	Üç farklı çözücüde hazırlanan sarımsak ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	106
Şekil 72.	Üç farklı çözücüde hazırlanan karanfil ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	106
Şekil 73.	Üç farklı çözücüde hazırlanan maydanoz ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	107
Şekil 74.	Üç farklı çözücüde hazırlanan lavanta ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	107
Şekil 75.	Üç farklı çözücüde hazırlanan nane ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	108
Şekil 76.	Üç farklı çözücüde hazırlanan mercanköşk ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	108
Şekil 77.	Üç farklı çözücüde hazırlanan kına ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	109
Şekil 78.	Üç farklı çözücüde hazırlanan ebegümeci ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	110
Şekil 79.	Üç farklı çözücüde hazırlanan zerdeçal ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	110

Şekil 80.	Üç farklı çözücüde hazırlanan sumak ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	111
Şekil 81.	Üç farklı çözücüde hazırlanan kuşburnu ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	111
Şekil 82.	Üç farklı çözücüde hazırlanan zencefil ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	112
Şekil 83.	Üç farklı çözücüde hazırlanan keçiboynuzu ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	112
Şekil 84.	Üç farklı çözücüde hazırlanan ballıbaba ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	113
Şekil 85.	Üç farklı çözücüde hazırlanan sarı kantaron ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	113
Şekil 86.	Üç farklı çözücüde hazırlanan karayemiş ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	114
Şekil 87.	Üç farklı çözücüde hazırlanan adaçayı ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	114
Şekil 88.	Üç farklı çözücüde hazırlanan sarımsak ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	115
Şekil 89.	Üç farklı çözücüde hazırlanan karanfil ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	115
Şekil 90.	Üç farklı çözücüde hazırlanan maydanoz ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	116
Şekil 91.	Üç farklı çözücüde hazırlanan lavanta ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	116
Şekil 92.	Üç farklı çözücüde hazırlanan nane ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	117
Şekil 93.	Üç farklı çözücüde hazırlanan mercanköşk ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	117
Şekil 94.	Üç farklı çözücüde hazırlanan kına ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	118
Şekil 95.	Üç farklı çözücüde hazırlanan 17 bitki ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	119
Şekil 96.	Üç farklı çözücüde hazırlanan 17 bitki ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri	120
Şekil 97.	%100 Su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının CA'nın hidrataz aktivitesi ile esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	121
Şekil 98.	%40 Asetonitril ile hazırlanan bitki ekstraktlarının CA'nın hidrataz aktivitesi ile esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	121

Şekil 99.	%40 Metanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının CA'nın hidrataz aktivitesi ile esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerlerinin korelasyonu	122
Şekil 100.	Asetonitrilin BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	123
Şekil 101.	Asetonitrilin BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi	123
Şekil 102.	Asetonun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	124
Şekil 103.	Asetonun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi	124
Şekil 104.	Metanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	125
Şekil 105.	Metanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi	125
Şekil 106.	Etanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	126
Şekil 107.	Etanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi	126
Şekil 108.	DMSO'nun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	127
Şekil 109.	DMSO'nun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi	127
Şekil 110.	Asetonitrilin BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	128
Şekil 111.	Asetonitrilin BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi	128
Şekil 112.	Asetonun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	129
Şekil 113.	Asetonun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi	129
Şekil 114.	Metanolün BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	130
Şekil 115.	Metanolün BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi	130
Şekil 116.	Etanolün BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	131
Şekil 117.	Etanolün BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi	131

Şekil 118.	DMSO'nun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri	132
Şekil 119.	DMSO'nun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi	132
Şekil 120.	BCA enziminin hidrataz aktivite yöntemi ile çalışılan 5 farklı sülfanilamid konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği	133
Şekil 121.	BCA enziminin hidrataz aktivite metodu ile çalışılan 5 farklı asetazolamid konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Asetazolamid] grafiği	133
Şekil 122.	Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC ₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi	134
Şekil 123.	BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı sülfanilamid konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği	135
Şekil 124.	BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı asetazolamid konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Asetazolamid] grafiği	136
Şekil 125.	Esteraz aktivite tayin metoduyla IC ₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi	137
Şekil 126.	Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak kullanılan gallik asitin farklı konsantrasyonlarına karşı 765 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği	138
Şekil 127.	17 bitki ekstraktına ait toplam fenolik madde miktarları (mL numunede eşdeğer miktarda µg gallik asit)	139
Şekil 128.	Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak kullanılan kateşinin farklı konsantrasyonlarına karşı 765 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği	139
Şekil 129.	17 bitki ekstraktına ait toplam fenolik madde miktarları (mL numunede eşdeğer miktarda µg kateşin)	140
Şekil 130.	Standartların 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları (1) gallik asit, (2) protokatekuik asit, (3) klorojenik asit, (4) kafeik asit, (5) p-kumarik asit, (6) sinapik asit (her bir standart konsantrasyonu 500 µM)	141
Şekil 131.	Standartların 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm'deki pik yükseklikleri (mAU)	141

Şekil 132.	Standartların 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları (1) protokatekualdehit, (2) vanilik asit, (3) ferulik asit, (4) kuersetin (her bir standart konsantrasyonu 500 µM)	142
Şekil 133.	Standartların 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm'deki pik yükseklikleri (mAU)	142
Şekil 134.	Standartların 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları (1) p-hidroksibenzoik asit, (2) siringik asit, (3) siringaldehit, (4) benzoik asit (her bir standart konsantrasyonu 500 µM).....	143
Şekil 135.	Standartların 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm'deki pik yükseklikleri (mAU)	143
Şekil 136.	Adaçayının (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları	144
Şekil 137.	Sarı kantaronun (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları	144
Şekil 138.	Karanfilin (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları.....	145
Şekil 139.	Sumağın (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları.....	145
Şekil 140.	BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi	146
Şekil 141.	25°C sıcaklık değerinde BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi	147
Şekil 142.	BCA enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	148
Şekil 143.	37°C sıcaklık değerinde (vücut sıcaklığında) BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi.....	148
Şekil 144.	50°C sıcaklık değerinde BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi	149
Şekil 145.	Hazırlanan substrat 16 ve 32 saat sonrasında 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 seyreltilerek spektrofotometrede okunmasıyla elde edilen absorbans değerleri.....	149
Şekil 146.	Farklı yüzdelerde hazırlanan asetik asitin (%0,5; %1; %1,5; %2; %2,5; %3; %3,5; %4) pH değerleri.....	150
Şekil 147.	%100 su ile enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi.....	151

Şekil 148.	%90A-%10B gradiyetinde enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi	151
Şekil 149.	%70A-%30B gradiyetinde enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi	152
Şekil 150.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	153
Şekil 151.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)	153
Şekil 152.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,2 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	154
Şekil 153.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,2 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)	154
Şekil 154.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,3 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	155
Şekil 155.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,3 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)	155
Şekil 156.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,4 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	156
Şekil 157.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,4 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)	156
Şekil 158.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	157
Şekil 159.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)	157
Şekil 160.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	158
Şekil 161.	Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5 asetik asit olduğunda standartların UV280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)	158
Şekil 162.	Sülfanilamidin HPLC şartlarında spektrofotometrik esteraz aktivite tayin yöntemiyle IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	159

Şekil 163.	Asetazolamidin HPLC şartlarında spektrofotometrik esteraz aktivite tayin yöntemiyle IC ₅₀ değerinin belirlenmesi.....	160
Şekil 164.	On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle elde edilen sülfanilamid ve asetazolamidin esteraz aktivite sonuçları	160
Şekil 165.	On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle sülfanilamidin konsantrasyona karşı pik alanı grafiği.....	161
Şekil 166.	On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle sülfanilamidin konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafiği.....	162
Şekil 167.	On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle asetazolamidin konsantrasyona karşı pik alanı grafiği.....	162
Şekil 168.	On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle asetazolamidin konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafiği.....	163
Şekil 169.	İnhibitör konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak pik yüksekliği ve pik alanının değişimi	163
Şekil 170.	Kombine HPLC-DAD spektrofotometrik CAI belirleme yönteminde fraksiyon toplayıcıda toplanan sülfanilamid ve asetazolamidin spektrofotometrik yöntemle esteraz aktivite sonuçları.....	164
Şekil 171.	Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemiyle elde edilen kromatogramlar ve asetazolamid ve sülfanilamidin esteraz aktivite sonuçları	164
Şekil 172.	İnhibitörlerin DAD 280 nm' deki kromatogramlarından toplam pik alanının bir tüpte toplanan eluatın dakikasına bağlı olarak alanlara bölünmesinin gösterimi	165
Şekil 173.	Dakikaya karşı absorbans grafiği çizilerek bu grafikten her bir fraksiyonun absorbansının bulunmasının gösterimi (Şekil 173).....	165
Şekil 174.	Toplanan fraksiyonlarda sülfanilamid IC ₅₀ değerinin belirlenmesi için yapılan spektrofotometrik esteraz aktivite ölçüm sonuçları.....	165
Şekil 175.	Toplanan fraksiyonlarda asetazolamid IC ₅₀ değerinin belirlenmesi için yapılan spektrofotometrik esteraz aktivite ölçüm sonuçları.....	166
Şekil 176.	Sumağın (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları ve kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemiyle elde edilen esteraz aktivite sonuçları	166
Şekil 177.	Karanfilin (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları ve kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemiyle elde edilen esteraz aktivite sonuçları	167
Şekil 178.	Gilaburu meyvesinin metanollü ekstraktının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine etkisi.....	177

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Geliştirilen HPLC-EAD yöntemleri ve biyoaktiflerin ilgili terapötik alanları.....	41
Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları	55
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları.....	56
Tablo 4. Elektroforez jeli için kullanılan madde miktarları	70
Tablo 5. Bitki ekstraktlarının BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi kullanılan maddeler.....	72
Tablo 6. Organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi kullanılan maddeler.....	74
Tablo 7. Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC ₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesinde kullanılan maddeler	76
Tablo 8. Esteraz aktivitesi için 2 mL'lik kuvars küvetlerde kullanılan çözeltiler.....	78
Tablo 9. Bitki ekstraktlarının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesinde kullanılan maddeler.....	78
Tablo 10. Organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesinde kullanılan maddeler	80
Tablo 11. Esteraz aktivite tayin metoduyla IC ₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesinde kullanılan maddeler	82
Tablo 12. HPLC ile on-line CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesinde kullanılan standartlar	86
Tablo 13. Bitki ekstraktlarındaki fenolik bileşik analizinde kullanılan standartlar	87
Tablo 14. Kullanılan standartların spektrumları.....	89
Tablo 15. Standartların stok çözeltilerinin hazırlanmasında yararlanılan veriler.....	93
Tablo 16. HPLC'de çözücü sistemi.....	94
Tablo 17. Fenolik bileşiklerin HPLC'de ayrılmasında kullanılan hareketli faz gradient programı	94

Tablo 18.	Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC ₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik zclerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	135
Tablo 19.	Esteraz aktivite tayin metoduyla IC ₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik zclerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	137



SEMBOLLER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sülfonik asit)
AChE	: Asetilkolinesteraz
BCA	: Sığır Karbonik Anhidraz
BCD	: Biyokimyasal Deteksiyon
BSA	: Sığır Serum Albümin
C₁₈	: Oktadesil
CA	: Karbonik Anhidraz
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
Zn⁺²	: Çinko (II) iyonu
DAD	: Çoklu Diyot Serili Dedektör (diode array dedector)
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EAD	: Enzim Afinite Deteksiyonu
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
FeCl₃	: Demir (III) klorür
FIA	: Akış Enjeksiyonu Analizi
FRAP	: Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
hCA-I	: İnsan Karbonik Anhidraz-I
hCA-II	: İnsan Karbonik Anhidraz-II
HCl	: Hidroklorik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-UV	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör
IC₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	: Kilodalton
K_i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K_m	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
M	: Molar

MeOH	: Metanol
MS	: Kütle Spektrometri Dedektörü
Me²⁺	: Metal (II) iyonu
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
nm	: Nanometre
p-	: para (-R grubunun 1,4 bağlanma pozisyonu)
PBS	: Tuzlu Fosfat Tamponu
PDA	: Fotodiyot Array Dedektör
ppm	: Milyonda bir kısım
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RAD	: Reseptör Afinite Deteksiyonu
RID	: Refraktif İndeks Dedektör
RP	: Ters faz (reverse phase)
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
RT	: Tutulma Zamanı (Retention time)
THF	: Tetrahidrofuran
TEAC	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TOF	: Uçuş zamanlı (Time of Flight)
TPTZ	: 2,4,6-tripiridil-s-triazin
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
Troloks®	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole- Görünür Bölge
V	: Volt
V_{max}	: Maksimum hız
vd.	: ve diğerleri
Q	: Kuadropol (Quadrupole)
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama

δ	:	Delta
ζ	:	Zeta
η	:	Eta
μg	:	Mikrogram
μL	:	Mikrolitre
μm	:	Mikrometre
μM	:	Mikromolar

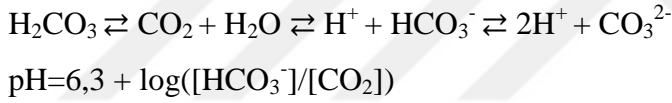


1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Karbonik anhidraz (CA), karbondioksit (CO₂) ve bikarbonat iyonu (HCO₃⁻) arasında karşılıklı dönüşümü gerçekleştiren bir metaloenzimdir (Supuran ve Scozzafava, 2001). Dünyadaki yaşamın kilit bir unsuru olan ve tüm biyoorganik bileşiklerin temelini oluşturan karbonun, CA enziminin substratının ana bileşeni olması, doğada CA'ların neden bu kadar geniş dağılım gösterdiği gerçeğini açıklamaktadır. Karbon temelli yaşamın evrensel bir enzimini temsil eden CA'ların 16 farklı izoenzimi olmasına rağmen, hepsi CO₂/HCO₃⁻ karşılıklı dönüşümünü gerçekleştirirler (Kupriyanova vd., 2017).

Sulu çözeltilerde H₂CO₃, CO₂, HCO₃⁻ ve CO₃²⁻ gibi çeşitli şekillerde denge halinde bulunabilen inorganik karbonun konsantrasyonlarının oranı, Henderson-Hasselbalch denklemine göre çözeltinin pH'ına bağlıdır.



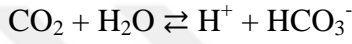
CO₂ ve HCO₃⁻, pH 6,3'te, eşit miktarlarda bulunur. Denge, bu değer altında CO₂ oluşumuna doğru kayarken, alkali pH değerinde HCO₃⁻ baskındır. pH değeri 10,3'ün üzerinde olduğunda, inorganik karbon, CO₃²⁻ iyonu halinde bulunur (Rabinowitch, 1945).

Organik moleküllerin yanısıra, canlılar ya biyokimyasal reaksiyonların substratı olarak ya da son ürün olarak inorganik karbon içerirler. İnorganik karbon, fizyolojik çözeltilerin pH'ları nötral değerlerde tutulduğunda, başlıca CO₂ ve HCO₃⁻ olarak bulunur. Bikarbonat iyonunun sulu çözeltilerde çözünürlüğü yüksektir, fakat lipitlerde çözünürlüğü çok azdır. Bu yüzden HCO₃⁻ iyonunun hücre membranından geçebilmesi için taşınması gerekir. CO₂'in ise hem lipitlerde, hem de sulu çözeltilerde çözünürlüğü yüksektir. Bu yüzden, CO₂ hücre içine ve dışına kolaylıkla difüze olur. CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki denge, pH 6,3'ün üzerinde olduğu zaman, HCO₃⁻'a doğru kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO₂ ve HCO₃⁻ konsantrasyonlarının sürdürülebilmesinde sorunlar oluşur. CO₂'in hücre içinde tutulması için HCO₃⁻'a dönüşmesi gerekir. HCO₃⁻'ın CO₂'e dönüşümü ise HCO₃⁻'in hücre içine girişini kolaylaştırır (Rabinowitch, 1945). CO₂'in HCO₃⁻'a dönüşümü fizyolojik pH'da çok yavaştır ve enzim tarafından katalizlenmesi gerekir. İşte CO₂ ve

HCO₃⁻'in birbirlerine dönüşüm reaksiyonlarını katalizleyen enzim Karbonik anhidraz enzimidir (Smith ve Ferry, 2000).

1.2. Karbonik Anhidraz (CA)

Canlılarda CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki karşılıklı dönüşümün hızlanması aktif bölgesinde çinko (Zn²⁺) içeren bir metaloenzim olan Karbonik anhidraz (CA, karbonat dehidrataz, karbonat hidrolizaz, EC: 4.2.1.1) tarafından sağlanır ve aşağıdaki tersinir reaksiyonu katalizler. Bu reaksiyon katalizör olmadığında oldukça yavaş meydana gelir (Badger and Price, 1994; Supuran and Scozzafava, 2001).



CA'lar canlı organizmaların tüm gruplarında bulunur. Amino asit dizilişlerinde ve aktif bölge yapılarında çeşitli farklılıklar göstermelerine rağmen, aynı reaksiyonu katalizlerler (Hewett-Emmett and Tashian, 1996; Liljas and Laurberg 2000).

CA, herhangi bir canlı organizmanın en iyi şekilde çalışması için kesinlikle gerekli olmakla birlikte, aynı fonksiyonu yerine getiren 16 tane izoenzimi mevcuttur. Böylelikle CA' lar karbon temelli yaşamın evrensel bir enzimidir. Kuşkusuz, bu durum inorganik karbondan çeşitli biyomoleküllerin sentezini, dönüşümünü ve inorganik karbon içeren maddelere ayrışmasını içeren karbon döngüsünde CA'nın kilit rolünden kaynaklıdır. Hayvanlarda CA' lar dokulardan dış çevreye CO₂ taşınmasında görev alan global katabolik solunumda dahil birçok fizyolojik reaksiyonlara katılırlar. Fotosentetik hücrelerin CA' ları, ekolojik ve biyosferik seviyelerde olağanüstü bir öneme sahiptir (Kupriyanova vd., 2017).

1.2.1. Literatürde CA Çalışmaları

CA' ların varlığı ilk önce teorik olarak öngörülmüştür. CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki karşılıklı dönüşüm reaksiyonunun enzim olmadan oldukça yavaş ilerlemesi, canlı organizmaların etkin işleyişi için bazı katalitik faktörlere sahip olması gerektiği fikrini ileri sürmüştür. Bu faktörlerin araştırılması, ilk olarak akciğerlerdeki gaz alışverişinde HCO₃⁻' in CO₂' e dönüşümünün hızlandığı hayvan kırmızı kan hücreleri üzerinde yoğunlaştırıldı. 1933 yılında, CA aktivitesini belirleyen ve enzimin ham saflaştırmasını gerçekleştiren iki araştırma grubu tarafından bağımsız olarak keşfedildi. (Meldrum ve Roughton, 1933;

Stadie ve O'Brien, 1933). Daha fazla protein saflaştırması ve biyokimyasal karakterizasyonu ile birlikte, bu hayvansal enzimin, aktif bölgesinde Zn^{2+} taşıdığı ortaya çıktı (Keilin ve Mann, 1944). İlk bitki CA' sı, *Trifolium pratense* ve *Onoclea sensibilis*'in kloroplastlarından izole edildi (Neish 1939). Bir gen kodlayan kloroplast benzeri CA daha sonra siyanobakteride keşfedildi (Fukuzawa vd., 1992).

1963 yılında, bakteriyel bir CA hakkında ilk rapor ortaya çıktı (Veitch ve Blankenship, 1963). 1989' da Archaea' da, *Methanosarcina barkeri*, CA'nın spesifik bir enzim aktivitesi bulundu (Karrasch vd., 1989). Bir süre sonra, saflaştırıldı ve *Metanosarcina thermophila*'dan karakterize edildi (Alber ve Ferry, 1994). 2005 yılında, fungal CA kodlayan bir gen, *Saccharomyces cerevisiae*' den klonlandı (Amoroso vd., 2005).

CA'lar olmadan yaşayabilen bir organizma yoktur. Enzim arkea, bakteri ve ökaryot gibi üç yaşam alanının tüm taksonomik gruplarında bulunur. CA' lar birçok organlarda, dokularda ve hücresel kompartımanlarda bulunur. Ayrıca, bir organizma veya hücre aynı anda farklı işlevleri yerine getiren birkaç farklı CA' ya sahip olabilir. CA' lar, substrat veya ürünler olarak CO_2 veya bikarbonatın kullanıldığı enzimatik reaksiyonların çeşitliliği nedeniyle çeşitli organizma grupları arasında yaygındır. Ayrıca, geri dönüşümlü CO_2 hidrasyonunun diğer iki katılımcısı H^+ ve H_2O , hücresel homeostazinin sürdürülebilirliği için de çok önemlidir (Supuran, 2016).

İlk CA'nın 1933'de keşfedilmesinden bu yana, 80 yılı aşkın bir süre geçti. Başlangıçta, tüm çalışmalar büyük ölçüde hayvansal enzimlerin biyokimyasal özellikleri ve katalitik aktivitesi üzerine odaklanılmıştır. CA yapısı ve katalitik mekanizmalarıyla ilgili daha ileri çalışmalar, X-ışını kristalografisinin gelişmesinden ve biyoorganik kimya ve moleküler klonlama yöntemlerinden sonra ortaya çıkmıştır. Nitekim, insan eritrositlerinden (hCAI ve hCAII) gelen iki enzimin tam olarak birincil amino asit dizileri 1970' lerin başında tespit edilmiştir (Andersson vd., 1972; Henderson vd., 1973; Lin ve Deutsch, 1973; Lin ve Deutsch, 1974). Hemen hemen eş zamanlı olarak, hCAII için kristal yapı belirlenmiştir (Liljas vd., 1972).

Bununla birlikte, hCAII' nin katalitik mekanizması, enzimin keşfinden 55 yıl sonra kristalografik verilere dayanılarak, 1988'de önerilmiştir (Silverman ve Lindskog, 1988) . Yüksek bitki kloroplast CA' larının hayvan CA' larının bulunmasından sadece altı yıl sonra bulunmasına rağmen, bitki proteinlerinin yapısı ve işlevi üzerine çalışmalar halen çok geride kaldı. Bununla birlikte, son on yılda, fotosentez sürecine katılımlarının iyi

belgelendiği mikroalg ve siyanobakteriyel CA'lar üzerinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir (Giordano vd., 2005, Price vd., 2008, Kupriyanova vd., 2013, Long vd., 2016).

1.2.2. CA Sınıfları ve Organizmalardaki Dağılımı

Günümüzde bilinen tüm CA' lar α , β , γ , δ , ζ , η CA olarak altı farklı sınıfa ayrılmıştır. Bu sınıflandırma yapılırken, proteinin amino asit dizilişı, üç boyutlu yapısı, aktif bölgenin yapısı ve katalitik özellikleri esas alınmıştır (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996; Liljas ve Laurberg, 2000; Supuran, 2016).

1.2.2.1. α -Sınıfı CA

Hayvan kırmızı kan hücrelerinden izole edilen α -Sınıfı CA' lar tarihsel olarak ilk tanımlanan CA' lardır. Çoğu α -Sınıfı CA' lar yaklaşık olarak 30 kDa moleköl kütleli olan monomerlerdir (Supuran, 2016). α -Sınıfı CA' lar evrimsel olarak en genç gruptur. Çünkü insanlar da dahil olmak üzere memelilerde bulunurlar ve bunların prokaryotlarda dağılımı oldukça kısıtlıdır (Smith ve Ferry, 2000). Şu anda α -Sınıfı CA' lar, doku ve organ dağılımı ve hücre içi yerleşimleri farklı olan 16 memeli CA izoformunu kapsamakta olup, bunların 15' i insanlarda mevcuttur (Alterio vd., 2012; Supuran, 2016). α -Sınıfı CA' lar ayrıca gelişmiş bitkiler ve ökaryot yosunlarda, bazı mantar türlerinde ve tek hücreli canlılarda, bazı bakteri ve siyano bakteriler içinde karakteristiktir (Elleuche ve Pöggeler, 2010; Supuran, 2016). Bununla birlikte arkealarda α -Sınıfı CA' lara rastlanılmamıştır (Kumar ve Ferry, 2014).

1.2.2.2. β -Sınıfı CA

β -Sınıfı CA'lar, α -Sınıfı memeli CA' larından sonra keşfedilen bitki enzimleridir (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996). Bu sınıf CA'lar, katalitik olarak bir dimer ile moleköl kütleleri 45 ila 200 kDa arasında değişen kuaterner yapıları bakımından çok çeşitlidir (Rowlett, 2014). Uzun süredir CA'nın β -sınıfının sadece gelişmiş bitkilerin kloroplastlarındaki enzimlerden oluştuğu ve bu enzimlerin "bitki CA'ları" olarak

adlandırıldığı düşünülüyordu. 1990' lı yıllardan bu yana yapılan araştırmalarla birlikte, bu enzim sınıfının çok yaygın bir sınıf olduğu ortaya çıktı. α -sınıfı CA' ların aksine, β -sınıfı CA' lar ökaryotlar, bakteriler ve arkealarda bulunmaktadır. Mikroalgler, siyanobakteriler, bakteriler, mantarlar, arkealar, C₃ ve C₄ bitkileri ve omurgasız hayvanlar da dahil çoğu organizmalar bu sınıf enzime sahiptirler (Rowlett, 2014).

1.2.2.3. γ -Sınıfı CA

1994 yılında, anaerobik arkea olan *Methanosarcina thermophila*'dan izole edilen γ -sınıfına ait olan bu CA proteini "Cam" olarak adlandırılır. Cam' ın amino asit dizilimi, CA' ların bilinen β -sınıfı ve α -sınıfı enzimleri ile herhangi bir anlamlı homoloji göstermemiştir (Alber ve Ferry, 1994). Böylelikle, Cam enzimi, CA' ların üçüncü γ sınıfının ilk örneği haline gelmiştir (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996). Camın aktif formu, ~ 23 kDa'lık monomerlere sahip, homojen bir homotrimer olup, bu sınıfta protein sarmalı sol el β - sarmal motifine sahiptir (Ferry, 2010). Bu sınıf enzimler çoğunlukla bakteri ve arkealarda bulunmakla birlikte yaşamın üç alanında bulunmaktadır (Ferry, 2010; Kumar ve Ferry, 2014). Prokaryotlarda (arkea, bakteri ve siyanobakteriler), γ -sınıfı CA' lar farklı hücre içi yerleşimlere sahiptir ve farklı fonksiyonları yerine getirirler (Ferry, 2010; Kumar ve Ferry, 2014). Ökaryotlarda γ -sınıfı CA' lar çoğunlukla mitokondride bulunur (Klodmann vd., 2010; Moroney vd., 2011).

1.2.2.4. δ -Sınıfı CA

1997 yılında, marina diatomu olan *Thalassiosira weissflogii* canlısından yeni bir CA elde edildi (Roberts vd., 1997). ~ 34 kDa ağırlığında olan bu enzim TWCA1 olarak adlandırıldı. Aktif bölgesinin yapısı ve geometrisi α - ve γ -CA'larinkine benzerdi (Cox vd., 2000). Fakat, TWCA1'in amino asit diziliminin, bilinen üç CA sınıfı ile önemli bir benzerliği yoktu ve bu nedenle bu sınıf δ -sınıfı CA olarak belirlendi (Tripp vd., 2001). Daha sonraları diğer δ -sınıfı CA' lar marina fitoplanktonlarının bazı temsilcilerinde bulundu (Supuran, 2016). Bu δ -sınıfı CA' lar üzerinde oldukça az çalışma mevcuttur. δ -sınıfı CA' ların ilk temsilcilerinin bundan yaklaşık 20 yıl önce keşfedilmesine rağmen

(Roberts vd., 1997), fizikokimyasal, biyokimyasal ve katalitik özellikleri hakkındaki veriler kısa süre önce erişime açıldı (Del Prete vd., 2014; Vullo vd., 2014).

1.2.2.5. ζ-Sınıfı CA

Kadmiyum CA' lar da denilen ζ-sınıfı CA' ları ilk temsilcisi, marina diatomu olan *T. weissflogii*'den izole edildi (Lane ve Morel, 2000). Bu saflaştırılmış 43 kDa'lık protein CDCA olarak belirlenmiştir (Lane ve Morel, 2000). 5 yıl sonra, CDCA'nın amino asit dizisi ve kesin molekül kütlesi (69 kDa) belirlendi (Lane vd., 2005). CDCA'nın bilinen diğer CA sınıflarının proteinleri ile önemli bir benzerliği yoktu ve bu nedenle ζ-sınıfı CA olarak atfedildi (Park vd., 2007).

1.2.2.6. η-Sınıfı CA

Bu sınıf CA' lar son zamanlarda keşfedildi (Del Prete vd., 2014). Bu CA için bir gen, insanda sıtmaya neden olan protozoa parazit *Plasmodium falciparum*'dan yaklaşık on yıl önce klonlandı. Karşılık gelen protein PFCA olarak adlandırıldı ve ilk olarak α-sınıfı CA olarak belirlendi (Reungprapavut vd., 2004). Daha sonra yapılan araştırmalarda PFCA ve α-sınıfı CA arasında önemli farklar olduğu ortaya çıktı. İnhibitör analiz verilerindeki farklılıklara ek olarak, protozoanın enzimlerinin, amino asit dizilimlerinin benzersiz bir şekilde korunmuş özelliklere sahip olduğu ve bu özelliklerin α-sınıfı CA'ların aktif bölge yapısından farklı olduğu hipotezi ortaya atıldı (Del Prete vd., 2014). Hesaplamalı yaklaşım bu hipotezi doğruladı ve bu sınıf enzimlerin α-sınıfı CA' lara kıyasla aktif bölgelerinde tamamen farklı metal iyon koordinasyonuna sahip olduğunu ortaya çıkardı (De Simone vd., 2015). Şu anda, η-CA'lar sadece Plasmodium cinsi enzimler tarafından temsil edilmektedir. Bu proteinlerin yapısı hakkında kesin veriler henüz mevcut değildir çünkü η-CA'ların hiçbiri kristalize edilmemiştir. Genel olarak, η-CA'lar önemli ölçüde spesifik aktiviteye sahip yaklaşık 30 kDa'lık (α -CA'lara benzer şekilde) polipeptidler tarafından temsil edilmektedir (Del Prete vd., 2014, Supuran, 2016).

1.2.3. CA'ların Aktif Bölgesi ve Katalitik Mekanizması

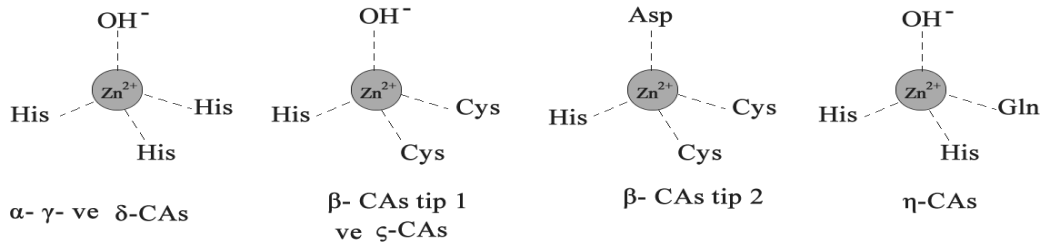
Tüm CA' lar bir protein alt birimi başına bir metal iyonu içeren enzimlerdir. Enzimin aktif bölgesindeki metal iyonu, +2 yüklü katyon (Me^{2+}) formunda bulunur. Katalitik aktiviteyi sürdürmek için, altı CA sınıfının tümü de, bir metal iyonu olarak Zn^{2+} kullanabilir. ζ -sınıfı CA'larda Zn^{2+} , Cd^{2+} ile yer değiştirebilir (Xu vd., 2008). γ -Sınıfı CA' lar, anaerobik koşullar altında Fe^{2+} kullanabilir (Zimmerman vd., 2010) ve aktivitesini Co^{2+} ile muhafaza edebilir (Iverson vd., 2000). Co^{2+} , birçok α -Sınıfı CA' da katalitik aktivitenin önemli bir kaybı olmaksızın Zn^{2+} ile yer değiştirebilir (Supuran, 2016).

Kristalografik çalışmalar, CA' ların aktif bölgesinin, Me^{2+} iyonu ile üç amino asit ve bir deprotonlanmış su molekülü (hidroksit iyonu) tarafından oluşturulan tetrahedral geometrinin bir boşluğu olduğunu göstermiştir. Sonucu molekül aktif bölgeyi çevreleyen amino asitlere hidrojen bağıyla bağlanır (Supuran, 2016).

Bu ligandlar, CA'ların her sınıfında ve ayrıca aktif bölgenin doğru yapısının katalizinde veya oluşumunda yer alan amino asitler içinde kesinlikle korunmaktadır. α , γ , δ -CA' larda enzimin aktif bölgesinde Me^{2+} iyonu ile koordinasyon yapan üç His aminoasidi ve bir OH^- iyonu bulunur (Supuran, 2016).

Tüm β -sınıfı CA'lar, aktif merkezdeki dördüncü ligandın ve komşu amino asitlerin doğasına göre iki gruba ayrılmıştır (Rowlett, 2014; Supuran, 2016).

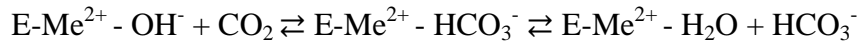
Tip 1 β -sınıfı CA'larda (açık aktif bölge olarak adlandırılan enzimler) Me^{2+} iyonu ile koordinasyon yapan bir His, iki Cys amino asidi ve bir OH^- iyonu bulunur. Tip 2 β -sınıfı CA'larda (kapalı aktif bölgeye sahip olan enzimler) Tip 1 β -sınıfı CA'lardan farklı olarak OH^- iyonu yerine Asp amino asidi bulunur. Bu enzimler sadece 8,3' ün üstündeki pH' larda aktiftir (Suarez Covarrubias vd., 2005). Bu özel ortam, kataliz için gerekli olan bir su molekülünün (hidroksit iyonu) "kapalı aktif bölge" den "açık aktif bölge" ye geçişini desteklemektedir (Rowlett, 2014). ζ -sınıfı CA' ların aktif bölgesinin yapısı β -CA'larda tip I'e benzemektedir (Xu *et al.* 2008). η -Sınıfı CA' larda, Me^{2+} , OH^- iyonuna ilaveten iki His ve bir Gln amino asidi tarafından koordine edilir (De Simone vd., 2015).



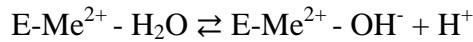
Şekil 1. Farklı sınıf CA'ların aktif bölgelerinin şematik gösterimi

CA'ların katalitik mekanizması ilk olarak insan α -CAII için tanımlanmıştır (Silverman ve Lindskog, 1988). Açık kataliz mekanizması 'Zn-hidroksit' olarak adlandırılmıştır. Çünkü hCAII' nin katalitik olarak aktif grubu, bir hidroksit iyonuna iyonlaştırılan Zn bağlı su molekülüydü. Metal iyon kendi başına bir katalizör görevi görece kadar nükleofilik değildir. Daha sonra, tüm CA sınıflarının, katalitik aktif türler olarak iki değerlikli metal hidroksit türevleri kullanan metal-hidroksit mekanizması kullandıkları bulundu (Supuran, 2016).

Kataliz iki aşamada gerçekleştirilir (Boone vd., 2014). Birinci aşama, CO_2 'nin HCO_3^- 'a dönüştürülmesini içerir. Enzimin (E) aktif bölgesindeki metal hidroksit türevi, bir CO_2 molekülüne saldıran güçlü bir nükleofildir. Bu basamak, Me^{2+} ye bağlı HCO_3^- iyonu oluşumuna yol açar. Daha sonra, HCO_3^- iyonu su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye bırakılır. Bu, Me^{2+} ye koordine edilen su ile, enzimin inaktif bir asit formunu üretir.



İkinci aşamada, enzimin aktif bölgesindeki bir su molekülünün iyonlaşması ve bir protonun aktif bölgeden dış çözücü ortama uzaklaştırılmasıyla enzimin aktif temel formu yeniden oluşturulur.



Protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması ve enzimin metal hidroksit türlerinin geri kazanılması, katalitik sürecin hız sınırlayıcı basamağıdır. Reaksiyonun başında, CO_2 molekülü, CA aktif bölgesinin hidrofobik bölgesinin belirli bir kısmına (hidrofobik cep) bağlanır; bu daha sonraki nükleofilik bir saldırıyı kolaylaştırır (Domsic vd., 2008). Hidrofilik kısım, bir protonun çinkoya bağlı sudan uzaklaştırılmasına ve PSR'lerin (proton shuttle residues) yardımı ile harici ortama atılmasına katkıda bulunarak aktif bölgenin yenilenmesini sağlar (Silverman ve McKenna, 2007).

1.2.4. Memelilerdeki CA İzoenzimleri

CA' lar moleküler özellikleri, oligomerik düzenleri, hücrel lokalizasyonları, doku ve organlardaki dağılımları, kinetik özellikleri ve inhibitörlere karşı duyarlılıkları farklı olan izoenzimler tarafından temsil edilirler. Memelilerin farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 16 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir. (Supuran ve Scozzafava, 2007; Supuran, 2008a; Simone vd., 2009)

Bu izoenzimlerden CA- I, -II, -III, - VII ve -XIII beş tanesi sitozolik, CA-IV, CA-IX, CA-XII ve CA-XIV ise membrana bağlıdır. CA-VA ve CA-VB mitokondriyaldir, CA-VI tükürükte salgılanır. CA-XV de insanlarda eksprese olmaz, yüksek omurgalılarda olur (Hilvo *et al.* 2005). Ayrıca 3 tanesi CARP-VIII, CARP-X ve CARP-XI katalitik olmayan formdadır. Bunlara CA ile ilgili protein denir (CARPs) (Supuran ve Scozzafava, 2007). CA izoenzimleri: böbrek, mide mukozası, göz merceği, tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve rahimde aktif özelliklere sahiptir (Gülçin ve Beydemir, 2013; Arabaci vd., 2014). CA izoformları birçok önemli biyolojik sürece katılırlar ve çeşitli dokularda bulunurlar. Çalışmalar, çeşitli fizyolojik prosedürlerde CA'ların önemli rol üstlendiklerini ve bu enzimlerin olağanüstü seviyelerinin veya aktivitelerinin, genellikle farklı insan hastalıklarıyla ilişkili olduğunu gösterdi (Innocenti vd., 2010a; Göçer vd., 2014).

1.2.5. CA'ların İşlevsel ve Fizyolojik Önemi

CA'nın işlevsel rolü, canlılarda CO₂'in hidrasyonunu ve HCO₃⁻'in dehidrasyonunu geri dönüşümlü katalizlemesine bağlıdır (Henry, 1996, Smith ve Ferry, 2000). Enzimin dahil olduğu birçok biyolojik süreç vardır. Solunum, pH ve CO₂ homeostazında, HCO₃⁻'in dokular ve akciğerler arasında metabolize olmasında, birçok biyosentez reaksiyonunda (glukoneogenez, lipogenez, üregenez vb.), doku ve organlardaki elektrolit sekresyonunda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi daha birçok fizyolojik ve patolojik sürece katılır (Pastarekova vd., 2004). CA enzimlerinin aşırı aktivite göstermesi, glokom, ateroskleroz, tümör oluşumu, obezite ve diğer bazı insan hastalıklarına neden olur (Supuran ve Scozzafava, 2007). CA enziminin aktivitesindeki eksiklik ise öğrenme ve hafıza kaybına yol açar ve Alzheimer hastalığına neden olur (Alterio vd., 2012). Bu nedenle, ilaç

tasarımında CA' ların aktivasyonu ve inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır (McKenna ve Supuran, 2014).

1.2.6. CA İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri (CAI), son yıllarda oldukça dinamik bir araştırma konusudur. Bu enzim, hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının birçoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. CA aktivitesine müdahale eden ilaçlar, çoğu sülfonamid sınıfına ait olmakla birlikte yaklaşık 60 yıldır klinikte kullanılmaktadır (Supuran, 2008b; Alterio vd., 2012; Carta vd., 2012; Fabrizi vd., 2012; Supuran, 2012). Mann ve Keilin tarafından sülfanilamid ile CA inhibisyonunun keşfi birçok bilimsel çalışmaların yapılmasına imkan sağlamıştır (Mann ve Keilin, 1940). Benzotiadiaz gibi antihipertansif ilaçlar gibi önemli ilaçlar sülfanilamid keşfedildikten sonra hazırlanmıştır (Maren, 1967). Sülfonamidler ve bunların izosterleri (sülfamatlar/sülfamidler), enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna bağlanan CAI' lerinin ana sınıfını oluşturmaktadır ve klinikte uzun zamandır diüretik, anti-glokom, anti-epileptik, anti-obezite ve anti-kanser ajanları olarak kullanılmaktadır (Supuran, 2008b; Alterio vd., 2012; Supuran, 2011; Supuran, 2012). 100'den fazla sülfonamidin kinetik, fizyolojik ve farmakolojik özellikleri araştırılmıştır. Bunları takiben, birçok aromatik sülfonamidler sentezlenerek, CA üzerine inhibisyon etkisine bakılmıştır. Aromatik sülfonamidler arasında, benzen sülfonamidler en iyi CA inhibisyon etkisi göstermiştir (Supuran vd., 2004). Yıllar içinde pek çok farklı sülfonamidin CA inhibitörü olarak davranış gösterdiği bildirilmiştir. En çok araştırılan bileşiklerden biri fenoldür (Göksu vd., 2014). Son yıllarda ilaç piyasasında birçok sülfonamid ilaç grubu geliştirilmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2000). Başlangıçta, Lindskog'un grubu (Simonsson vd., 1982) fenollerin insan CAII üzerine inhibisyon etkisi gösterdiğini rapor etmiştir ve fenolik türevlerin CA aktif bölgesine bağlanma mekanizmaları üzerinde fazladan yapısal tanımlamalar elde edilmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2002). Melatonin (Beydemir ve Gülçin, 2004), morfin (Çoban vd., 2007), vitamin E (ArasHisar vd., 2004), kafeik asit fenetil ester (Göçer ve Gülçin, 2013), bir dizi antioksidan fenoller (Şentürk vd., 2009), bir dizi fenolik asitler (Öztürk-Sarıkaya vd., 2010), bir dizi doğal ürün polifenoller ve fenolik asitler (Innocenti vd., 2010a, b), doğal fenolik bileşiklerin iki farklı dizisi (Şentürk vd., 2011; Öztürk-Sarıkaya vd., 2011; Gülçin ve Beydemir, 2013), antioksidan polifenol doğal ürünler (Innocenti vd.,

2010b), (3,4-dihidroksifenil) (2,3,4-trihidroksifenil) metanon ve türevleri (Nar vd., 2013), doğal ve sentetik bromofenoller (Akbaba vd., 2013a; Balaydın vd. 2012a, b), yeni fenolik sülfonamidler (Akıncıoğlu vd., 2013a), aminoindanlar ve aminotetralinlerin yeni sülfonamid türevleri (Akbaba vd., 2013b), yeni fenolik benzilamin türevleri (Çetinkaya vd., 2013), dopamin ile ilişkili bileşiklerin sülfonamid analogları (Aksu vd., 2013), yeni benzotroponlar (Güney vd., 2014) ve tetralin iskeletini içeren yeni sülfonamidler (Akıncıoğlu vd., 2013b) gibi birçok fenolik bileşiklerin CA inhibisyon etkileri bildirilmiştir. Bu kapsamlı çalışmalar CA enzim inhibitörlerinin önemini göstermektedir.

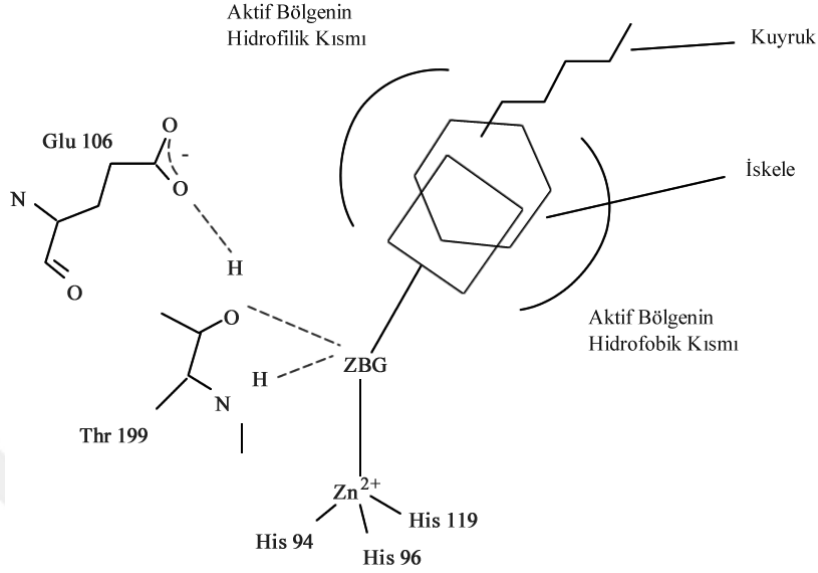
CA inhibitörlerinin kapsamlı olarak araştırılmasına ve klinikte çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılmasına rağmen, CA aktivatörleri (CAA) ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bununla birlikte, son on yılda, elektronik spektroskopi, X-ışını kristalografisi ve kinetik ölçümler vasıtasıyla, aktivatörlerin, katalitik döngünün proton transfer basamağını kolaylaştırmak için, CA aktif boşluğu içinde, inhibitör veya substrat bağlanma alanlarınınkinden farklı bir yerde bağlandığı gösterilmiştir (Briganti vd., 1997; Temperini vd., 2006a; Supuran, 2008b; (Alterio vd., 2012). Son zamanlarda, α -CA ailesinin bazı üyelerinin (insan CA I ve CA II) aktivasyonunun, Alzheimer hastalığında kavramsal olarak yeni bir tedaviyi temsil edebilecek sinaptik etkinliğin artırılması için olası bir terapötik yaklaşım oluşturduğu gösterilmiştir (Sun ve Alkon; 2001; 2002). Biyojenik aminler (histamin, serotonin, katekolaminler), amino asitler, oligopeptidler veya küçük proteinler gibi fizyolojik açıdan ilgili birçok bileşik, insan CA izoenzimlerinin birçoğu için etkin CA aktivatörleridir. (Briganti vd., 1997; Temperini vd., 2006a, 2006b; Supuran ve Scozzafava, 1999; Scozzafava ve Supuran, 2002a, 2002b; Parkkila vd., 2006)

1.2.7. CA'ların İnhibisyon Mekanizmaları

Karbonik anhidraz enziminin inhibisyonu antiglokom, antikonvülsan, antikanser ve antienfektif ajanlar alanında farmakolojik uygulamalara sahiptir. Son on yılda, yeni sınıf CA inhibitörlerinin (CAI) enzim inhibisyon mekanizmalarının, sülfonamid veya anyon tipi klasik inhibitörlerinden önemli ölçüde farklılık gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Beş farklı CA inhibisyon mekanizması bilinmektedir:

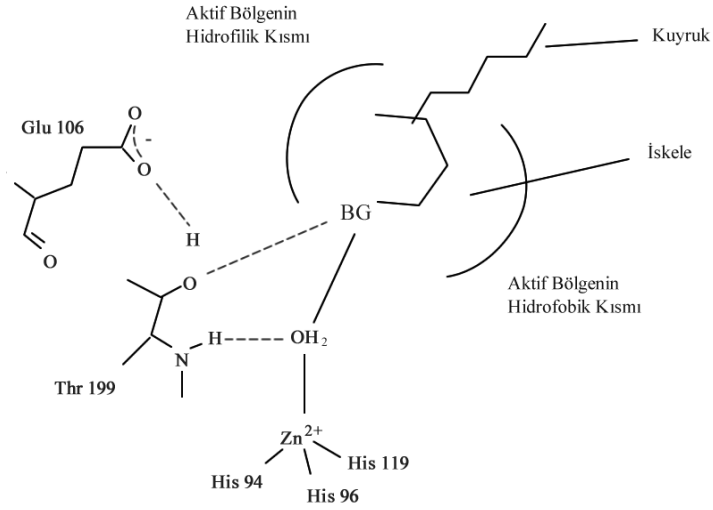
Çinko bağlayıcılar: Enzimin aktif bölgesinde bulunan katalitik olarak önemli olan Zn^{2+} iyonuna bağlı H_2O/OH^- iyonuyla yer değiştirerek doğrudan Zn^{2+} iyonuna bağlanarak tetrahedral bir geometri oluştururlar (Şekil 2). Sülfonamidler ve izosterler, çoğu anyon,

ditiyokarbamat ve izosteri, karboksilat ve hidrosamatlar bu şekilde bağlanır (Pacchiano vd., 2010; Biswas vd., 2011; Carta vd., 2011; Alterio vd., 2012).



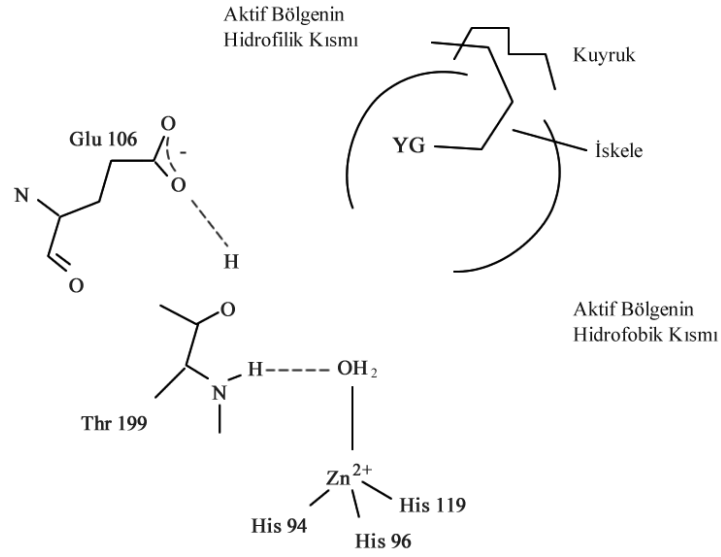
Şekil 2. Çinko bağlayıcılar

Çinko iyonuna bağlanan su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan inhibitörler: Bu yeni CA inhibisyon mekanizmasına sahip ilk bileşik, fenol 'dür (Nair vd., 1994). Zn^{+2} iyonuna bağlı H_2O/OH^- iyonuna doğrudan bağlanırlar (Şekil 3). Çinko bağlayıcılar ile çinko iyonuna bağlanan H_2O/OH^- iyonuna bağlanan inhibitörler arasındaki ana fark, inhibitörün metal iyonuyla doğrudan temas etmemesidir. Son yıllarda çeşitli araştırma grupları tarafından da rapor edildiği gibi, bu inhibisyon mekanizmasına sahip bileşikler fenoller, karboksilatlar, poliaminler, 2-tiyokumarinler, sülfokumarinlerdir. Birçoğunun α -ve β -sınıfına ait CA' lara karşı etkili etkin inhibitör aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. (Innocenti vd., 2008; Şentürk vd., 2009; Carta vd., 2010; Davis vd., 2010; Martin ve Cohen, 2012; Tars vd., 2013).



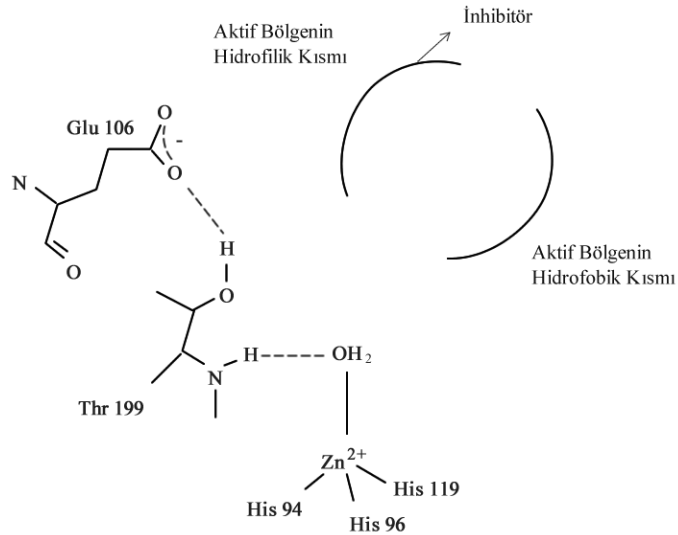
Şekil 3. Çinko iyonuna bağlanan su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan inhibitörler

Aktif bölge kavitesinin girişini kapatan inhibitörler: Bu bağlanma yeri CA aktivatörlerinin bağlandığı yer ile çakışmaktadır. İnhibitör 3 His ve 1 H₂O molekülüyle koordinasyon yapan Zn²⁺ iyonu ile etkileşmez (Şekil 4). Bu inhibisyon mekanizmasına sahip bileşikler, aromatik, heterosiklik veya alifatik olabilen bir iskele üzerine bağlanmış, yapışkan bir gruba (YG) sahiptir. Ayrıca, bu bileşikler aktif bölge kavitesinin oldukça dış bölgesinde bağlandığı için, aktif bölgeden uzayabilen bir kuyruk da içerebilirler. Bu inhibisyon mekanizması kumarinler için ilk defa tanımlanmıştır (Maresca vd., 2009; 2010) ancak daha sonra kumarin ile yapısal benzerlik gösteren antiepileptik ilaç lacosamide (Temperini vd., 2010), substitute kumarinler (Maresca vd., 2010; Touisni vd., 2011; Bonneau vd., 2013; Sharma vd., 2014), 5- ve 6- üyeli laktonlar ve tiyolaktonlar (Carta vd., 2012) gibi birçok bileşiğin önemli CA inhibe edici özelliklere sahip oldukları ve ortak bir etki mekanizmasını paylaştığı gözlenmiştir.



Şekil 4. Aktif bölge kavitesinin girişini kapatan inhibitörler

Aktif bölge kavitesinin dışına bağlanan inhibitörler: Bu CA inhibisyon mekanizması çok yakın zamanda keşfedilmiştir. Bir karboksilik asit türevi, CA'yı bu şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir. 2- (benzilsülfonil) -benzoik asit, enzimin dış konformasyonunda katalitik döngünün hız belirleyici basamağına müdahale ederek çinko ile koordine su molekülünden bir protonun çevreye transferini bloke etmiştir (Şekil 5) (D'Ambrosio vd., 2015).



Şekil 5. Aktif bölge kavitesinin dışına bağlanan inhibitörler

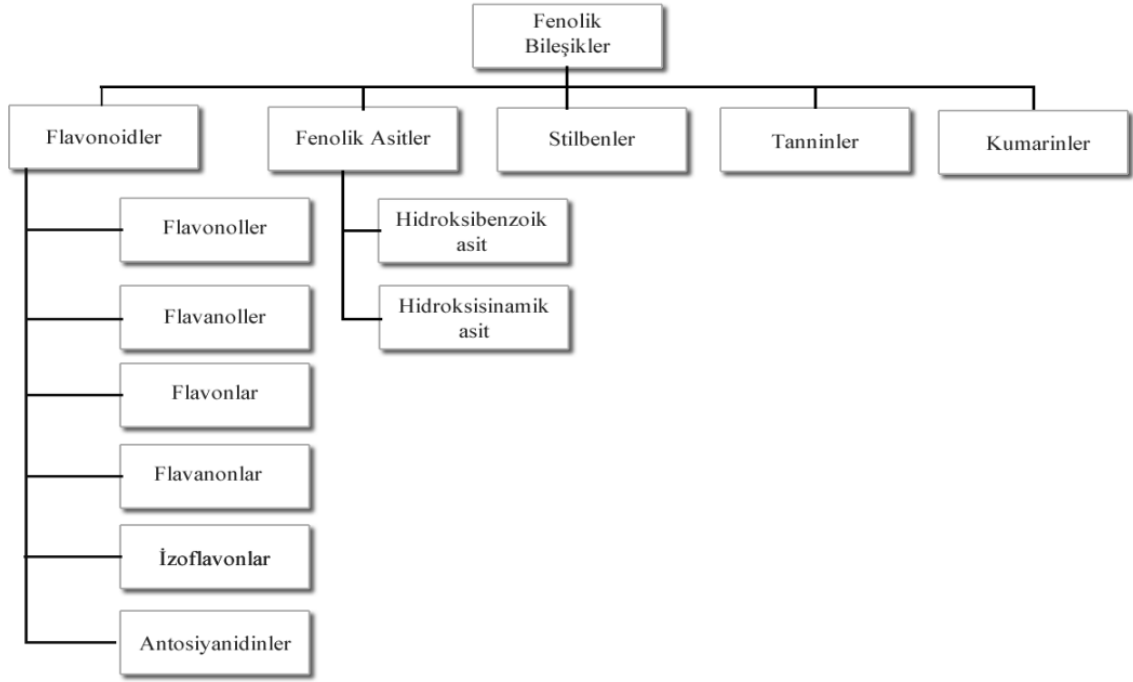
İnhibisyon mekanizmasının bilinmediği bileşikler: Şu ana kadar tartışılan bileşiklerin dört inhibisyon mekanizması, kinetik ve daha da önemlisi, X-ışını kristalografik çalışmaları ile iyice belgelenmiş oldukları için anlaşılmıştır. Bununla birlikte, çeşitli seviyelerde CA inhibitör özelliği gösteren fakat henüz kristalize edilmediği için kesin etki mekanizmasının bilinmediği diğer sınıf bileşiklerde vardır. Bu durum çoğu zaman, bu türevlerin çözünürlük problemlerinden kaynaklıdır. İkincil/üçüncül sülfonamidlerin yanı sıra (Alp vd., 2012; Scozzafava vd., 2013; Capasso ve Supuran, 2014), fullerenler (Innocenti vd., 2010) ve protein tirozin kinaz inhibitörleri ve klinik olarak kullanılan ilaçlar imatinib ve nilotinib (Parkkila vd., 2009) en çok araştırılan örneklerdir.

Yukarıda bahsedilen CA inhibisyon mekanizmalarından, birinci inhibisyon mekanizmasından sonuncuya doğru gelindiğinde, inhibitörle olan etkileşiminde Zn^{+2} iyonunun rolü giderek azalmaktadır. Bu durum CA inhibitörleriyle ilaç tasarımında önemli sonuçlar ortaya koymaktadır. Çünkü aktif bölge kavitesinin dip kısmı, şimdiye kadar memelilerde tanımlanmış 16 CA izoenzimlerinde çok fazla korunmuştur. Oysaki, amino asit diziliminde en fazla çeşitliliğe ve bunun sonucu olarak en üst düzeyde yapısal çeşitliliğe sahip olan bölge, yalnızca aktif bölgenin girişindeki bölgedir. Aslında bu durumun, fenoller ve aynı zamanda kumarinler ve Zn^{+2} iyonuyla etkileşmeyen inhibitörlerin klasik sülfonamid / sülfamat inhibitörleri ile çok zor erişilebilir bir hedef olan izoenzim seçici CA inhibitörlerinin ortaya çıkmasına yol açtığı görülmüştür (Supuran, 2016).

1.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, fonksiyonel türevleri de dahil olmak üzere bir ya da daha fazla hidroksil grubunun aromatik halkaya bağlı olduğu yapılardır (Robards ve Antolovich, 1997; Balasundram vd., 2006). En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılır. Birden fazla hidroksil grubu içeren fenolik bileşikler ise polifenoller olarak bilinir (Bravo, 1998)

Farklı doğal ürünlerden fenolik asitleri, flavonoidleri, kumarinleri, tanninleri ve stilbenleri içeren 8000' in üzerinde fenolik bileşik izole edilmiştir. Her bir grup, kimyasal yapısına göre kendi içinde alt gruplara ayrılır (Şekil 6) (Manach vd., 2004, Haminiuk vd., 2012)



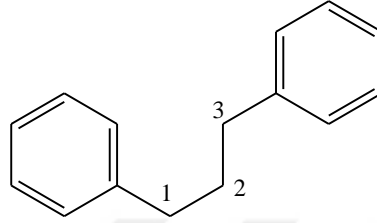
Şekil 6. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Fenolik bileşikler bitkilerde yaygın olarak bulunan gruplardan birisidir.(Naczka ve Shadidi, 2004). Bugüne kadar bitkilerde binlerce fenolik bileşik yapısı tanımlanmıştır ve sürekli olarak yeni tanımlanan fenolikler bunlara eklenmektedir (Robards ve Antolovich, 1997). Günlük hayatta sürekli olarak tüketilen pek çok meyve, sebze, tahıl ürünleri, bitkisel ürünler ve içeceklerde önemli ölçüde bulunurlar. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumuna ve değişimine katılmaları gibi pek çok açıdan önem taşımaktadır (Alasalvar vd., 2001). Fitokimyasalların önemli bir grubunu oluşturan olan fenolik bileşikler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminden sorumlu enzimleri inhibe etme mekanizması ve yüksek seviyede oksitlenmiş ROS' u indirgeme mekanizması sayesinde yüksek antioksidan aktivite ve serbest radikal süpürme kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Robards vd., 1999; Middleton vd., 2000; Kahkonen vd., 2001).

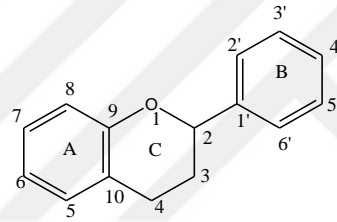
1.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşurlar ve 15 karbon atomu içeren difenilpropan ($C_6-C_3-C_6$) yapısındadırlar. Gıdalarda en yaygın

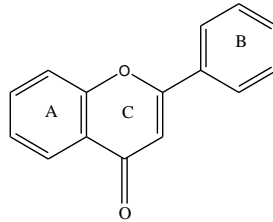
bulunan polifenoller olan flavonoidlerin flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir. Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, heterohalka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarındaki karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. B halkasındaki atomlar ise üssü rakamlar ile numaralandırılır (Harborne ve Williams, 2000).



Şekil 7. Difenilpropan yapısı



Şekil 8. Flavan yapısı



Şekil 9. Flavon yapısı

Flavonoidler yapısal olarak, flavonoller, flavanoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinler olmak üzere 6 gruba ayrılırlar.

Flavonoller: Bu grup bileşikler, gıdalarda yaygın olarak glikozid formunda bulunurlar. Bunların başlıcaları; kaemferol, kuersetin, mirisetin ve izoramnetin'dir (Price vd., 1995).

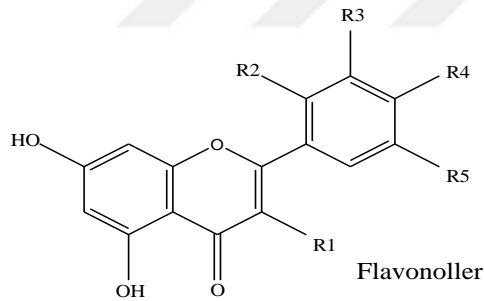
Flavanoller: Bu grupta bulunan kateşinler renksiz bileşiklerdir. Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoidlerdir. Kateşinler C₃ atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılır (Arts vd., 2000; Lakenbrink vd., 2000).

Flavonlar: Flavanollere göre meyve ve sebzelerde daha az bulunurlar. Yiyeceklerde bulunan en belirgin flavonlar luteolin ve apigenindir (King, 1962; Feng vd., 1988; Sartelet vd., 1996).

Flavanonlar: Bu grup bileşikler de doğada genellikle glikozit formda bulunurlar. Turunçgil meyvelerinde çok yaygın olarak bulunurlar. Naringin, hesperidin, naringenin en yaygın olan flavanonlardır (Tomas-Barberan vd., 2000).

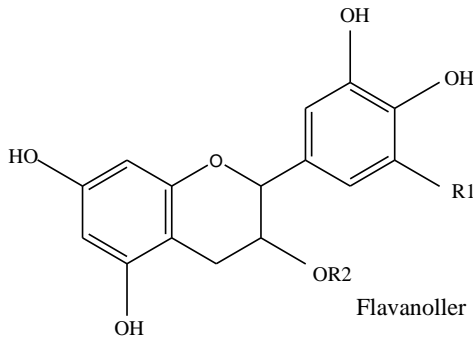
İzoflavonlar: Başta soya fasülyesi olmak üzere çeşitli baklagillerde, bazı meyve ve sebzelerde bulunur. Genistein ve daidzein en yaygın olan izoflavonlardır (Coward vd., 1998).

Antosiyanidinler: En çok böğürtlen, ahududu gibi üzümü meyvelerde bulunurlar ve kırmızı, mavi ve mor meyvelerin ve sebzelerin renginden sorumlu, suda çözünebilir pigmentlerdir (Clifford, 2000; Es-Safi vd., 2002).



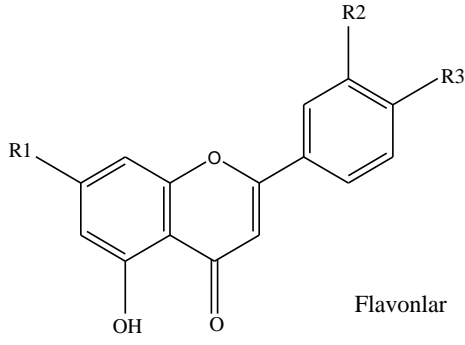
Flavonoler	R1	R2	R	4	R5
Ruti	3- <i>O</i> -Rha-glu	H	OH	OH	H
Kampferol	O	H	H	H	H
Kuersetin	OH	H	OH	OH	H
M ri	OH	OH	H	O	H
İzorhamnetin	O	H	OCH ₃	OH	H
Mirisetin	H	H	OH	H	OH
isetin	OH	H	H	OH	OH

Şekil 10. Flavonoller



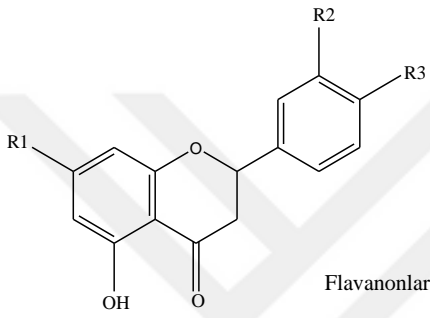
Flavanoller	R1	R2
Kateşin	H	H
Epikateşin	H	H
EGC	OH	H
ECG	H	Gal at
EGCG	OH	Gallat

Şekil 11. Flavanoller



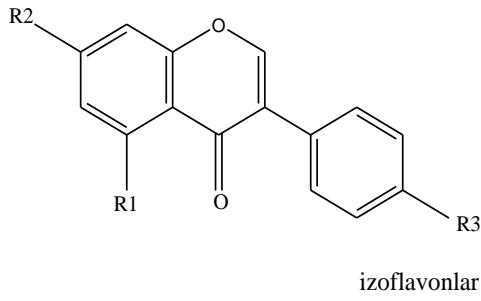
Şekil 12. Flavonlar

F avonlar	R1	R2	3
Apigenin	OH	H	OH
Luteo in	OH	OH	O
Krisin	OH	H	H
Asasetin	OH	H	OCH ₃



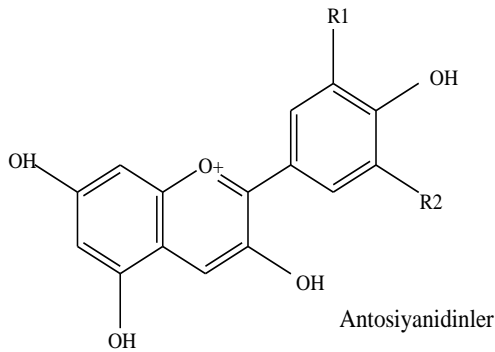
Şekil 13. Flavanonlar

Flavanonlar	1	R2	3
He peretin	OH	O	OCH ₃
Hesp ridin	7-O-Rha-glu	OH	OCH ₃
Narin nin	OH	H	OH
Naringin	7-O-Rha-glu	H	OH
Eri sitrin	7-O-Rha-glu	OH	OH
Eriodiktiol	OH	OH	OH



Şekil 14. İzoflavonlar

İzoflavonlar	R1	R2	R3
Genist in	OH	OH	OH
G nist n	OH	7-O-Glu	OCH ₃
Daidzein	H	OH	O
Daidzin	H	7-O Glu	OH
Formononetin	H	H	OCH ₃
Ononin	H	7-O-Glu	OCH ₃
Sissotrin	OH	7-O-Glu	OCH ₃

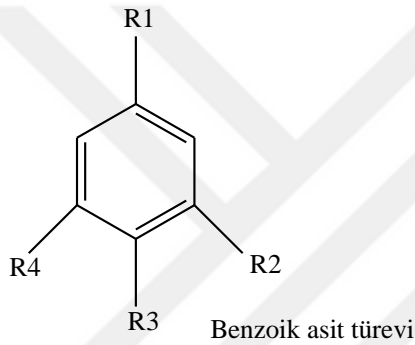


Şekil 15. Antosiyandinler

Anto iyanidinler	R1	R2
Delphinidin	OH	O
Mal idin	OCH ₃	OCH ₃
Si anidin	OH	H
Pelargonidin	H	H

1.3.2. Fenolik Asitler

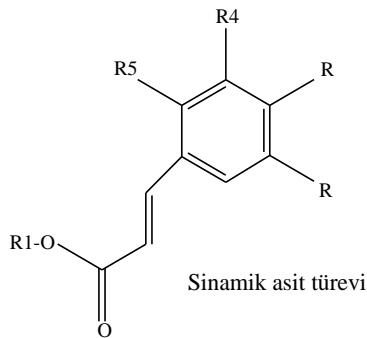
Fenolik asitler benzoik asit ve sinamik asitlerin hidroksile olmuş türevleridir. Hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak gruplandırılmaktadırlar (Spacil vd., 2008). Hidroksibenzoik asitler, C₆-C₁ fenilmetan yapısına sahip olup yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlilik gösterirler. Renksiz bileşikler olan benzoik asit türevleri bitkisel gıdalarda genellikle iz miktarlarda bulunurlar. En yaygın olanları *p*-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, vanilik asit, siringik asit ve gallik asittir (Bravo, 1998; Tomas-Barberan ve Clifford, 2000; Annie ve Jean-Jacques, 2003).



Benzoik asit türevi	1	R2	R3	4
Benzoik asit	COOH	H	H	H
Gallik asit	COOH	OH	OH	OH
Protokatekuik asit	OOH	OH	OH	H
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	COOH	H	OH	H
Vanilik asit	COOH	OCH ₃	OH	H
Siringik asit	COOH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Şekil 16. Benzoik asit türevi

C₆-C₃ fenilpropan yapısına sahip olan hidroksisinamik asitler OH grubunun konumu ve yapısına göre farklılık gösterirler. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunurlar. En yaygın olanları, klorojenik asit, kafeik asit, *o*-kumarik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit ve sinamik asittir (Sosulski vd., 1982).

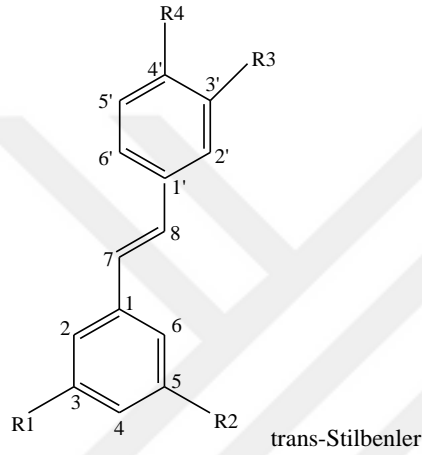


Sinamik asit türevi	R1	R2	R3	R4	R5
Klorojenik asit		H	OH	H	H
Kafeik asit	H	H	OH	O	H
<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	H	OH	H
Ferulik asit	H	H	OCH ₃	OH	H
<i>o</i> -Kumarik asit	H	OH	H	H	H
Sinapik asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Sinamik asit	H	H	H	H	H

Şekil 17. Sinamik asit türevi

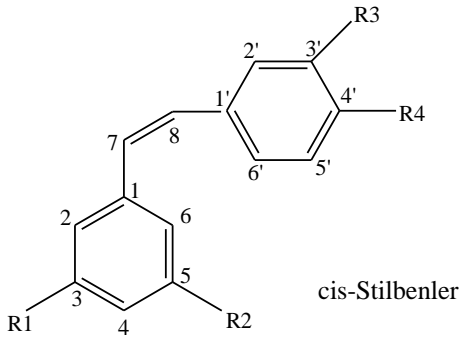
1.3.3. Stilbenler

Bitkiler, hastalık durumunda direncini artırmak için stilbenleri sentezlerler (Goyal vd., 2012). Stilbenler daha çok yer fıstığı, çam ağaçları ve üzüm asması tarafından sentezlenirler (Bavaresco, 2003). İskeletleri 1,2-difeniletilen yapısına dayanır. Resveratrol ve piseid üzüm asmasından üretilen başlıca iki stilbendir. trans-resveratrol insan sağlığı üzerine etkisiyle üzerinde en fazla çalışılan bileşiktir (Delmas vd., 2006).



trans-Stilbenler	R1	R2	R3	R4
trans-resveratro	OH	OH	H	OH
trans-piseid	GlcO	OH	H	O
tra-ast ingin	GlcO	OH	OH	H

Şekil 18. trans-Stilbenler

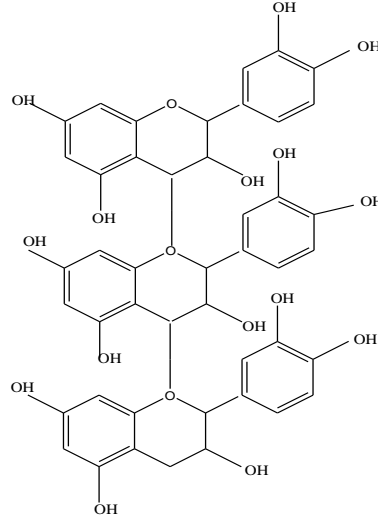


cis-Stilbenler	R1	R2	R	R4
cis-resveratrol	OH	OH	H	OH
cis-piseid	GlcO	OH	H	OH

Şekil 19. cis-Stilbenler

1.3.4. Tanninler

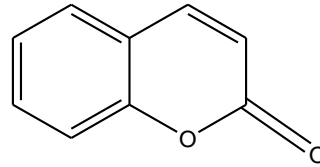
Fenolik polimerler olarak bilinmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Besin tanninleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmaktadır (Ignat vd., 2011).



Şekil 20. Tanninler

1.3.5. Kumarinler

Benzopironlar olarak da bilinen kumarinler, mantarlarda, bakterilerde ve bitkilerde, özellikle de farklı botanik ailelerden gelen yenilebilir bitkilerde bulunan, sinamik asit türevi fenolik bileşiklerin büyük bir sınıfını oluştururlar. Kök, tohum, sap, çiçek ve meyve gibi bitkilerin farklı bölümlerinde yaygın olarak bulunurlar (Lake, 1999). Kumarinlerin anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, anti-tümör, antidepresan gibi geniş bir alanda biyolojik aktiviteye sahip oldukları kanıtlanmıştır (Klenkar ve Molnar, 2015).



Şekil 21. Kumarinin kimyasal yapısı

1.4. Kromatografi

1903 yılında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerinin ayrımında kromatografinin ilk uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kalsiyum karbonat ile doldurduğu bir cam boruda bitki pigmentlerinin kolon içinde ayrılırken renkli

bantlar oluşturduğunu görmüştür. Bu yöntem yunanca renk anlamına gelen “chroma” ve kaydetme anlamına gelen “graphien” kelimelerini birleştirip “chromatography” adını vermiştir (Ettre, 2003).

Kromatografi, karışımda bulunan farklı türde moleküllerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştirerek, kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı ayırma ve saflaştırma tekniğidir (Kupiec, 2004). Kromatografik metotlar, numune içerisindeki maddelerin sabit ve mobil faz (hareketli faz) ile etkileşimleri sonucu ayrılmaları esasına dayanır. Sabit faz bir kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı olabilir. Mobil faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Mobil faz basınçla kolondaki sabit faz üzerinden geçirilir. Mobil fazın içerisindeki bileşenler, sabit fazdaki dolgu materyaliyle etkileşmeleri sonucu kolonda bir miktar tutulurlar. Sabit faz üzerinde farklı kuvvetlerde tutulmaları, karışımdaki bileşenlerin farklı kimyasal özelliklerinden kaynaklanır. Bileşenler kolondan farklı zamanlarda ayrılırlar (Skoog vd., 1998; Kupiec, 2004).

Farklı özellikte kromatografik uygulamalar mevcut olduğu için kromatografik yöntemleri tek bir ölçüte göre sınıflandırmak zordur. Kromatografik yöntemler sabit fazın tutturulduğu yüzeyin şekline göre kolon ve düzlemsel olarak ikiye ayrılır.

Kromatografi, mobil fazın özelliğine göre;

- Gaz kromatografisi (GC),
- Sıvı kromatografisi (LC),
- Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC),

olmak üzere 3 sınıfa ayrılır. Gaz kromatografisi, karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaşabilen bileşenleri ayırmada kullanılır. Sıvı kromatografisinde mobil faz sıvıdır. Süperkritik akışkan kromatografisi, kritik sıcaklığının üzerindeki sıcaklığa kadar ısıtılıp, basınç ile sıvılaştırılan gazlar ile gerçekleştirilir (Skoog vd., 1998).

Kromatografik yöntemler ayırma mekanizmalarına göre;

- Adsorpsiyon kromatografisi,
- Dağılma kromatografisi,
- İyon değiştirme kromatografisi,
- Jel filtrasyon kromatografisi olmak üzere 4 sınıfa ayrılır (Kupiec, 2004).

Adsorpsiyon kromatografisi; gaz, sıvı veya çözünmüş maddenin, sabit faz olarak bir adsorban yüzeyinde tutulması olayıdır. Silika jel ve alümina gibi adsorban maddeler sabit fazı oluşturur. Ayırım, bileşiklerin adsorban yüzeyinde farklı derecede adsorbe olmaları

esasına dayanır. Adsorblanan maddelerin sabit fazdaki hareketleri adsorblanma derecesiyle ters orantılıdır. Bir maddenin molekülündeki fonksiyonel grupların türüne ve sayısına bağlı olarak sabit fazda tutunma gücü ve buna bağlı olarakta alıkonma zamanları belirlenir (Kupiec, 2004; Trathnigg vd., 2004).

Dağılma kromatografisinde; sabit faz sıvıdır ve gözenekli, yüzey alanı geniş bir katı destek maddesine emdirilmiştir. Hareketli faz ise sıvı veya gazdır. Ayrılacak bileşiklerin sabit ve mobil fazda çözünürlükleri farklıdır. Bileşikler çözünürlük farkından dolayı kolonu önce veya sonra terkederler. Çözünürlüğü sabit fazda yüksek olan bileşenler, kolonu daha geç terkederler (Kupiec, 2004; Skoog vd., 2007).

İyon değiştirme kromatografisi; iyonların iyon yüklerine göre yüzeye tutturulmuş başka bir iyonun yerini alması olayıdır. Sabit fazdaki iyonlarla, numunede bulunan aynı yüklü iyonlar yer değiştirir. İnorganik iyonların, proteinlerin, peptitlerin ve aminoasitlerin ayrımı için oldukça uygundur (Kato, 2004; Kupiec, 2004).

Jel filtrasyon kromatografisi; boyut eleme kromatografisi ya da jel geçirgenlik kromatografisi adı verilen bu kromatografide, özellikle yüksek mol kütleli türlere uygulanan bir tekniktir. Kolon dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir. Molekülün büyüklüğü ile matriksteki porlara takılma yüzdeleri ters orantılıdır. Porlara takılanlar kolonda daha uzun süre kalmış olurlar. Dolgu maddesinin ortalama gözenek açıklığından daha büyük olan moleküller dışarıda tutulur ve ilk olarak kolondan bu moleküller elüe edilirler (Skoog vd., 1998; Kupiec, 2004).

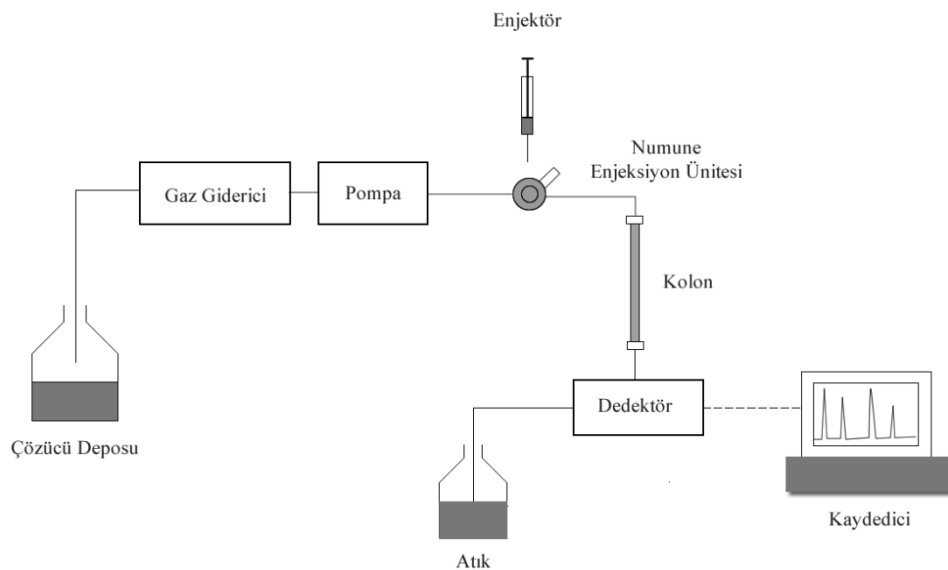
1.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography), moleküllerin tanımlanmasında, karakterizasyonunda ve saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Biyoteknoloji ve farmosötik endüstrisi alanında yapılan çalışmaların araştırma aşamasından, kalite-kontrol ve onaylama aşamasına kadar olan bütün aşamalarında bu kromatografi tekniğinin yaygın olarak kullanılması, bu konudaki bilgi birikiminin her geçen gün artmasına yol açmıştır (Malviya vd., 2010). Günümüzde HPLC; amino asitler, peptidler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler ve lipidler gibi farklı gruptaki moleküllerin analizinde kullanılan başlıca kromatografik tekniktir. Yakın gelecekte bu tekniğin yerini alabilecek çok az sayıda rakip teknoloji bulunmaktadır (Tuncer, 2008).

HPLC tekniğinin en büyük avantajı ise karışımdaki bileşenlerin ayrılması işleminin hızlı olmasıdır. Diğer kromatografik yöntemlerle saatler süren bir ayırma işlemi HPLC ile dakikalara indirgenmiştir. HPLC' nin kromatografik yöntemler arasında en çok kullanılan teknik olmasını sağlayan avantajlar arasında yüksek çözünürlük sağlaması, yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik, yüksek oranda geri kazanım, doğruluk, otomasyon, paslanmaz çelik kolonların uzun süre tekrar tekrar kullanılabilmesi sayılabilir (Tuncer, 2008).

1.5.1. HPLC'nin Temel Prensipleri ve Temel Kavramlar

HPLC' de, uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımındaki bileşenlerin birbirinden ayrılması için, analit yüksek basınç altında hareketli faz ile kromatografik kolondan geçirilir ve kolon içindeki sabit faz ile farklı oranlarda etkileşime girerek ve kolon içinde değişik hızlarda ilerleyerek kolonu farklı zamanlarda terk ederler. Kolondan çıkan bileşenlerin derişimlerine cevap veren bir dedektör kolon çıkışına yerleştirilip dedektör sinyali zamanın bir fonksiyonu veya kullanılan hareketli faz hacminin bir fonksiyonu olarak kaydedildiğinde kromatogramlar elde edilir. Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımda kullanılır. Pik alanları ise her bir bileşenin kantitatif bir ölçüsüdür (Kupiec, 2004). Şekil 22' de HPLC cihazının şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 22. HPLC cihazının şematik gösterimi

Cihaz genel olarak hareketli fazı bulunduran bir çözücü haznesi, hareketli fazda bulunan çözülmüş gazı uzaklaştıracak degasser (gaz giderici), kolondan hareketli fazı sabit akışta geçirecek bir pompa, analitin sisteme gönderildiği enjeksiyon ünitesi, ayırımın gerçekleştiği kolon, kolondan ayrılan bileşiklerin derişimlerine cevap veren bir dedektör ve verileri kaydeden bir bilgisayar sisteminden oluşmaktadır (Kupiec, 2004).

1.5.1.1. Hareketli Faz

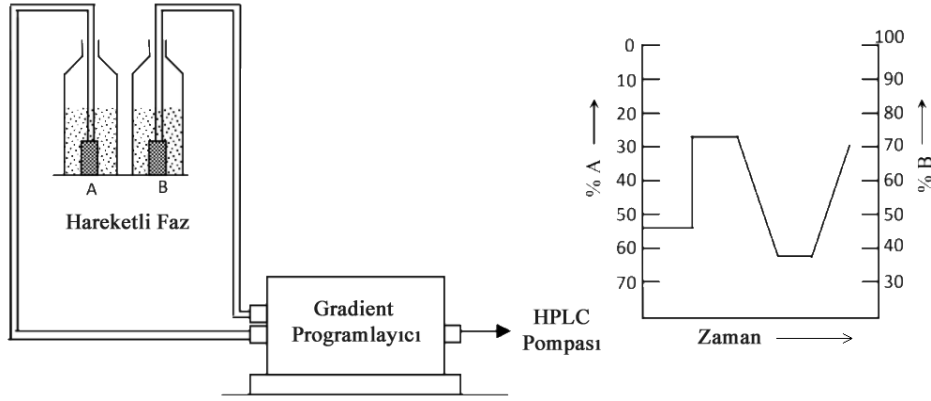
Hareketli faz (eluent) örnekteki bileşenleri kolon (sabit faz) boyunca taşıyan çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarıdır. Hareketli fazın bileşimine göre HPLC' de ayırma izokratik ya da gradient olmak üzere 2 tür elusyonla gerçekleştirilir.

1.5.1.1.1. İzokratik Elusyon

Hareketli fazın bileşimi ve oranı ayırma boyunca değişmez. İzokratik elusyonda tek çözücü kullanılır. Çözücü tek bileşen içereceği gibi çoklu bileşenlerden oluşan homojen bir karışımda olabilir.

1.5.1.1.2. Gradient Elusyon

Daha kısa analiz süresinde daha iyi ayırma sağladığı için hareketli fazın bileşimi, analiz boyunca aşamalı olarak değişir (Şekil 23). Gradient elusyonda, polaritede farklılık gösteren iki veya daha fazla çözücü sistemi kullanılır (Kenkel, 1994).



Şekil 23. Gradient programlama sisteminin şematik gösterimi

1.5.1.2. Gaz Giderici (Degasser)

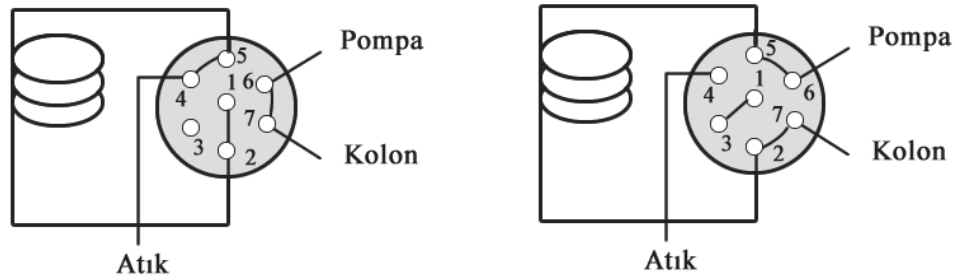
Çözücü sisteminde herhangi bir hava kabarcığının olması ciddi ve kabul edilemez bir gürültüye ve akış hızında azalma gibi analiz üzerinde bozucu etkiye neden olur. Bu yüzden çözülmüş gazlar helyum ya da azot gazıyla ya da ultrasonik banyoda uzaklaştırılmalıdır. Helyum gazının kullanımı külfetlidir. Bu nedenle, olası hava kabarcıklarının ve oksijen, azot gibi çözülmüş gazların giderilmesi için cihaza degasser (gaz giderici) ünitesi eklenir (Skoog vd., 1998).

1.5.1.3. Pompa

Çok küçük partiküllerden oluşan kolon dolgu materyalinin kolon içerisine doldurulması işlemi ve analitin bu sabit faz ile etkileşmesi için hareketli fazı akış için zorlayan yüksek basınçlı pompalardır. HPLC kolonlarından iyi verim almak, dolgu maddesi olarak küçük partiküllerin kullanılmasını ve bu yüzden de yüksek basınç pompalarının kullanılmasını gerektirir. Modern pompaların 0,01-10 mL/dk arasında akış hızı, %1' den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı, 5000 psi' ye kadar çıkabilen maksimum basınç değeri ve çok sayıda çözücünün korozyon etkisine karşı dayanıklılık gibi özelliklere sahip olması beklenir. Ayrıca pompadan gelen akış vuruşuz olmalıdır. Diyafram ve piston tipi pompalarda tamamen vuruşuz akış hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle pompa, böyle vuruları azaltacak şekilde tasarlanmalıdır (Skoog vd., 1998; Cazes, 2005).

1.5.1.4. Enjeksiyon Ünitesi

Enjeksiyon ünitesi 1 μ L-500 μ L aralıktaki hacimlere olanak vermelidir. Analitin HPLC sistemine verilmesi manuel ya da otomatik enjektörlerle yapılır. Enjeksiyonu yapılan analit yüksek basınçta hareket eden hareketli faza karışır ve kolona çözünmüş olarak taşınır. Enjeksiyon boyunca basınç sabit tutulmalıdır. En çok kullanılan enjeksiyon sistemi Şekil 24’ de gösterilmektedir. Enjeksiyon ünitesi örnek lupuna (halkasına) bağlı altı yollu bir valftan oluşur. Enjeksiyon ünitesi yükleme pozisyonuna getirilir ve analit bir şırıngayla lupun içine enjekte edilir. Bu işlem yapılırken hareketli fazın pompadan kolona akışı devam etmektedir. Valfin enjeksiyon pozisyonuna çevrilmesiyle hareketli faz akışı analit lupunun içinden geçerek analiti kolona taşır (Skoog vd., 1998).



Şekil 24. Lupa örnek yüklenmesi ve mobil faz akışıyla pompadan kolona gönderilmesi

1.5.1.5. Kolon

Hareketli faz içerisinde gelen analite ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları kolon olarak adlandırılmış sabit fazlar mevcuttur. Kolonlar paslanmaz çelik, teflon, cam veya PEEK malzemeden üretilmektedir. Kolonun ayırım gücü, sabit fazda kullanılan maddenin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Bu tür kaplama malzemeleri çok çeşitli olup, hareketli fazın, analitin ve uygulanacak HPLC metodunun özelliklerine göre seçilmelidir. Kolon dolgu materyalleri genellikle silika ve alümina esaslıdır. Kolonların iç çapı 2-5 mm aralığındadır, kolon boyları ise genellikle 10, 15, 25 cm uzunluğundadır. HPLC analizinde seçilen kolonun akış hızı ve dolayısıyla oluşacak basınca dayanıklı olmasına dikkat edilmelidir. Sabit fazın polaritesine göre iki çeşit kolon vardır: ters faz kolon, normal faz kolon (Kafalı, 2008).

1.5.1.5.1. Ters Faz Kolon

Sabit faz apolar, hareketli faz polardır. En çok kullanılan ters faz dolgu maddeleri, silika yüzeyine bağlanmış C_{18} (n-oktadesil) ve C_8 (n-oktil) gibi alkil gruplarıdır. Polar çözücü olarak en çok su, metanol, asetonitril ve sulu tampon çözeltiler kullanılır. Analit bileşenlerinin alıkonma zamanlarını sabit fazın hidrokarbon zincirleri ve analitin hidrokarbon zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşim belirler. Analitin polaritesi arttıkça kolondan elue olması önce gerçekleşir (Akyüz, 2011).

1.5.1.5.2. Normal Faz Kolon

Sabit faz polar, hareketli faz apolardır. Normal faz dolgu maddeleri silika yüzeyin, siyano, amino, diol, dimetilamino gibi polar fonksiyonel gruplarla kimyasal modifikasyonu ile elde edilir. Hareketli faz olarak genellikle dietiler, diklorometan, kloroform, hegzan gibi organik çözücü karışımları kullanılır. Daha az polar bileşikler kolondan ilk önce elue olurken, daha polar bileşikler kolonu daha geç terkederler (Akyüz, 2011).

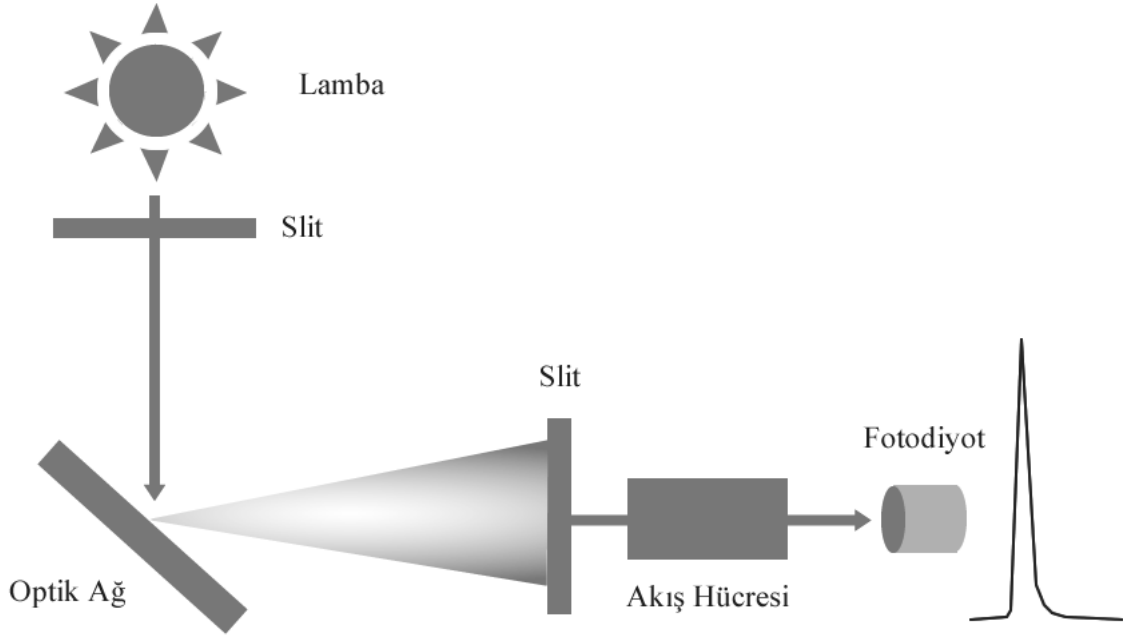
1.5.1.6. Dedektör

HPLC’de kolonda birbirinden ayrılan maddelerin derişimi, kolon çıkışında bulunan bir dedektör yardımıyla ölçülür ve alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlar. İyi bir dedektör düşük gürültü seviyesine sahip olmalı, ayrılan bileşenlerin küçük miktarları gözlemlenebilmelidir. Analizi yapılacak analitin cinsine uygun olmasının yanında, sıcaklık ve basınçtaki değişimlere de duyarlı olmalıdır. HPLC’ de iki dedektör tipine rastlamak mümkündür. Genel dedektörler, hareketli faz ve analit çözeltilerinin özelliklerindeki değişimi ölçer. Kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri örnek olarak verilebilir. UV, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletken dedektörleri gibi seçici dedektörler ise yalnız analit çözeltileri için duyarlı ve seçicilik gösterir.

HPLC’de bugüne kadar çok sayıda farklı ölçüm ilkelerine dayanan dedektörler geliştirilmiştir (Tarantilis vd., 1995; Kafalı, 2008).

1.5.1.6.1. UV-Görünür Bölge Dedektörü (UV/VIS)

Bu dedektörle ışığı absorplayabilen bileşenlerin tayini mümkündür. Dalga boyu her bir bileşene göre ayarlanabilir (Şekil 25). Farklı dalga boyunda çalışmak ve spektrum taraması yapmak mümkündür. Çoğu organik moleküller ve fonksiyonel gruplar 190-800 nm aralığında ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Dedektör sisteminde çözücü seçimi çok önemlidir. Bu dedektör sisteminde seçilen çözücülerin UV ışınlarını absorpladığı dalga boyları, seçilen çalışma dalga boyu değerinden düşük olmalıdır (Swartz, 2010).

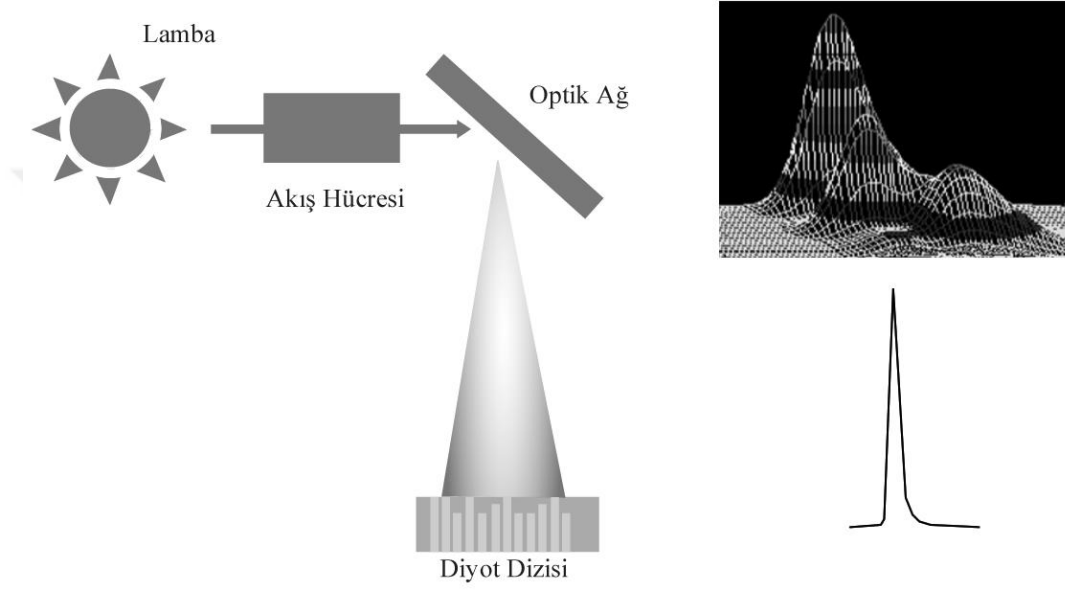


Şekil 25. Değişken dalga boylu UV dedektörünün şematik gösterimi (Swartz, 2010).

1.5.1.6.2. Diyot Serili Dedektör (PDA)

Ölçümlerin çok hızlı yapılması gerektiği analizlerde bu dedektör kullanılır. UV-Görünür bölge dedektörü gibi bu dedektörde spektrofotometrik ölçüm temeli ile çalışır. Fotodiyot dizisinin uygulandığı spektrofotometrik dedektörlerde monokromatör, ışık kaynağı ile örnek arasında değil, örnek ile dedektör arasına yerleştirilir (Şekil 26). Bu tür bir optik yerleştirmede ışık kaynağından gelen ışınların tümü birden örneğe gönderilerek duyarlılık artırılmış olur. Bu dedektörün UV-görünür bölge dedektöründen farkı 512

elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorpsiyonu eş zamanlı olarak ölçülebilir. Bu özelliği, kromatogramda yer alan tüm piklerin istenilen dalga boyu aralığındaki spektrumlarını da gösteren üç boyutlu kromatogramlara sahip olmasından ötürü numunedeki pik teşhislerinin daha güvenilir bir şekilde yapılmasına olanak sağlar. Bu dedektörün sağladığı diğer önemli avantaj istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesidir (Swartz, 2010).



Şekil 26. Diyet serili dedektörün şematik gösterimi (Swartz, 2010).

1.5.1.6.3. Floresans Dedektör

Floresans özellik gösteren bileşiklerin analizinde spektrofotometrik dedektörlere oranla duyarlılığı daha fazla olan floresans dedektörler kullanılır. UV dedektörlerle karşılaştırıldığında 1000 kat daha yüksek hassasiyete sahiptir. Bir floresans dedektörü, civa buhar lambası veya ksenon yüksek basınç lambası, uyarma ve emisyon monokromatörü, kare akış hücresi ve yayılan ışığı güçlendirmek için bir fotoçoğaltıcıdan oluşur (Swartz, 2010).

1.5.1.6.4. İletkenlik Dedektörü

Bu dedektörler kolondan çıkan iyonik haldeki bileşenlerin ölçümünde kullanılır. Organik bileşikler için uygulanabilirliği düşüktür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Hareketli fazın iletkenliğinin düşük olması istenir. Bu sayede oluşan gürültüde o denli düşük olur (Swartz, 2010).

1.5.1.6.5. Kırılma İndisi Dedektörü (RID)

Kırılma indisi dedektörleri, saf eluent ile örnek bileşenini içeren eluent arasındaki kırılma indisi farkını ölçer. Bu dedektörler hemen hemen bütün maddelere cevap verirler, fakat diğer detektörlerle kıyaslandığında hassasiyeti düşüktür. Sıcaklık değişiminden büyük ölçüde etkilenirler, bu yüzden sabit sıcaklık sağlanmalıdır. Hareketli faz içindeki değişimlere duyarlı olduğundan, gradient elusyon için uygun değildir. Şeker, trigliserit, organik asit, farmasötik katkı maddeleri için kullanılır (Swartz, 2010).

1.5.1.6.6. Elektrokimyasal Dedektör

En hassas detektörlerden birisidir. Elektroliz sonucu akım ölçülmesi ilkesine dayanır. Ölçülen akım örnek maddenin elektrolizi nedeniyle olduğundan kullanılan çözücü elektrik akımını iletmemelidir. Bu dedektörler indirgenebilen ve yükseltgenen maddelere cevap verir. Diğer dedektörler kadar yaygın kullanılmasa da, elektrokimyasal dedektörler yüksek hassasiyete sahiptir. Gradient elusyon için uyumlu değildir (Swartz, 2010).

1.5.1.6.7. Kütle Spektrometri Dedektörü (MS)

Bu dedektörler kalitatif ve kantitatif ayırmada sıklıkla kullanılmaktadır. Sıvı halde ve uçucu olmayan karışımları önce LC sistemden geçirip bileşenlerine ayrıldıktan sonra ve ayrılan bileşenin iyon haline getirdikten sonra kütle/yük (m/z) oranları öncülüğünde ayırım sonucuna erişilebilir. Bu sistemlerde öncelikle ayırımın gerçekleştiği LC kısmından gelen hareketli faz uzaklaştırılır. Sürekli dairesel şekilde dönen ve ısıtılan yüzeye püskürtülerek

vakumla uzaklaştırılabileceği gibi elektrosprey ve termosprey yöntemlerini kullanarak da uzaklaştırılabilir. Her iki işlemden sonra mevcut bileşenin iyonlarına ayrışması için elektron bombardımanı (EB), kimyasal iyonlaştırma (CI) ve elektrosprey iyonlaştırma (ESI) üniteleri gibi iyonlaştırma kaynakları kullanılır (Swartz, 2010).

1.5.2. Yüksek Çözünürlüklü Tarama Yöntemleri ve Kombine Teknikler (High Resolution Screening Methods and Hyphenated Techniques)

Kombine (hyphenated) teknikler (on-line ayırma çifti ve biyokimyasal dedeksiyon yöntemleri), biyoaktif bileşiklerin daha hızlı belirlenmesini sağlayan yüksek çözünürlüklü tarama yöntemleri (HRS) olarak adlandırılır. Bu yöntemde HPLC ile kompleks karışımlar ayrılır, sonra kolon sonrası biyokimyasal yöntemlerle kompleks karışımda bulunan bileşiklerin tek tek aktiviteleri belirlenir. Aynı zamanda DAD, MS, NMR aktif bileşiklerin kimliğini belirlemek için kullanılır (Schenk vd., 2003). Bu zamana kadar yapılmış, literatürde mevcut olan on-line kolon sonrası yöntem geliştirme formatları; radikal temizleyiciler, reseptör ligandları ve enzim inhibitörleri için geliştirilmiş ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Shu-Yun vd., 2009).

1.5.3. On-line HPLC-Biyokimyasal Dedeksiyon Sistemleri

Kompleks karışımlardan biyoaktif bileşenlerin belirlenmesi son zamanlarda üzerinde en çok ilgi uyandıran bir konudur. On-line HPLC, kolon sonrası biyokimyasal yöntemler ve paralel kimyasal analizlerle birlikte külfetli saflaştırma ve sonraki ayırmalara gerek duyulmaksızın kompleks karışımlardan biyoaktif bileşenler belirlenmektedir (Shu-Yun vd., 2009).

Kompleks karışımlardan aktif bileşenlerin belirlenmesi zordur. Standart prosedür (bioassay guided fractionation of complex mixtures) aşağıdaki gibidir (Hostettmann vd., 2001; Robards, 2003).

- Kompleks karışımların istenilen biyolojik aktiviteye sahip olup olmadığını belirlemek için toplu biyolojik testler tarafından ayırma işleminin gerçekleştirilmesi,
- Aktivite değerlendirmesini takiben farklı çözücüler kullanarak ekstraksiyon yapılması,

- Farklı teknikler kullanarak (silika kolon kromatografisi, preparatif HPLC ve yüksek hızlı ters akım kromatografisi) toplu analizleri takiben ayrılan aktif bileşenlerin yeterli saflıkta olup olmadığını belirlemek,
- Aktif bileşenlerin çeşitli spektroskopik teknikler kullanılarak (UV, IR, MS, 1D ve 2D NMR, X-ray difraksiyon ve kimyasal metotlar) yapısal karakterizasyonu,
- Farmakolojik ve toksikolojik testler.

Kompleks karışımların bu şekilde ayrılması pahalı, zaman alıcı, yoğun iş gücü gerektiren bir durumdur. Bazende seyreltme ve ayırıştırma yüzünden izolasyon ve saflaştırma işlemi boyunca aktivite kaybına yol açabilir (Hostettmann vd., 2001).

Kompleks karışımlardan yeni aktif bileşenlerin araştırılmasında daha etkili bir yaklaşım gereklidir. Kromatografiye dayalı kombine tekniklerdeki [HPLC-DAD, HPLC-tandem MS(MS)² ve HPLC-NMR] yakın gelişmeler, kompleks karışımlardan ön ayırmalara gerek duyulmaksızın çok sayıda yeni ve farklı bileşiklerin eksiksiz belirlenmesini sağlar. On-line kolon sonrası biyokimyasal yöntemler kromatogramlardaki piklerle ilişkilendirilmiş biyoaktivitenin belirlenmesinde etkin olmaktadır (Wilson ve Brinkman, 2007).

Son zamanlarda on-line kolon sonrası antioksidan belirleme yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Enzimlere ve reseptörlere dayalı yöntemleri içeren kombine (hyphenated techniques) teknikler daha az yaygındır (Shu-Yun vd., 2009).

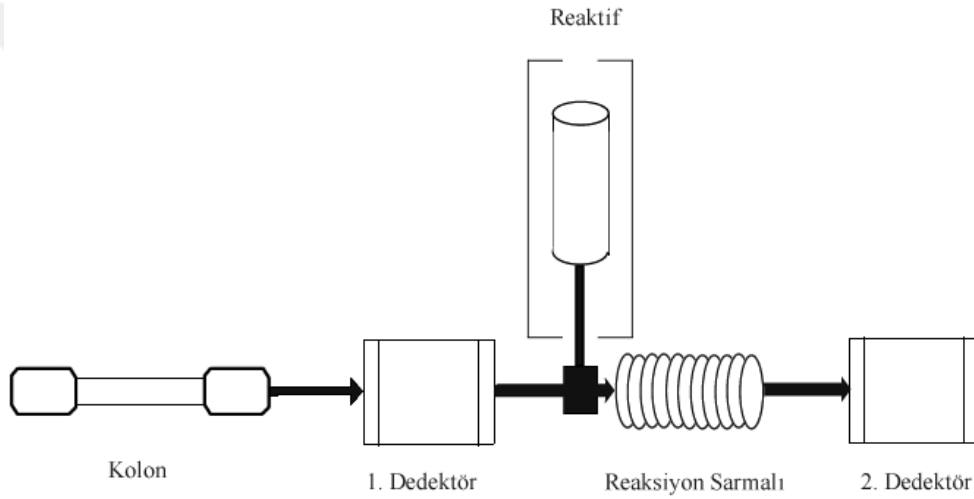
1.5.3.1. On-line HPLC-Biyokimyasal Dedeksiyon Sistemleri İçin Kurulum Şemaları

Bitkiler çok eski zamanlardan beri çok sayıda etkin ilaçların temel yapı taşlarını oluşturmuş ve yapısındaki kimyasal çeşitlilikten dolayı büyük oranda gizli kalmış yeni moleküler maddelerin keşfi için günümüzde halen çekici bir seçenek olmaya devam etmektedir (Butler, 2004). Doğal ürünlerde bulunan bileşenlerin kimyasal yapılarının yaklaşık %40'ı halen günümüzün tıbbi kimyasında açıklığa kavuşturulamamıştır (Potterat ve Hamburger, 2006).

Biyokimyasal dedeksiyon yöntemleri (BCD), biyokimyasal reaksiyonlara dayalı biyoaktiflerin dedeksiyonu olarak tanımlanabilir. Bu testler uzun uzun ayırıştırma ve izolasyon prosedürlerine gerek kalmaksızın, ekstraktlardaki veya karışımlardaki biyoaktif bileşenlerin hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanılır. Bu tip tarama prosedürünün gücü

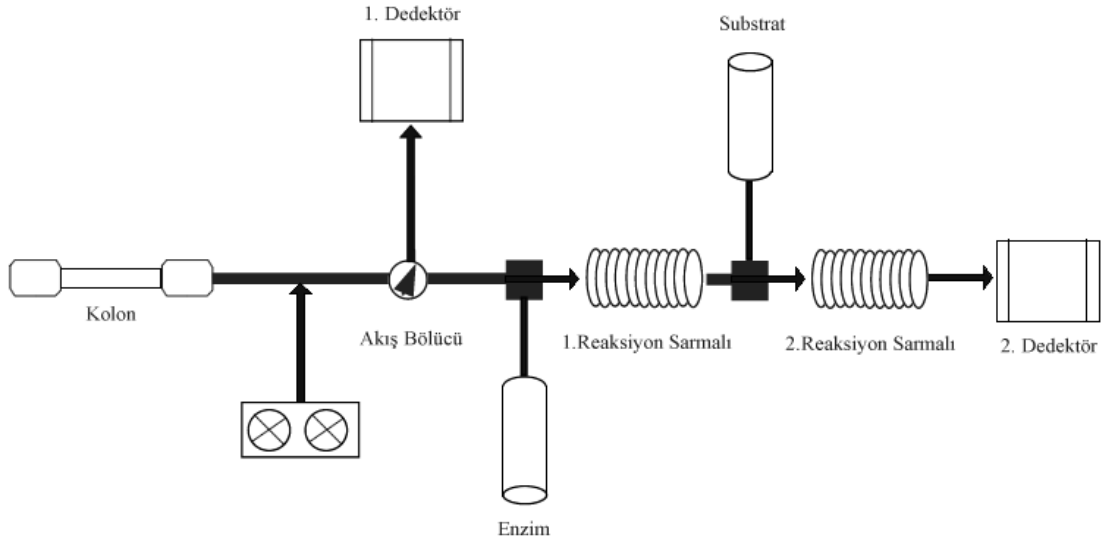
in-vitro testlerin önünü kesmesine dayandırılabilir. Çünkü spesifik hastalık markörüne karşı aktivite gösteren yeni hedef bileşiklerin daha fazla izole edilmesine ve test edilmesine ihtiyaç duyulur. Bitki ekstraktlarındaki biyoaktif bileşenleri tanımlamak için afinite/aktivite bazlı biyokimyasal dedeksiyon yöntemleri enzim afinite/aktivite dedeksiyonu (EAD), reseptör afinite dedeksiyonu (RAD), metabolit görüntüleme sistemleri ve antioksidan aktivite yöntemleri olarak sınıflandırabiliriz (Malherbe vd., 2012).

HPLC-BCD sistemlerinin kurulumları, spesifik amaçlar için optimizasyona veya ilgili araştırma grubunun tercihiyle bağlı olarak değişir. Fakat belirli yöntem türlerine uyan birkaç temel kurulum şemaları mevcuttur (Şekil 27-30).



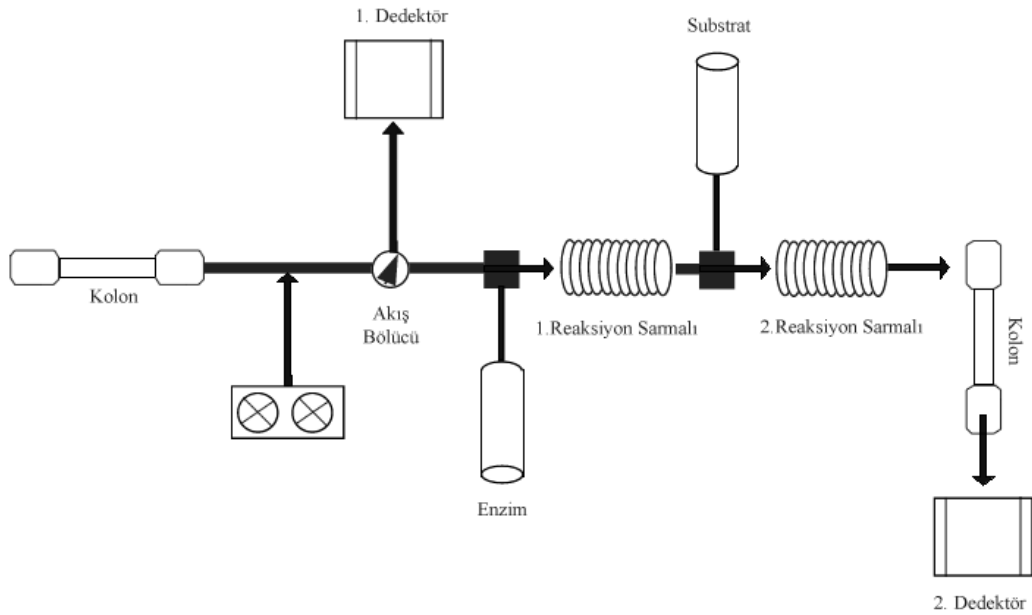
Şekil 27. HPLC-BCD sistemleri için temel kurulum şeması

Şekil 27’de verilen kurulum şeması çoğu on-line antioksidan yöntemlerde kullanılan en basit kurulum şemasıdır. HPLC eluentini bölen bir akış bölücü (flow-splitter) yoktur ve yalnızca tek bir reaksiyon sarmalına sahiptir.



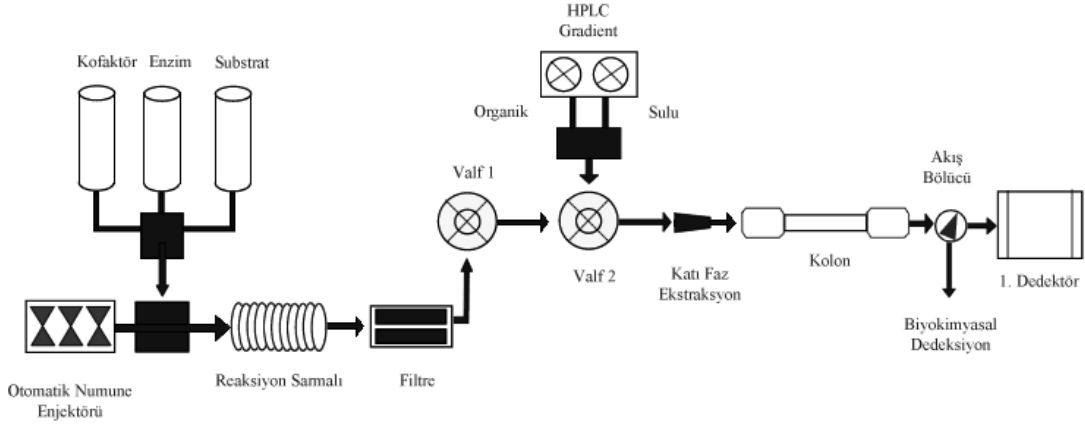
Şekil 28. EAD ve RAD yöntemleri için homojen kurulum şeması

Bazı on-line antioksidan yöntemlerin yanısıra, birçok EAD ve RAD yöntemleri HPLC eluentini bölmek için akış bölücü kullanırlar. Akışın bir kısmı doğrudan BCD sistemine gider, kalan kısmı bileşiklerin belirlenmesi için kullanılan ilave detektörlere bağlanır ya da atık kabına yollanır. Bu tip yöntemler ayrıca substrat ilavesinden önce inkübasyon sarmalındaki reseptörler ya da enzimler ile HPLC eluentinin ön inkübasyonunu içerir. EAD ve RAD yöntemleri homojen yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 28).



Şekil 29. HPLC-BCD sistemleri için heterojen kurulum şeması

Şekil 29’da daha ileri bir saflaştırma basamağına ihtiyaç duyulan bağlanmış ya da bağlanmamış ligandları birbirinden ayırmak için kullanılan kurulum şeması bulunmaktadır. Elde edilen sinyal yoğunluğunda göze çarpan bir farklılık vardır.



Şekil 30. Metabolit görüntüleme yöntemlerinde kullanılan kurulum şeması

Metabolit görüntüleme yöntemleri, metabolizma sisteminin otomatik numune enjektörü ve HPLC gradiyent pompa arasına eklenen bir kurulum kullanırlar. Bu sistem BCD sistemlerle birleştirilmiş reaktifler ve reaksiyon sarmalına ilave pompalar içerir. Numunenin enzim kaynağı ve kofaktörlerle reaksiyonundan sonra reaksiyon karışımı çapraz akış filtrasyon cihazı ile filtrelenir. Sonra reaksiyon karışımı HPLC ayırımından önce katı faz ekstraksiyon kolonunda tutulur. (Şekil 30).

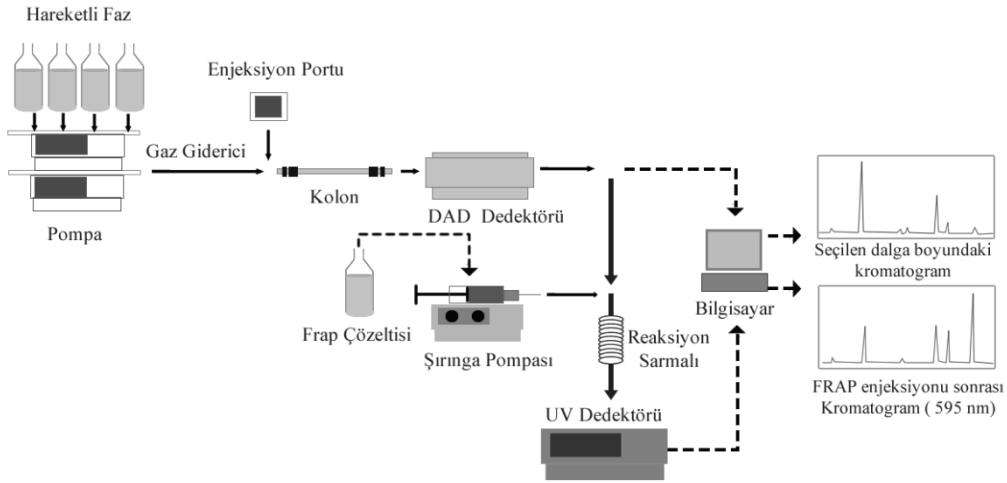
Farklı kurulum şemalarına rağmen, bahsedilen HPLC-BCD yöntemlerinin herhangi birinin başarılı bir şekilde geliştirilmesi için hala bazı genel değerlendirmeler vardır.

Öncelikle, kromatografik çözücüler nadiren de olsa enzim, reseptör gibi biyolojik materyal ile uyumlu olabilir ve antioksidan ya da inhibisyon reaksiyonlara müdahale edebilir.

Bu yüzden akış sistemlerinin kurulumu, ya ters gradiyentlerin miktarı boyunca organik çözücü miktarını sabit tutmak, ya da çözücü olarak kullanılan tampon ilavesi boyunca inhibitör konsantrasyonunu farkedilebilir bir değerin altında tutmaktır (Malherbe vd., 2012).

1.5.3.2. Laboratuvarımızda Geliştirilen On-line HPLC-BCD Yöntemleri

Laboratuvarımızda farklı amaçlar için geliştirilmiş on-line HPLC-BCD yöntemleri mevcuttur. Onlardan ilki Şekil 31’ de verilen on-line HPLC-FRAP antioksidan belirleme yöntemidir (Arslan-Burnaz vd., 2017). Bu yöntem ilk defa geliştirilerek, kullanılan 15 standardın ve numunelerdeki antioksidan bileşiklerin aktivitelerinin aynı anda görüntülenmesi amaçlanmıştır ve yöntem optimizasyonu sağlanarak bitki numunelerine uygulanmıştır. Geliştirilen bu yöntemin antioksidan cevap ve gürültü açılarından literatürdeki ABTS ve DPPH yöntemlerine göre üstünlük sağladığı görülmüştür. Böylelikle bitki ve gıda numunelerindeki bileşenlerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için yöntemin uygun olduğu görülmüştür. Bu yöntemle birlikte, literatüre on-line HPLC-antioksidan yöntemlerinden bir yenisi daha kazandırılmıştır.

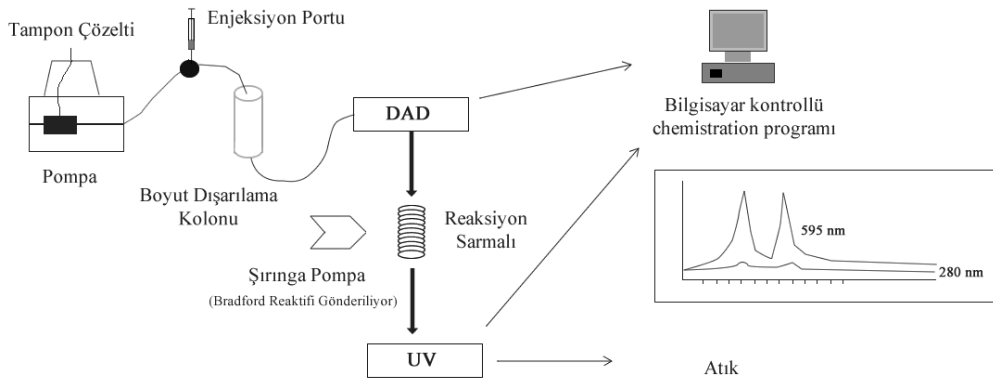


Şekil 31. On-line HPLC-FRAP antioksidan yöntemi için kurulum şeması (Arslan-Burnaz vd., 2017).

Laboratuvarımızda diğer geliştirilen yöntemlerden birisi de on-line HPLC indikatör tayin yöntemidir. Bu yöntemle birlikte karışımlarda bulunan indikatör özelliğe sahip bileşenlerin belirlenmesi amaçlanmıştır ve literatüre ilk defa bir on-line HPLC-indikatör yöntemi kazandırılmıştır. On-line olarak HPLC sistemine kombine edilmiş pompa ve dedektör yardımıyla, fenol kırmızısı ve bromotimol mavisi standart olarak kullanılarak yöntem geliştirilmiştir. Daha sonra mor lahananın sulu ekstraktına uygulanarak bu bitkideki indikatör özelliğe sahip bileşenlerin belirlenmesinde kullanılmıştır ve yapılan

analizler sonucu bu bitkinin indikatör özelliğine sahip en az 3 bileşene sahip olduğu görülmüştür. Geliştirilen bu yeni on-line HPLC yöntemiyle birlikte doğal pH indikatörlerinin tespiti daha kısa sürede sağlanmıştır (Doğan, 2015).

Yine laboratuvarımızda HPLC ile proteinlerin ayrılmasında deteksiyon amaçlı yeni bir on-line yöntem geliştirilerek gıda ve ilaç analizinde uygulanmıştır (Şekil 32). Bu yöntem geliştirilirken UV-Vis spektrofotometrik protein tayin yöntemlerinin taraması yapıldıktan sonra, üstün validasyon özelliklerine sahip olanların HPLC'ye uyarlaması yapılmıştır. Kolon sonrası sisteme şırınga pompayla reaktif gönderilerek kantitatif protein tayininin yapılabileceği on-line HPLC-Bradford protein tayin yöntemi geliştirilerek gösterilmiş ve gıda (jelatin proteini) ve biyofarmasötik ilaç (insülin, immünglobulin G proteinleri) numunelerine uygulanmıştır (Eyupoğlu, 2017).



Şekil 32. HPLC ile proteinlerin ayrılmasında deteksiyon amaçlı on-line yöntemin kurulum şeması (Eyupoğlu, 2017).

1.5.4. On-line HPLC-Enzim Aktivite Dedeksiyonu (HPLC-EAD) ile İlgili Literatür Araştırması

Çeşitli off-line yöntemler enzim-inhibitör aktivitesinin belirlenmesi için geliştirilmiştir. Nispeten basit, hızlı ve kolay olan bazı yöntemlerin biyokimyasal dedeksiyon sisteminde uygulanması mümkündür (Shi vd., 2009).

Ingkaninan ve arkadaşları bitkilerden asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerini araştırmak için AChE'ye dayalı bir BCD yöntemi geliştirmişlerdir (Ingkaninan vd., 2000a; 2000b). Kompleks karışımlardan AChE inhibitörlerini on-line, kolon sonrası kolorimetrik test ile belirlemek için Ellman's reaktifini kullanılmıştır. Antioksidan on-line testlerle

kurulumu aynıdır. Reaktifler aralıksız karıştırıldığı zaman 405 nm'de sarı ürün 5-tiyo-2-nitrobenzoat belirlenmiştir. AChE enziminin inhibitörü sisteme enjekte edildiği zaman, negatif pikler görülmüştür. AChE' nin iyi bilinen galantamin inhibitörü ile yeni bir AChE inhibitörü olan unguiminorin soğanlı bir bitki türü olan *Narcissus* bitkisinin alkolik ekstraktlarından belirlenmiştir (Ingkaninan vd., 2000b). Ingkaninan ve arkadaşları % 10 asetonitril ve % 0,25 asetik asitten daha fazlasını sistemin tolere edemeyeceğini göstermiştir. Çünkü bu orandaki çözücülerin enzim aktivitesinin neredeyse % 90' ını inhibe ettiğini göstermişlerdir. Metanol spesifik olmayan bağlanmaları da azalttığı için nispeten bu enzim ile geliştirilen yöntem için daha uyumlu olduğu gösterilmiştir (Ingkaninan vd., 2000b).

Rhee ve arkadaşları FIA (Flow Injection Analysis) modunda AChE inhibitörlerinin saptanması için bir florometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu enzimin inhibitörlerinin florometrik yöntem ile belirlenmesinde florojenik substratlar kullanılmıştır. Enzim inhibisyonu iki basamaklı işlemle ölçülmüştür. AChE reaksiyonunun ürünü olan tiyokolin florojenik substratla tepkimeye girmiş ve floresan tiyoeter ürününü vermiştir. Floresan bileşikler daha sonra enzim aktivitesini belirlemek için florometre kullanılarak belirlenmiştir. % 30 metanol ya da % 5 asetonitril varlığında % 70 enzim aktivitesi göstermiştir. Peristaltik pompalar kullanılarak sisteme substrat ve enzim gönderilmiştir. Çeşitli orijinli yirmi dokuz bitki özütü, AChE'ye karşı yüksek inhibisyon aktivitesi göstermiştir (Rhee vd., 2003).

Li ve arkadaşları, mayadan α -glukozidaz kullanarak kolorimetrik yöntemeye dayanan bir HPLC-BCD yöntemi geliştirmişlerdir. Ters fazlı HPLC ve DAD kullanılarak, pu-erh çayı, kartal çayı ve *Radix glicyrrhizae*' in metanolik ekstraktları, α -glukozidaz inhibitörlerinin varlığı açısından incelenmiştir. α -glukozidaz inhibitörlerinin eş zamanlı olarak belirlenmesi için ESI-MS dedeksiyonu kullanılmıştır. Enzim ve substrat, HPLC eluentinden ayrılan bir akışa 1:1 oranında eklenirken, organik modifikatörün (metanol) konsantrasyonunu sabit tutmak için ters gradient kullanılmıştır. % 30'un altındaki metanol konsantrasyonları, α glukozidaz enzimi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değilken, % 30 asetonitril, aktiviteyi önemli ölçüde inhibe etmiştir (Li vd., 2010).

Van Elswijk ve arkadaşları süt hidrolizatlarından ACE (Anjiotensin Dönüştürücü Enzim) inhibitörlerini belirlemek için bir floresans yöntem geliştirmişlerdir. HPLC eluenti, eş zamanlı olarak miktar tayini ve kimlik belirlenmesi için bir ESI Q-TOF MS'e, biyolojik aktif maddeleri tespit etmek için de BCD sistemine ayrılmıştır. Floresanda bir artışa neden

olması için ACE tarafından bölünebilen bir florojenik substrat olan *o*-aminobenzoik asit-fenilalanin-arginin-lisin-dinitrofenol-prolin kullanılmıştır. 320 nm ve 420 nm uyarma ve emisyon dalga boylarında biyokimyasal reaksiyonu izlemek için bir floresans detektör kullanılmıştır. Araştırılan süt hidrolizatlarında ACE inhibe potansiyeli olan 20 biyoaktif peptid varlığı gözlemlenmiştir. Peptidlerin tanımlanma işlemleri, Q-TOF MS parçalanma profillerine ve bir protein veritabanına kıyasla yapılmıştır (Elswijk vd., 2003).

Kool ve arkadaşları, sitokrom P450 1A1/1A2 kaynağı olarak β -naphthoflavone (β -NF) ile uyarılmış sıçan karaciğeri mikrozomları ile enzim afinite yöntemi geliştirmişlerdir. Substrat olan epoksiresolufin, CYP 1A1/1A2 ile, resorufine dönüştürülüp, On-line floresans dedeksiyon ile reaksiyon takip edilmiştir. Yöntemin optimizasyonu bilinen yedi ligand ile FIA modunda gerçekleştirilmiştir. % 50 inhibisyon (IC_{50}) elde etmek için gereken konsantrasyon değerleri sağlanmıştır. Analizi yapılan deterjanlar (saponin, sodyum kola ve Tween 20 ve 80) ile PEG polimerleri (PEG 6000 ve 3325) arasında yalnızca Tween 20 ve 80, mikrosomların aktivitesi üzerinde inhibisyon göstermemiştir. Metanol % 3-6 ve asetonitril % 1-3 oranlarındayken HPLC ayırımında kullanılabileceği gösterilmiştir. Organik çözücü konsantrasyonlarının optimal seviyede tutulması için HPLC eluentine bir ters-gradient eklenmiştir (Kool vd., 2005).

Diğer geliştirilen HPLC-EAD yöntemleri ve ilgili terapötik alanları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Geliştirilen HPLC-EAD yöntemleri ve biyoaktiflerin ilgili terapötik alanları (Malherbe vd., 2012).

EAD Testleri	Dedeksiyon	İlgili Terapötik Alanlar
Asetilkolinesteraz inhibitörleri	UV-Vis, 405 nm FL, λ_{ex} 406nm, λ_{em} 505 nm ESI-MS	Alzheimer hastalığı, senil bunama, Parkinson hastalığı, ataksi ve miyasteni gravis tedavisi
α -Glukozidaz inhibitörleri	UV-Vis, 405 nm	Tip II diyabet hastalığının tedavisi
Anjiotensin 1 dönüştürücü enzim	FL, λ_{ex} 320 nm, λ_{em} 420 nm	Hipertansiyon, kalp rahatsızlığı, diyabetik nefropati tedavisi
Karaciğer sitokrom P450 ligandları	FL, λ_{ex} 530 nm, λ_{em} 586 nm FL, λ_{ex} 530 nm, λ_{em} 590 nm FL, λ_{ex} 530 nm, λ_{em} 580 nm	Kanserden korunma
Glutatyon-S-transferaz inhibitörleri	FL, λ_{ex} 290 nm, λ_{em} 465 nm	Antikanser tedavilerinin geliştirilmesi

Tablo 1'in devamı

EAD Testleri	Dedeksiyon	İlgili Terapötik Alanlar
Serin proteaz inhibitörleri	FL, λ_{ex} 342 nm, λ_{em} 440 nm	Tromboz tedavisi
HIV-proteaz inhibitörü	FL, λ_{ex} 340 nm, λ_{em} 490 nm	AIDS tedavisi
Fosfodiesteraz inhibitörleri	FL, λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 460 nm	Hipertansiyon, damar rahatsızlıkları ve astım tedavisi
Kinaz / fosfataz inhibitörleri	FL, λ_{ex} 425 nm, λ_{em} 464 nm	Yeni ilaç hedefleri
MAP-kinase inhibitors	FL, λ_{ex} 355 \pm 4 nm, λ_{em} 405 \pm 5 nm	Enflamatuvar hastalıkların tedavisi

Literatürde, geliştirilen HPLC-EAD yöntemleri ile ilgili yapılan çalışmalarda Karbonik anhidraz (CA) inhibisyonu ile ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Yapılan bu çalışmada, CA inhibisyonu yöntemi on-line HPLC'ye uyarlanmıştır. İlk defa geliştirilmiş olan bu on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yöntemi CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid, sülfanilamid gibi inhibitörler kullanılarak optimize edilip, bitki ekstraktları HPLC ile bileşenlerine ayrılıp, DAD dedektörü ile kromatogramları belirli bir dalga boyunda belirlendikten sonra, bu şartlar kullanılarak karbonik anhidraz sisteme sürekli enjekte edilip elusyon takip edilirken bir sonraki enjeksiyon noktasından sisteme substrat eklenerek enzim aktivitesi ve eluattaki bileşenlerin bunlara etkisi bir UV dedektör aracılığı ile takip edilmiştir. Yeni geliştirilen yöntem, yüksek CA inhibisyon etkisi gösteren bitki ekstraktlarına uygulanmıştır.

1.6. Çalışmada Kullanılan Bitkiler ve Özellikleri

1.6.1. Ebegümeçi (*Malva sylvestris*)

Mallow olarakta bilinen *Malva sylvestris* haziran ve eylül ayları arasında çiçek açan, çok yıllık otsu bir bitkidir. Uzun saplı ve tüylü yaprakları vardır. Çiçekleri leylak renklidir. Kuzey Afrika ve Asya' da bulunur. Yaralanmaların yanısıra sindirim sistemi, solunum sistemi gibi çeşitli sistemlerin bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkinin biyolojik aktivitesi yapısındaki polifenoller. C vitamini, E vitamini, beta-karoten ve diğer önemli fitokimyasallar gibi antioksidanlara bağlanabilir (Barros vd., 2010).



Şekil 33. Ebegümeçi (*Malva sylvestris*), (Gasparetto vd., 2011).

1.6.2. Zerdeçal (*Curcuma longa*)

Anavatanı Doğu Asya' dır. Afrika, Endonezya, Hindistan, Srilanka gibi tropikal bölgelerde yetişir. Çok yıllık bir bitki olan zerdeçalın yaprakları, mızrak şeklinde, çiçekleri sarı renklidir. Zerdeçal çok eski zamanlardan beri kanserli hücrelerin çoğalmasını engelleyebildiğinden dolayı kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kağıt, deri, gıda, kozmetik gibi alanlarda boyar madde olarak kullanılmaktadır (Aggarwal, 2008; Kunnumakkara vd., 2008).



Şekil 34. Zerdeçal (*Curcuma longa*), (Yılmaz, 2011).

1.6.3. Sumak (*Rhus coriaria*)

Anacardiaceae familyasından olan sumak *Rhus* cinsi olarak adlandırılır. En yaygın türü *Rhus coriaria* olmakla birlikte 150' den fazla türü bulunmaktadır. Çalı ya da küçük ağaç tipi bir bitkidir. Ülkemizde de başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere çeşitli bölgelerde yetişmektedir. Kışın dökülen tüylü yaprakları, sonbaharda kırmızıya döner. Yapraklarında fazla miktarda antosiyanin, flavon ve organik asit bulunmaktadır. Sumağın baharat olarak kullanımı için önce kurutulur, sonra sofr tuzu ile öğütülür. Ekşimsi, buruk bir tadı vardır. İçeriğinde bulunan fitokimyasal bileşikler antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahiptir. Bu bitkinin yaprak ve meyveleri çok eski zamanlardan beri ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır (Mavlyanov vd., 1997).



Şekil 35. Sumak (*Rhus coriaria*), (Abu-Reidah, 2014).

1.6.4. Kuşburnu (*Rosa canina*)

Rosaceae familyası içerisinde yer alan kuşburnu, halk arasında yabangülü, gül elması gibi isimlerle de bilinmektedir. Avrupa, Orta ve Batı Asya' da yetişmektedir. Ülkemizde de en yaygın Tokat, Gümüşhane, Erzurum, Kars ve Sivas yörelerinde yetişmektedir. Soğuğa ve kuraklığa oldukça dayanıklı bir bitkidir. Tüysüz yapraklara, dallarında güçlü dikenlere sahiptir. İlbaharda yaprakları açar, kışın dökülür. Haziran ayında çiçek açar ve yirmi gün sonra meyveye dönüşür. Sonbaharda olgunlaşır. Olgunlaşan meyvelerin içi tüylü, renkleri parlak kırmızıdır. Mineraller ve C vitamini açısından oldukça zengindir. Ayrıca önemli miktarda karotenoid, folik asit, fenolik bileşikler ve önemli yağ asitlerine sahiptir (Montazeri, 2011).



Şekil 36. Kuşburnu (*Rosa canina*), (Aydemir, 2012).

1.6.5. Zencefil (*Zingiber officinale*)

Zingibeaceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Yumru köke sahip olup, bu bitki toprak altında yetişir. Baharat olarak kullanımının yanısıra, mide bulantısını giderici, sindirime yardımcı, diş ve baş ağrılarını önleyici, pıhtılaşmayı düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Tropikal ve subtropikal bölgelerde yetiştirilmektedir. Endonezya, Nijerya, Hindistan, Çin ve Tayland zencefil yetiştiriciliğinde ilk sıradadırlar. Köklerinde gingerol ve şoagol bulunur ve bu maddeler polifenolik maddelerdir ve yüksek antioksidan etkiye sahiptir. Yapısında A vitamini ve kalsiyum, çinko, bakır, fosfor, demir, manganez gibi mineralleri bulundurur (Ding vd., 2013).



Şekil 37. Zencefil (*Zingiber officinale*), (Arslan, 2014).

1.6.6. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*)

Leguminosae familyasına ait, çok yıllık bir bitkidir. Akdeniz ikliminin görüldüğü bölgelerde yetişmektedir. Ülkemizde ise akdeniz ikliminin görüldüğü Anadolu' nun güney ve batı kesimlerinde yetişmektedir. Keçiboynuzu ağacı 10 m uzunluğunda koyu renkli ve dayanıklı dallara sahiptir. Güçlü kök yapısı sayesinde çok az suya gereksinim duymaktadır. Bu yüzden kuraklıkta bile meyve verebilmektedir. Ağacının yaprakları 4-5 cm büyüklüğünde oval, açık yeşil renkte olup, kışın yapraklarını dökmemektedir. Keçiboynuzunun ağacı, meyvesi ve tohumlarının beslenmede önemli bir yeri vardır. Yüksek şeker içeriğinden dolayı meyvesinin rengi kahverengidir. Keçiboynuzu lifinin hiperkolesterolemi hastalarda kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Yapısındaki polifenoller sayesinde antioksidan etkiye sahiptir. Yüksek sodyum ve potasyum içeriği sayesinde karaciğer ve akciğer üzerine çok yararlı etkileri bulunmuştur (Karkacier ve Artık, 1995).



Şekil 38. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*), (Aydın, 2011).

1.6.7. Ballıbaba (*Lamium purpureum*)

Lamiaceae familyasından *Lamium* cinsini oluşturan bitki türüdür. 20-50 cm arasında dikine yükselen, yaprakları kalp, yumurta veya mızrak şeklindedir. Çiçekleri yaprak saplarının üzerinde yer alıp, gövdenin kenarına halka gibi oturmuş ve bu halka üzerinde 6-12 adet çiçekten meydana gelir. Ballıbaba verimli topraklarda yetişir, soğuğa karşı oldukça dayanıklıdır. Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika' nın ılıman bölgelerinde ve Türkiye' de ise

Marmara, Karadeniz ve Doğu Anadolu' da yetişir. Ülkemizde 27 türü tespit edilmiştir. Eflatun çiçekli olanı en yaygın olanıdır. Solunum yolu hastalıklarına ve gaz şikayetlerinde etkin olduğu bildirilmiştir (Cerrahoğlu, 2014).



Şekil 39. Ballıbaba (*Lamium purpureum*), (Cerrahoğlu, 2014).

1.6.8. Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*)

Hypericaceae familyasına ait olan sarı kantaron, kanotu, kılıçotu, yaraotu gibi değişik isimlerle anılan çok yıllık çalı veya ot şeklinde olan sarı çiçekli bir bitkidir. *Hypericum* cinsinin Türkiye' de 70 türü vardır, dünyada ise 400 farklı türü vardır. Yazın kurak, kışın nemli olan bölgelerde yetişir. Yüzyıllardır travma, yanık, bakteriyel ve viral enfeksiyonların tedavisinde, romatizma da geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu bitki yapısında flavonoidler, prosiyanidinler, esansiyel yağlar, aminoasitler ve tanninler içerir (Bombardelli ve Morazzoni, 1995).



Şekil 40. Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum*), (Çelikkol, 2015).

1.6.9. Karayemiş (*Prunus laurocerasus*)

Rosaceae familyasına ait olan karayemişin ülkemizde yaygın olarak kullanılan adı “taflan”dır. Başta Avrupa’ nın güney doğusu, Balkanlar ve Kuzey İran olmak üzere dünyanın çeşitli bölgelerinde yetişmektedir. Karadeniz’ in doğu bölgeleri, Kafkaslar, Toroslar, Kuzey ve Doğu Marmara’ da yaygın olarak bulunur. Her mevsim yeşil kalan yaprakları 6 metreye kadar boylanın çalı şeklinde bitkilerdir. Meyveleri koyu kırmızı veya siyah renktedir. Yapısında antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşikler içerir. Bu fenolikler serbest radikallere karşı korur (Çapanoğlu vd., 2011).



Şekil 41. Karayemiş (*Prunus laurocerasus*), (Doğu, 2014).

1.6.10. Adaçayı (*Salvia officinalis*)

Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait olan adaçayının kökeni, Akdeniz ve çevresidir. Ülkemizde ise güney sahillerimizde yetişmektedir. Tüylü, uzun grimsi yeşil renkte yapraklara sahiptir. 30-70 cm boyunda olup, menekşe renkli çiçeklere sahiptir. Adaçayı çok eski zamanlardan beri ilaç bitkisi olarak kullanılmaktadır. Tıbbi aromatik bitkiler içerisinde 200 çeşit, 3000 tür içeriği ile önemli bir yere sahiptir. Yapısında bulunan biyoaktif bileşenler ve bunların yüksek antioksidan aktivitelerinden dolayı sağlık üzerine bilinen birçok olumlu etkisi vardır. Kanser tedavisinde, tümör oluşumunu engelleyen aktivitesi nedeniyle güçlü bir potansiyele sahiptir (Martins vd., 2015):



Şekil 42. Adaçayı (*Salvia officinalis*), (Baki, 2009).

1.6.11. Sarımsak (*Allium sativum*)

Alliaceae familyasına ait olan sarımsak, lezzet verici bir besin maddesi olarak yemeklerde kullanılmaktadır. Yapısında vitaminler, amino asitler, proteinler, flavonoidler ve çeşitli antioksidanlar gibi 200'den fazla bileşen tespit edilmiştir. Sarımsak reaktif oksijen türlerini temizleme, lipit peroksit oluşumunu ve LDL (Düşük Yoğunluklu Lipit) oksidasyonunu inhibe etme özelliğine sahiptir. Sarımsağın ayrıca, kan şekerini düzenleyici ve antihipertansif özellikleri olduğu görülmüştür (Banerjee, 2003).



Şekil 43. Sarımsak (*Allium sativum*), (Banerjee, 2003).

1.6.12. Karanfil (*Syzygium aromaticum*)

Myrtaceae familyasına ait olan karanfil, *Syzygium* cinsine aittir. Karanfil baharatı, *Syzygium aromaticum* ağacından, karanfil çiçekleri ise *Dianthus petraeus* bitkisinden elde edilir. Dört mevsim yeşil kalan karanfil ağacının boyu 10- 20 m uzunluğa kadar yetişebilir. Anavatanı Endonezyya' dır. Baharat olarak tüm dünya mutfaklarında kullanılır. Baharat %15-20 oranında uçucu yağ, %10 oranında sabit yağ ve %13 oranında tanen içerir. Öjenol baharata tipik kokusunu ve tedavi edici özelliğini veren fenolik yapıdaki ana bileşendir. İyi derecede antiseptik özelliği vardır (Adefegha ve Oboh, 2012).



Şekil 44. Karanfil (*Syzygium aromaticum*), (Kutlu, 2013).

1.6.13. Maydanoz (*Petroselinum crispum*)

Apiaceae familyasına ait bir bitki olan maydanoz iki yıllıktır ve kültürü yapılıdır. Maydanoz bitkisinin tohumları diüretik etkiye sahiptir ve yüksek esansiyel yağ kapasitesine sahiptir. Maydanozun yapısında flavonoidler, askorbik asit, karotenidler, tokoferol ve uçucu bileşikler bulunmaktadır. Bu bitkinin yaprakları, kökleri ve tohumları tıpta anemi tedavisinde kullanılmaktadır. Çay olarak yüksek tansiyonu kontrol altına almak amacıyla tüketilmektedir. Ayrıca burun akıntısında, kulak ağrısında, deri kızarıklıklarında ve ağrıları azaltıcı olarak da kullanılmaktadır (Saçan vd., 2006).



Şekil 45. Maydanoz (*Petroselinum crispum*), (Saçan vd., 2006).

1.6.14. Lavanta (*Lavandula officinalis*)

Lamiaceae familyasından olan lavanta, çok değerli bir uçucu yağ bitkisi olup, başta Akdeniz ve Balkan ülkeleri olmak üzere, en fazla Güney Avrupa'nın ve Kuzey Afrika'nın Akdeniz'e komşu olan ülkelerinde yetişmektedir. Familyanın önemli bir gen merkezi Türkiye olup, bitkinin gövdesi 4 köşeli, yaprakları basit veya parçalı haldedir. Yaprakların koltuğunda bulunan çiçekler sık kümeler halinde bulunur. Çay ya da baharat olarak kullanımları mevcuttur. Yapraklarında flavonoidler, triterpenoidler ve 2-hidroksisinnamik asit esterleri bulunmaktadır. Ayrıca kumarin türevleri, steroller, triterpenler, rosmarinik asit, kafeik asit ve ferulik asit bulunur. Tıp, eczacılık, gıda ve kozmetik gibi alanlarda oldukça önemli bir yer tutar (Duman-Özler, 2017).



Şekil 46. Lavanta (*Lavandula officinalis*), (Duman-Özler, 2017).

1.6.15. Nane (*Mentha piperita*)

Lamiaceae familyasında yer alan nane, çok eski bir kültür bitkisidir. Bu *Mentha* türleri; çok eski zamanlardan beri birçok uygarlıkta kullanılmasının yanında, Osmanlı ve Türk tıbbında da her türlü hastalığın tedavisinde kullanılan bir bitki olmuştur. *Mentha piperita* dünyada da kültürü yapılan nane türüdür. Nane yapısında bulunan fenolik bileşiklerden dolayı antioksidan, anti bakteriyel, anti inflamator gibi biyolojik aktiviteler göstermektedir (Shen vd., 2011).



Şekil 47. Nane (*Mentha piperita*), (Çayır, 2014).

1.6.16. Mercanköşk (*Origanum onites*)

Labiatae familyasının önemli bir üyesidir. Ülkemizdeki 21 origanum türü arasındaki mercanköşk veya İstanbul kekiği olarak bilinen *Origanum onites* L. önemli ihraç ürünleri arasındadır. Yarı çalimsı, 65 cm'ye kadar boy veren, sert tüylü bir bitkidir. Türkiye'de genellikle baharat ve çeşni olarak kullanılmaktadır. Bitkinin uçucu yağının antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Aysel, 2008).



Şekil 48. Mercanköşk (*Origanum onites*), (Aysel, 2008).

1.6.17. Kına (*Lawsonia inermis*)

Lythraceae familyasından bir bitkidir. İki yıllık, otsu ve çok dallı küçük bir ağaçtır. Boyu 2-6m arasında, yaprakları küçük, 1,5-5cm uzunluğunda, 0,5-2cm genişliğinde, yeşilimsi kahverengi, eliptik ve kısa saplıdır. Boya ve süs bitkisi olarak Kuzey Afrika, Güneybatı Asya ve Hindistan'da yaygındır. *L. inermis* yapraklarının turuncu-kırmızı boyası vardır ve saç, tırnak, el, ayak boyamasında kullanılır. Kınanın ayrıca antiinflamatuvar, analjezik, antibakteriyel, antiviral, antikanser özelliklerinin de olduğu gösterilmiştir. Yapısında, mannitol, tannic asid, gallic asid, glukoz ve uçucu yağlar bulunmaktadır (Berenji, 2010).



Şekil 49. Kına (*Lawsonia inermis*), (Gözüböyük, 2013).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmalarda kullanılan cihazlar ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarlarından ve KTÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Kullanılan cihazlar ve malzemelerin satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmalarda kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Marka
Buzdolabı (+4°C)	Arçelik
Buchner hunisi	IsoLab
Derin dondurucu (-18°C)	Vestel
Elektroforez Sistemi ve Görüntüleme	Biorad
Etüv	Binder ve Nüve FN 120
Hassas Terazi	Mettler Toledo MS204
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	Agilent 1100 Series Degasser (Gaz giderici) Agilent 1100 Series Quad Pump (Dörtlü Pompa) Agilent 1100 Series VWD (Ultra Viyole dedektör) Agilent 1200 Series DAD (Diyot serili dedektör)
Isıtcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph/MR 3001 K Hei-standard
Kolon	C18, Hichrom (250 mm * 4,6 mm i.d., 5 µm partikül)
Kurutma makinesi	Fantom
Mikropipet	Gilson (10-100 µL) & (100-1000 µL)
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial Blender
pH metre	InoLab pH/ION/Cond 750
PTFE (Poly Tetra Fluoro Ethylene) Tubing	Supelco
Rotary vakum evaporatör	Heidolph
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Soğutmalı santrifüj	Beckman Coulter Allegra 64R
Su banyosu	Bibby R 100B
Şırınga	Hsw Norm-Ject 2-Part (20 mL) & (50 mL)
Şırınga pompası	Goldman syringe pump
Ultrasonik banyo	Bandelin
UV-Vis Spektrofotometre	ATI Unicam UV2
Vorteks karıştırıcı	IKA® Vortex Genius 3

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kullanılan kimyasal maddelerin üretici firmaları Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları

Kimyasal Adı	Üretici Firma
2-merkaptöetanöl	Merck
Akrilamid karışımı (%40'lık)	Biorad
Amonyum Persülfat (APS)	Merck
Asetazolamid	Sigma-Aldrich
Aseton	Merck
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Carlo Erba
Askorbik asit (C vitamini)	Sigma- Aldrich
Benzoik asit	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bromofenöl mavisi	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Merck
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Elajik asit	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Etilendiamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
FeCl ₃	Sigma-Aldrich
Ferulik asit	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Fluka
Fosforik Asit (H ₃ PO ₄)	Emsure [®] , Merck
Gallik asit	Sigma-Aldrich
Gliseröl	Sigma
Glisin	Sigma
HEPES	Ambresco
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck
Kaffeik asit	Sigma- Aldrich
Kateşin	Sigma- Aldrich
Kloroform	Merck
Klorojenik asit	Sigma- Aldrich
Kuersetin	Sigma- Aldrich
L-Tirozin	Sigma-Aldrich
Metanol (HPLC grade)	LiChrosolv [®] , Merck
N,N,N,N-Tetra Metil Etilen Diamin (TEMED)	Bio-Rad
p-OH benzoik asit	Sigma- Aldrich
p-kumarik asit	Sigma- Aldrich
p-nitrofenil asetat	Sigma-Aldrich
Potasyum Klorür (KCl)	Merck

Tablo 3'ün devamı

Kimyasal Adı	Üretici Firma
Protokatekualdehit	Sigma- Aldrich
Protokatekuik asit	Sigma- Aldrich
Sinapik asit	Sigma- Aldrich
Siringaldehit	Sigma- Aldrich
Siringik asit	Sigma- Aldrich
Sepharose -4B	Sigma
Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)	Sigma
Siyanojen Bromür (CNBr)	Sigma-Aldrich
Sodyum Asetat (NaCH ₃ COO)	Emsure [®] , Merck
Sodyum Bikarbonat (NaHCO ₃)	Emsure [®] , Merck
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Merck
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum Karbonat (Na ₂ CO ₃)	Emsure [®] , Merck
Sodyum Klorür (NaCl)	Carlo Erba
Sodyum nitrit (NaNO ₂)	Merck
Sodyum Perklorat (NaClO ₄)	Sigma-Aldrich
Sodyum Sülfat (Na ₂ SO ₄)	Emsure [®] , Merck
Sülfanilamid	Sigma-Aldrich
Sülfürik Asit (H ₂ SO ₄)	Carlo Erba
TPTZ	Sigma- Aldrich
Tris (hidroksimetil)-aminometan	Sigma
Troloks [®]	Sigma- Aldrich
Vanilik asit	Sigma- Aldrich
Vanilin	Sigma- Aldrich

2.2. Yöntem

2.2.1. Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması

Bitki seçimi yapılırken daha önce laboratuvarımızda yapılan enzim inhibisyon çalışmalarındaki sonuçlar dikkate alınmıştır. Deneylerde kullanılan bitkiler aktardan temin edilmiştir. Öncelikle, kurutucu ünitesinde bitkilerin nemini ortadan kaldırmak için 40 °C'de nem tamamen giderilene kadar bekletilmiştir. Kurutma işleminin ardından bitkiler metal bir öğütücü yardımıyla öğütülerek her birinden 5 g alınıp, 3 farklı çözücünün (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) 50 mL' sinde, oda sıcaklığında ağzı kapalı bir şekilde iki saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma işleminin ardından numuneler önce adi süzgeç kağıdı, ardından mavi bantlı süzgeç kağıdı ile süzülmüştür.

Ardından tamamen berrak çözelti elde etmek için 0,45 µm por büyüklüğüne sahip şırınga filtrelerden geçirilmiştir. Berrak çözeltiler enzim inhibisyon çalışmalarında, antioksidan çalışmalarda ve kromatografik çalışmalarda analizi yapılana kadar -18 °C’de bekletilmiştir.

2.2.2. Deneyde Kullanılan Kanın Temini

İnsan kanı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Kan Bankası’ndan etik kurul raporuyla temin edilmiştir. Kanların gerekli testlerden geçirilmiş olmasına dikkat edilmiştir. Sığır kanı ise, mezbahanedен kesim sırasında taze olarak alınıp, hem pıhtılaşma önlenmesi hem de eritrositler için bir beslenme ortamı sağlanması amacıyla asit sitrat dekstrozu (ACD) şişede toplanmıştır. Daha sonra kanlar bekletilmeden hemolizatları hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılıncaya kadar -20 °C’de bekletilmiştir.

2.2.3. Enzim Saflaştırma Çalışmaları

2.2.3.1. Afinite Jelinin Sentezlenmesi

Jelin sentezlenmesi için afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Sepharose-4B’nin serbest hidroksil grupları siyanojen bromür ile aktiveleştirildikten sonra tirozin uzantı kolu olarak takılmıştır. Enzimi yüksek oranda saflaştırmak için, spesifik bir CA inhibitörü olan sülfanilamidin diazolanarak tirozine kenetlenmesi sağlanmıştır (Kohn ve Wilchek, 1978). Bu jel daha önce hCAI, hCAII ve BCA enzimlerinin saflaştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Arslan vd., 1996).

2.2.3.1.1. Sepharose 4B’nin Aktifleştirilmesi

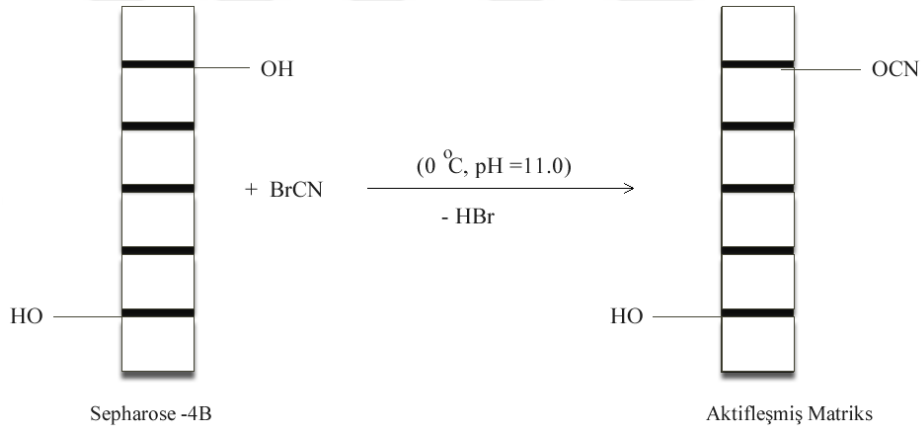
Kullanılan Çözeltiler:

4 M NaOH: 8 g NaOH saf suda çözülüp, toplam hacim saf su ile 50 mL’ye tamamlanmıştır.

0,1 M NaHCO₃, (pH:10): 2,1 g NaHCO₃ 200 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH’sı 1 M NaOH ile 10’a ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 250 mL’ye tamamlanmıştır.

Deneyin Yapılışı:

Sepharose 4B' nin aktifleştirilmesi için (Şekil 50) 20 mL jel soğuk saf su ile birkaç kez yıkanıp, sulu kısım uzaklaştırılmıştır. Yıkanan jel üzerine eşit hacimde saf su ilave edilip, işlem buz banyosunda yapılmıştır. Elde edilen süspansiyon, manyetik karıştırıcı ile yavaş yavaş karıştırılırken üzerine 4 g toz haline getirilmiş CNBr ilave edilmiştir. CNBr toksik bir kimyasal olması nedeniyle bu işlemler çeker ocakta yapılmış, maskeler ile çalışılmıştır. Buz banyosunda karıştırılan süspansiyonun pH' sı 4 M NaOH çözeltisiyle 11' e getirilmiştir. Bu işlem sırasında ortamın sıcaklığının artmaması için saf sudan hazırlanmış buz parçaları ortama ilave edilmiştir. pH' nın 11'de sabitlenmesi işlemi yaklaşık olarak 15 dakika sürmüştür. Karışım Buchner hunisinden süzülüp, ardından jel pH' sı 10 olan 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ çözeltisi ile yıkanıp, behere aktarılmıştır (Arslan vd., 1996).



Şekil 50. Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi

2.2.3.1.2. Tirozin Takılması

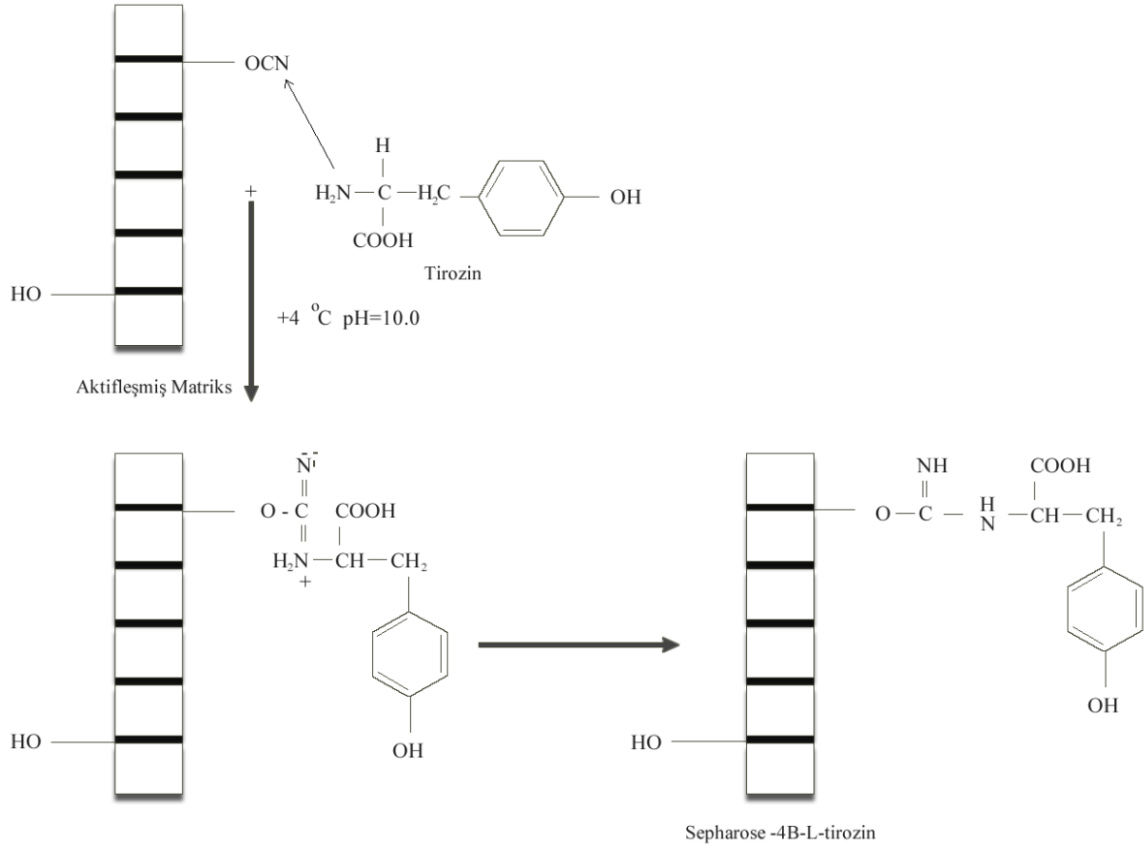
Kullanılan Çözeltiler:

2 mg/mL *L*-Tirozin: 80 mg *L*-tirozin 40 mL 0,1 M NaHCO₃ (pH:10) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

0,2 M NaHCO₃, (pH:8,8): 1,68 g NaHCO₃ 80 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1 M NaOH ile 8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Deneyin Yapılışı:

Behere aktarılan jel üzerine 2 mg/mL'lik 40 mL *L*- tirozin çözeltisi ilave edilmiştir. CNBr jelin hidroksil gruplarına takılarak -OCN yapısını oluşturur ve bu yapının kararlılığı oldukça düşüktür. Bu yüzden, pH'nın 11'de sabitlenmesinden sonra jelin tamponla yıkanması ve tirozin çözeltisiyle karıştırılması işlemleri 90 saniyeyi geçmeyecek şekilde yapılmaya çalışılmıştır. Bu sürenin uzaması halinde, aktifleşmiş gruplar tekrar -OH gruplarına dönüşebilir ve tirozin takılması bu durumda gerçekleşmez. Tirozin bağlanmasının tamamlanması için süspansiyon +4 °C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılıp, ardından 16 saat boyunca +4 °C'de bekletilmiştir. Daha sonra, jel yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol miktarda saf su ile yıkanmıştır. Bu şekilde reaksiyona girmemiş tirozin ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra jelin yıkanması pH' sı 8,8 olan 100 mL 0,2 M NaHCO₃ ile tekrarlanarak tirozin takılı jel (Şekil. 51) aynı tamponun 40 mL'si içerisine alınmıştır (Arslan vd., 1996; Laemmli, 1970).



Şekil 51. Aktifleştirilmiş sepharose-4B'ye tirozin takılması

2.2.3.1.3. Sülfanilamid Kenetlendirilmesi

Kullanılan Çözeltiler:

1 M HCl: 8,3 mL % 37'lik HCl (d: 1,19 g/mL) 80 mL saf suda çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1 M NaOH: 10 g NaOH 200 mL saf suda çözülüp toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

2,5 mg/mL Sülfanilamid: 25 mg sülfanilamid buz banyosunda 10 mL 1M HCl içinde çözülerek hazırlanmıştır.

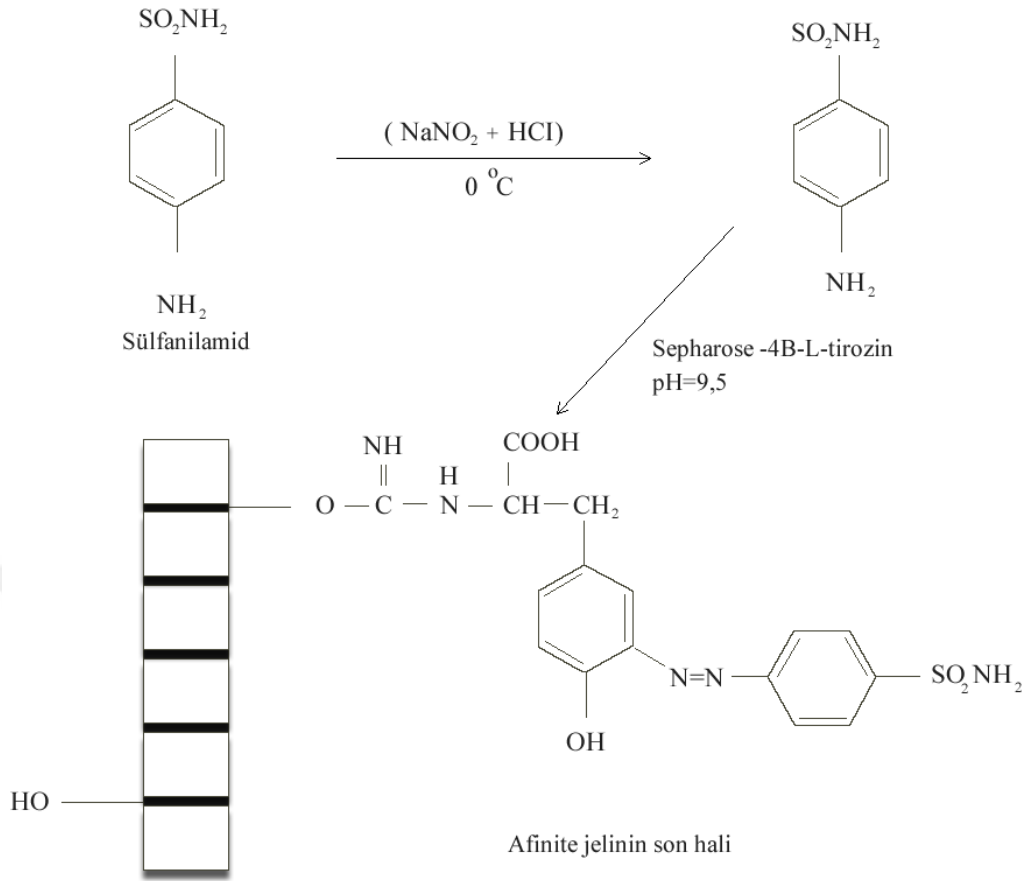
15 mg/mL NaNO₂: 75 mg NaNO₂ 5mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

1M H₂SO₄: 5,43 mL % 98'lik H₂SO₄ (d:1,84g/mL) 80mL saf suda çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,05 M Tris-SO₄ (pH:7,4): 6,05 g tris(hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözülüp çözeltinin pH'sı 1 M H₂SO₄ ile 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

Deneyin Yapılışı:

Buz banyosunda 25 mg sülfanilamid 10 mL 1 M HCl içerisinde çözülüp ve yine buz banyosunda bekletilen 75 mg NaNO₂ içeren 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla ilave edilmiştir. Sülfanilamid çözeltisinin diazolandığı 10 dakikalık reaksiyondan sonra amonyağa benzer keskin kokudan anlaşılmıştır ve bu çözelti 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edilmiştir. 1 M NaOH çözeltisi ile süspansiyonun pH' sı 9,5' e getirilerek sabit tutulmuştur. pH 8'lerde iken süspansiyonun rengi kırmızıya dönmeye başlamıştır ve 3 saat oda sıcaklığında yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra 1 L saf su ve pH' sı 7,4 olan 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ tamponuyla yıkanmıştır. Bu işlemler sırasında jelin (Şekil 52) tamamen kurumamasına dikkat edilmiş ve aynı tamponun içerisine alınarak kolona yüklenene kadar +4 °C' de bekletilmiştir (Cuatracases, 1970).



Şekil 52. Diazolama aracılığıyla sepharose-4B-L-tirozin'e sülfanilamidin kenetlenmesi reaksiyonları

2.2.3.2. Afinite Kolonunun Paketlenmesi

Kullanılan Çözelti:

Dengeleme Tamponu (25 mM Tris - 0,1 M Na₂SO₄ (pH:8,7)): 3,03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 14,2 g Na₂SO₄ 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1M HCl ile 8,7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

Sentezlenen jelin üst kısmındaki çözelti uzaklaştırılmıştır. Dengeleme tamponu (25 mM Tris - 0,1 M Na₂SO₄, pH: 8,7) hem jele ilave edilmiştir, hem de alt ucunda sinterleşmiş camdan oluşan süzme sistemi bulunan kolona doldurulmuştur. Kolonun üst kısmı kapatılarak borunun ucu dengeleme tamponunun içine daldırılmıştır. Peristaltik pompanın çalıştırılmasıyla boruların tamponla dolması sağlanmıştır (Şekil 53). Kolondaki tampon seviyesi de kolonun üst kısmından az aşağıda olacak ve cam kısımdan görülecek şekilde ayarlanmıştır. Peristaltik pompanın dönüş hızı, eluatın akış hızı 20 mL/saat olacak

şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra borunun ucu jel süspansiyonu içine daldırılarak, jelin kolonda paketlenmesi sağlanmıştır. Jelde kabarcık ve çatlak oluşmamasına dikkat edilmiştir. Paketleme işlemi bittikten sonra, jel dengeleme tamponu ile 24 saat dengelenmeye bırakılmıştır. 24 saat sonunda kolonun dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm’ de absorbanlarının ve pH’ larının eşitlenmesinden anlaşılmıştır.

2.2.3.3. Hemolizatın Hazırlanması

Kullanılan Çözelti:

İzotonik Tuz Çözeltisi (% 0,9 NaCl) : 9 g NaOH 900 mL saf suda çözülüp toplam hacim 1L’ye tamamlanmıştır.

Kandan hemolizat eldesi için, alınan kan santrifüj tüplerine doldurularak 15 dakika boyunca 2500 rpm’de santrifüj edilip, tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakaları plastik pastör pipetleri ile dikkatli bir şekilde alınmış, tüplerin altında kalan eritrositler izotonik tuz çözeltisiyle (%0,9 NaCl) üç kez yıkanmıştır. Her defasında 2500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Yıkamalar esnasında üstteki kısmın uzaklaştırılması işlemleri tekrarlanmıştır. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 1,5 katı kadar buzlu su ilave edilerek bir beherde toplanarak, +4 °C’de 30 dakika karıştırılarak eritrositlerin hemoliz edilmesi sağlanmıştır. Hemolizatın içerisinde bulunan hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4 °C’de 20.000 rpm’de 40 dakika santrifüj edilmiş, üst kısımdaki hemolizat plastik pastör pipetle alınarak bir beherde toplanmıştır. Hücre zarları uzaklaştırılan eritrositlerin pH’sı katı Tris ile 8,7’ye ayarlanmış ve hemolizat kolona tatbik edilecek hale getirilerek en geç birkaç gün içinde kolona uygulanmıştır. Kolona uygulanana kadar -20 °C’ de bekletilmiştir (Rickli vd., 1964).

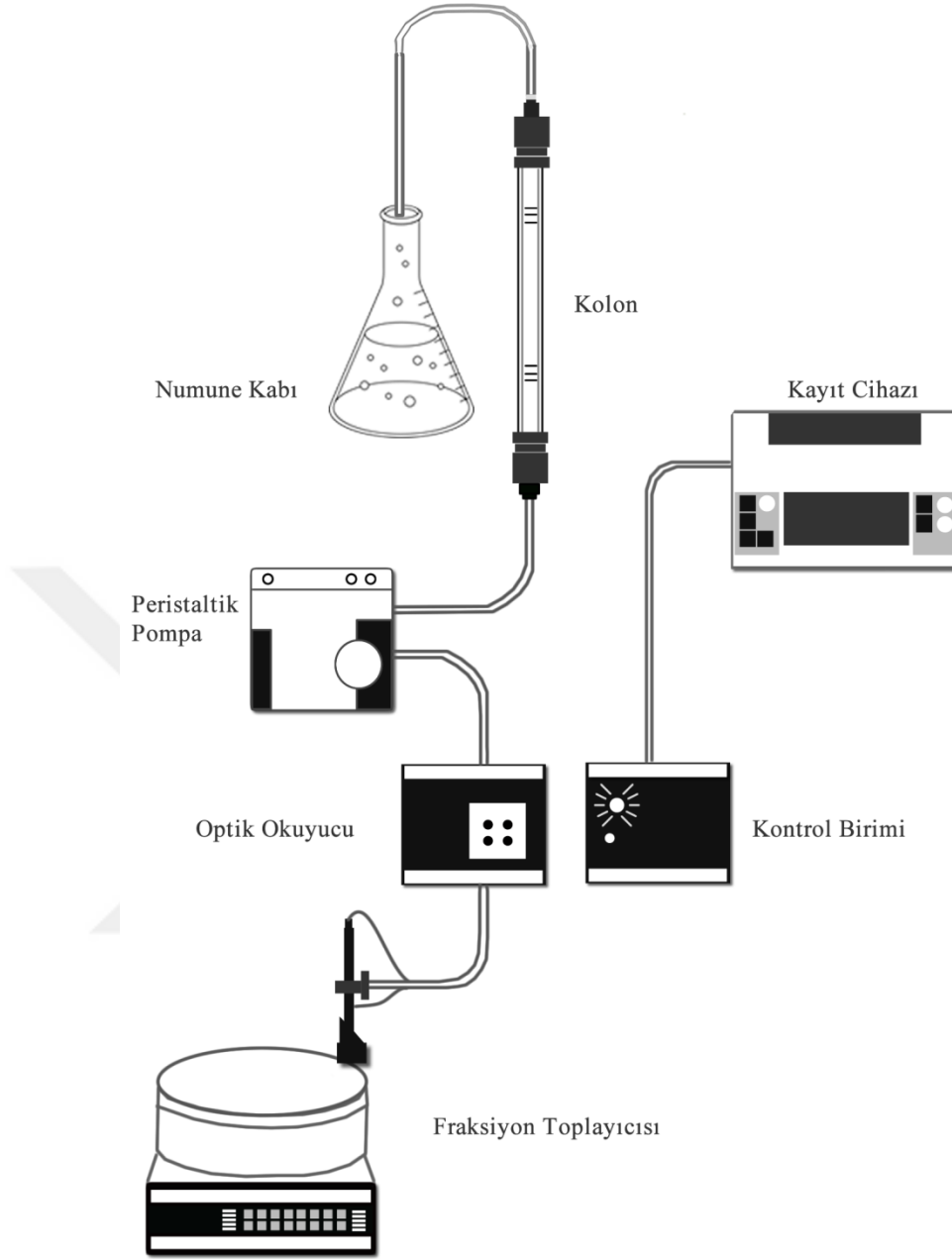
2.2.3.4. Afinite Kolonuna Hemolizat Tatbiki

Kullanılan Çözeltiler:

Dengeleme Tamponu (25 mM Tris - 0,1 M Na₂SO₄ pH: 8,7): 3,03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 14,2 g Na₂SO₄ 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH’sı 1M HCl ile 8,7’ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L’ye tamamlanmıştır.

Yıkama Tamponu (25 mM Tris - 22 mM Na₂SO₄ pH:8,7): 3,03 g Tris(hidroksimetil)-aminometan ve 3,12 g Na₂SO₄ 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1M HCl ile pH'sı 8,7'ye ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

Dengeleme tamponuyla (25 mM Tris - 0,1 M Na₂SO₄, pH: 8,7) dengelenmeye bırakılan jel, dengeye geldikten sonra borunun ucu dengeleme tamponundan çıkarılıp hemolizat içerisine yerleştirilmiştir. Akış hızı yine 20 mL/saat olarak sabit tutulmuş, hemolizatın kolona yüklenmesi tamamlandıktan sonra, yıkama tamponu (25 mM Tris - 22 mM Na₂SO₄ pH:8,7) sisteme verilmiştir. Böylelikle hemolizattan kaynaklanan istenmeyen bütün bileşikler kolondan temizlenmiştir (Rickli vd., 1964). Kolona insan kanı tatbik edildiyse hCAI ve hCAII, eğer sığır kanı tatbik edildiyse BCA, kolonda tutturulmuştur. Hemoglobinin kırmızı rengi kaybolana kadar ve eluatın 280 nm'deki absorbansı 0,02'nin altına düşünceye kadar yıkama işlemine devam edilmiştir.



Şekil 53. Afinite kromatografisi ve fraksiyon toplama düzeneği

2.2.3.5. İnsan Karbonik Anhidraz I (hCAI) Elusyonu

Kullanılan Çözelti:

hCA I Elusyon Tamponu (50 mM Na_2HPO_4 -1 M NaCl pH:6,3): 3,55 g Na_2HPO_4 ve 29,25 g NaCl 450 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1 M HCl ile 6,3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 500 mL'ye tamamlanmıştır.

Afinite kolonuna tutturulan hCAI izoenziminin elusyonu için hCAI elusyon tamponu (50 mM Na₂HPO₄-1 M NaCl pH:6,3) kullanılmıştır. Akış hızının saatte 20 mL olduğu sistemde eluatlar fraksiyon toplayıcı ile tüplerde 5'er mL'lik kısımlar halinde toplanmıştır. 280 nm'de eluatların absorbansları, elusyonda kullanılan elusyon tamponuna karşı okunmuştur. hCAI izoenziminin kolondan tamamen ayrılışı takip edilerek, eluatlar kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır (Rickli vd., 1964).

2.2.3.6. İnsan Karbonik Anhidraz II (hCAII) Elusyonu

Kullanılan Çözelti:

hCA II Elusyon Tamponu (0,1 M CH₃COONa-0,5 M NaClO₄ pH:5,6): 3 g NaOH, 9,19 g NaClO₄ ve 2,04g CH₃COONa 125 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1M HCl ile 5,6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır.

hCAI eluatlarının toplanmasının (280 nm' deki absorbansın 0,02' nin altına düşmesinin) ardından, afinite kolonuna tutturulan hCAII izoenziminin elusyonu için, hCAII elusyon tamponu (0,1 M CH₃COONa-0,5 M NaClO₄ pH:5,6) akış hızı yine 20 mL/saat olacak şekilde kolona verilmiştir. Eluatlar 5' er mL' lik fraksiyonlar halinde tüplerde toplanmıştır. 280 nm' deki absorbans 0,02' nin altına düşene kadar bu işleme devam edilmiştir. Eluatlar kullanılana kadar +4 °C' de saklanmıştır. Kolona tekrar dengeleme tamponu (25 mM Tris - 0,1 M Na₂SO₄, pH: 8,7) uygulanmıştır (Rickli vd., 1964).

2.2.3.7. Sığır Karbonik Anhidraz (BCA) Elusyonu

Kullanılan Çözelti:

BCA Elusyon Tamponu (0,1 M CH₃COONa-0,5 M NaClO₄ pH: 5,6): 9,19 g NaClO₄ ve 2,04 g CH₃COONa.3H₂O 120 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1M HCl ile 5,6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır.

Kolona sığır kanı tatbik edilerek, BCA, kolonda tutturulmuştur. Hemoglobinin kırmızı rengi kayboluncaya kadar ve eluatın 280 nm'deki absorbansı 0,02' nin altına düşünceye kadar yıkama tamponuyla (25 mM Tris - 22 mM Na₂SO₄ pH:8,7) yıkama işlemine devam edilmiştir. Daha sonra, BCA elusyon tamponu (0,1 M CH₃COONa-0,5 M

NaClO₄ pH: 5,6), akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde kolona verilerek, eluatlar 5'er mL'lik fraksiyonlar halinde tüplerde toplanmıştır. 280 nm' deki absorbans 0,02'nin altına düşene kadar bu işleme devam edilmiştir. Eluatlar kullanılabildiği kadar +4 °C'de saklanmıştır. Kolona tekrar dengeleme tamponu (25 mM Tris - 0,1 M Na₂SO₄, pH: 8,7) uygulanmıştır.

2.2.4. Protein Tayini

2.2.4.1. Kalitatif Protein Tayini

Proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip triptofan ve tirozin amino asitlerinin 280 nm' de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanan kalitatif protein tayini, kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde toplanan bütün fraksiyonlarda yapılmıştır (Segel, 1968). Kuvartz küvetler kullanılarak spektrofotometrede 280 nm' deki absorbansları elusyon tamponuna karşı okunmuştur.

2.2.4.2. Kantitatif Protein Tayini

Kullanılan Çözeltiler:

Sığır serum albumin (BSA) çözeltisi (1,2 mg/mL): 1,2 mg sığır serum albuminin 1 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Bradford Reaktifinin Hazırlanması: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözülüp, üzerine 100 mL % 85'lik H₃PO₄ eklenip, toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

Standart BSA çözeltileri: 1,2 mg sığır serum albuminin 1 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Standart BSA'dan 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 mg/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

Saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları bu yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntem, fosforik asitli ortamda, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250' nin bağlanma sonucu oluşan kompleks 595 nm' de maksimum absorbansa sahiptir. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı gerçekleşir. 1-100 µg arasında yöntemin hassasiyeti vardır (Bradford, 1976).

Protein tayininde standart protein çözeltileri hazırlamak için, 1,2 mg/mL sığır serum albumin (Bovine Serum Albumin, BSA) içeren stok protein çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL pipetlenip, ardından saf su ile tüm tüplerin hacmi 100 µL' ye tamamlanıp, 5 mL Coomassie reaktifi ilave edilip vortekslenmiştir. Kör olarak saf su kullanılmıştır. 10 dakika sonra 595 nm' de absorbans değerleri köre karşı okunmuştur. µg protein değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri standart grafik haline getirilmiştir. Protein tayini yapılacak numuneler için numune hacmi olarak 100 µL alınıp, üzerine doğrudan Coomassie reaktifi ilave edilmiştir. Kör olarak protein çözeltisi yerine 100 µL her bir numunenin elusyon tamponu kullanılmıştır.

2.2.5. Diyaliz

Kullanılan Çözeltiler:

Aktifleştirme Tamponu (100 mM NaHCO₃ / 10mM EDTA pH:7,4): 8,4 g NaHCO₃ ve 3,72 g EDTA 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

10 mM PBS: 0,863 g Na₂HPO₄, 0,471 g NaH₂PO₄, 8,02 g NaCl ve 0,18g KCl 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

10 mM EDTA-10 mM PBS: 3,72 g EDTA 10 mM PBS içerisinde çözülüp, toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

% 0.1 Kloroform: 1mL kloroform 1L saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

2.2.5.1. Diyaliz Torbasının Aktifleştirilmesi

Eluatların tampon bileşenlerinden uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz torbaları istenilen boyutta kesilerek, 1 L'lik beher içerisine alınıp, üzerine aktifleştirme tamponu (100 mM NaHCO₃ / 10mM EDTA pH:7,4) ilave edilmiştir. Daha sonra 60 °C'de 2 saat yavaşça karıştırılmıştır. Aynı işlem tampon uzaklaştırılıp tekrarlanmıştır. Ardından saf sudan geçirilip, saf su ile 60 °C'de 1 saat düşük hızda karıştırılmıştır. Sıvı kısım uzaklaştırılarak, çözelti berraklaşmaya kadar bu işleme devam

edilmiştir. +4 °C'ye kadar yavaşça soğutulup, kullanılana kadar %0,1' lik kloroformda saklanmıştır.

2.2.5.2. Diyaliz İşlemi

Diyaliz işlemi +4 °C'de her 3 saatte bir tamponu tazeleyerek önce 10 mM EDTA-10 mM PBS içerisinde 12 saat süreyle ardından 10 mM PBS içerisinde 12 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.

2.2.6. Liyofilizasyon

Diyaliz işlemi bittikten sonra daha derişik protein çözeltileri elde etmek için numuneler liyofilize (dondurup kurutma yöntemi) edilmiştir. Sıvı azot kullanılarak, çözeltiler dondurulmuş ardından çözücüsü soğutmalı sistemde uçurularak deriştirilmiştir.

2.2.7. SDS-Page Elektroforezinin Uygulanması

Kullanılan Çözeltiler:

Ayrırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl): 45,42 g Tris 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 8,8'e ayarlanıp, hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır ve +4 °C'de saklanmıştır.

Yığıma Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl): 30,28 g Tris 200 mL saf suda çözülüp, pH'sı 6,8'e ayarlanmıştır, toplam hacim 250 mL'ye tamamlanıp, +4 °C'de saklanmıştır.

SDS Çözeltisi (%10): 10 g SDS saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (%10): 1 g APS saf suda çözülüp, hacmi 10 mL'ye tamamlanıp, -20 °C'de saklanmıştır.

N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin (TEMED): Orijinal şişesinden kullanılmıştır.

Akrilamid/Bisakrilamid Çözeltisi (%30 m/v): 29,2 g akrilamid ve 0,8 g N,N'-metilen bisakrilamid saf suda çözülüp, hacmi 100 mL'ye tamamlanıp, +4 °C'de saklanmıştır.

Bromofenol Mavis (0,1 m/v): 10 mg bromofenol mavis saf suda çözülüp, hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 150 μ L 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 400 μ L %10 SDS, 100 μ L %0,1 bromofenol mavisi, 250 μ L %80 gliserol ve 60 μ L β -merkaptoetanölün karıştırılmasıyla hazırlanıp, küçük kısımlara ayrılarak -20 °C’de saklanmıştır.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 7,2 g Tris ve 1,5 g glisin yaklaşık 480 mL saf suda çözüldükten sonra üzerine 10 mL SDS (%10) çözeltisi ilave edilip, pH 8,3’e ayarlanmıştır. Çözeltinin son hacmi 500 mL’ye tamamlanmıştır.

Jel Boyama Çözeltisi: 1 g Coomassie Brilliant Blue R250’nin 62,5 mL glasiyal asetik asit ve 93,5 mL metanol içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 100 mL glasiyal asetik asit, 400 mL metanol ve 600 mL saf suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

2.2.7.1. Jelin Hazırlanması

Hem kirliliklerin giderilmesi hem de jelin sızması için elektroforez etil alkol ile silinmiştir. Elektroforez sistemine cam levhalar yerleştirilerek Tablo 4’te oranları verilen %10’luk ayırma jeline TEMED ilave edilerek polimerleşme başlatılmıştır. Daha sonra cam levhalar arasında hazırlanan jel dökülerek hava ile teması kesilmiştir. Polimerleşmenin tamamlanması için 40 dakika beklenmiştir. 40 dakika sonra %5’lik yığma jeli hazırlanmış ve jelin üzerine dökülmüştür. Yığma jelinin üzerine taraklar yardımıyla kuyucuklar oluşturulmuştur. Bu işlem sırasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Yığma jelinin içeriği Tablo 4 ’te verilmiştir.

Tablo 4. Elektroforez jeli için kullanılan madde miktarları

Bileşenler	%5’lik Yığma Jeli	%10’luk Ayırma Jeli
Saf Su	2,7 mL	4 mL
%30’luk akrilamid/bisakrilamid	0,67 mL	3,3mL
1,5M Tris Tamponu (pH 8,8)	--	2,5 mL
1,5M Tris Tamponu (pH 6,8)	0,5 mL	--
%10’luk Amonyum persülfat	0,04 mL	0,1 mL
SDS (%10 w/v)	0,04 mL	0,1 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL

2.2.7.2. Örneklerin Hazırlanması ve Jele Uygulanması

Örnekler ve standartlar jele uygulanmadan önce termoblok'ta, 95°C sıcaklıkta standart çözelti 5 dakika, örnek çözeltisi 10 dakika olacak şekilde bekletilmiştir. Bu işlemle proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Daha sonra jel üzerindeki tarak çıkartılarak Hamilton şırıngası yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez küvetine jeli yerleştirirken tamamen tampon içerisinde kalmasına dikkat edilmiştir. Proteinlerin ayrışma işlemini gerçekleştirmek için güç kaynağı jele 100 V 30 mA elektrik akımı verecek şekilde ayarlanmıştır.

2.2.7.3. Jelin Boyanması

Coomassie Brilliant mavisi kullanılarak, cam plakalar arasından çıkartılan jelin boyama işlemi 70 rpm'de 10 dakika çalkalanarak gerçekleştirilmiştir. Bantlar görünür hale gelene kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Bu işlem sonucunda jel üzerinde görünen ilgili enzimler belirlenmiştir.

2.2.8. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivite Tayin Metotları

2.2.8.1. Hidrataz Aktivitesi

Kullanılan Çözeltiler:

Doygun CO₂ çözeltisi (substrat): Buz banyosunda, 250 mL saf sudan 45 dakika boyunca CO₂ gazı geçirilerek hazırlanmıştır.

2,5 mM HEPES tamponu (pH:8,8): 6,51 g HEPES 800 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 8,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

BCA enzim çözeltisi (0,1 mg/mL): 1 mg BCA, 10 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

0.025 M Sülfanilamid çözeltisi: 215 mg sülfanilamid 50 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır.

0.005 M Asetazolamid çözeltisi: 55 mg asetazolamid 50 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır.

Karbonik anhidraz enzimi saflaştırıldıktan sonra tüplerde toplanan eluatlarda ve diğer inhibisyon çalışmalarında enzim aktivitesi belirlenirken hidrataz aktivite ölçümü yapılmıştır. Modifiye edilen Wilbur-Anderson metodu kullanılmıştır (Wilbur ve Anderson, 1948; Maren, 1960). Enzimin aktivitesi, 0 °C' de pH düşüşünün takibiyle potansiyometrik metotla ölçülmüştür. Metodun prensibi, ortamda substrat olarak bulunan karbondioksitin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ nın ortamın pH' sını 8,8'den 7,0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_e) arasındaki farkın, (t_e)'ye bölünmesiyle belirlenmiştir.

$$t_0 = ((t_0 - t_e) / t_e)$$

2.2.8.1.1. Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

17 farklı bitkinin, 3 farklı çözücüde (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) hazırlanan ekstraktlarının BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyonuna potansiyometrik metotla bakılmıştır. Tablo 5' te gösterilen çözeltiler kullanılarak pipetleme yapılmıştır. Reaksiyonun soğuk ortamda gerçekleşmesi için reaksiyon tüpü buz banyosu içerisine yerleştirilmiştir. Gaz kaçağı olmaması için parafilm ile pH-metrenin elektrodunun çevresi iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine yerleştirilmiştir. Reaksiyon substrat ilavesi ile (CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi) başlatılmıştır. Reaksiyon boyunca CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi ve reaksiyonun olduğu tüpler buzlu su içinde bekletilmiştir. pH' nın 8,8'den 7,0'a düşmesi için geçen süre kronometre ile takip edilmiştir. Tüm ölçümler en az iki kez tekrarlanıp, geçen sürelerin ortalaması alınmıştır.

Tablo 5. Bitki ekstraktlarının BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi kullanılan maddeler

Kullanılan Maddeler	Numune (µL)	Numune Körü (µL)	Kontrol (µL)
Hepes tamponu (2,5 mM; pH 8,8)	2400	2400	2400
İnhibitör (Bitki Ekstraktı)	50	50	-
İnhibitör çözücüsü	-	-	50
Saf su	-	50	-
Enzim çözeltisi (0,1 mg/mL)	50	-	50
CO ₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi	2500	2500	2500
Toplam hacim	5000	5000	5000

Bu yöntemle bitki ekstraktlarının BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki % inhibisyonu hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Numune-Kontrol}}{\text{Numune Körü- Kontrol}} * 100 \quad (1)$$

2.2.8.1.2. Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Çalışmamızda, 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) 12 farklı konsantrasyonda (% 0, %1, %2, %4, %6, %8, %10, %14, %18, %22, %26, %32) sığır CA (BCA) aktivitesi üzerine etkisine CA'nın hidrataz aktivite yöntemiyle ilk defa bakılmıştır. Tablo 6' da gösterilen çözeltiler kullanılarak pipetleme yapılmıştır. Reaksiyonun soğuk ortamda gerçekleşmesi için reaksiyon tüpü buz banyosu içerisinde tutulmuştur.. pH-metrenin elektrodunun çevresi parafilmle iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine gaz kaçağı olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Reaksiyon substrat ilavesi ile (CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi) başlatılmıştır. Reaksiyon boyunca CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi ve reaksiyonun olduğu tüpler buzlu su içinde bekletilmiştir. pH' nın 8,8' den 7,0' a düşmesi için geçen süre kronometre ile takip edilmiştir. Tüm ölçümler en az iki kez tekrarlanıp, geçen sürelerin ortalaması kullanılmıştır.

Bu yöntemle organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki % inhibisyonu hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(K-KK)-(N-NK)}{(K-KK)} * 100 \quad (2)$$

Numune = N

Numune Körü = NK

Kontrol = K

Kontrol Körü = KK

Tablo 6. Organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi kullanılan maddeler

Hidrataz	µL	%0	%1	%2	%4	%6	%8	%10	%14	%18	%22	%26	%32
Numune	Hepes Tamponu	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490
	Organik Çözücü	0	50	100	200	300	400	500	700	900	1100	1300	1600
	Saf su	1960	1910	1860	1760	1660	1560	1460	1260	1060	860	660	360
	Enzim	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Substrat	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Numune Körü	Hepes Tamponu	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490
	Organik Çözücü	0	50	100	200	300	400	500	700	900	1100	1300	1600
	Saf su	2010	1960	1910	1810	1710	1610	1510	1310	1110	910	710	410
	Enzim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Substrat	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Kontrol	Hepes Tamponu	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490
	Organik Çözücü	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Saf su	1960	1960	1960	1960	1960	1960	1960	1960	1960	1960	1960	1960
	Enzim	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	Substrat	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Kontrol Körü	Hepes Tamponu	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490	490
	Organik Çözücü	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Saf su	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010
	Enzim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Substrat	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500	2500

2.2.8.1.3. BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Doygun substrat konsantrasyonunda sığır eritrosit BCA enzimi için CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ölçümler hidrataz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplanmıştır.

2.2.8.1.4. Hidrataz Aktivite Tayin Metoduyla IC₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sülfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamidin %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonunda organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) tek konsantrasyonda (%10) sığır CA (BCA) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamid IC₅₀ konsantrasyonunda enzimi %50 inhibe ederken %10 konsantrasyonda organik çözücünün BCA aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Tablo 7' de gösterilen çözeltiler kullanılarak pipetleme yapılmıştır. Reaksiyonun soğuk ortamda gerçekleşmesi için reaksiyon tüpü buz banyosu içerisinde tutulmuştur. pH-metrenin elektrodunun çevresi parafilmle iyice sarılıp reaksiyon tüpünün içine gaz kaçağı olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Reaksiyon substrat ilavesi ile (CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi) başlatılmıştır. Reaksiyon boyunca CO₂ gazı ile doyurulmuş saf su çözeltisi ve reaksiyonun olduğu tüpler buzlu su içinde bekletilmiştir. pH' nın 8,8' den 7,0' a düşmesi için geçen süre kronometre ile takip edilmiştir. Tüm ölçümler en az iki kez tekrarlanıp, geçen sürelerin ortalaması kullanılmıştır.

Bu yöntemle IC₅₀ değerinde asetazolamid ve sülfanilamid varlığında % 10 konsantrasyonda organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki % inhibisyonu hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Numune-Kontrol}}{\text{Numune K\u00f6r\u00fc- Kontrol}} * 100 \quad (3)$$

Tablo 7. Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve s\u00fclfanilamid varlığında organik \u00e7\u00f6z\u00fc\u00e7lerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi \u00fczerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesinde kullanılan maddeler

Hidrataz		μL
Numune	Tampon (Hepes)	490
	Saf su	1410
	\u00d0nhibit\u00f6r	50
	Organik \u00c7\u00f6z\u00fc\u00e7 (%10)	500
	Enzim	50
	Substrat	2500
Numune K\u00f6r\u00fc	Tampon (Hepes)	490
	Saf su	1460
	\u00d0nhibit\u00f6r	50
	Organik \u00c7\u00f6z\u00fc\u00e7 (%10)	500
	Enzim	-
	Substrat	2500
Kontrol	Tampon (Hepes)	490
	Saf su	1410
	\u00d0nhibit\u00f6r \u00e7\u00f6z\u00fc\u00e7\u00fc	50
	Organik \u00c7\u00f6z\u00fc\u00e7 (%10)	500
	Enzim	50
	Substrat	2500
Kontrol K\u00f6r\u00fc	Tampon (Hepes)	490
	Saf su	1460
	\u00d0nhibit\u00f6r \u00e7\u00f6z\u00fc\u00e7\u00fc	50
	Organik \u00c7\u00f6z\u00fc\u00e7 (%10)	500
	Enzim	-
	Substrat	2500

2.2.8.2. Esteraz Aktivitesi

Kullanılan \u00c7\u00f6zeltiler:

3 mM *p*-nitrofenil asetat (substrat): 135 mg *p*-nitrofenil asetat 5 mL aseton i\u00e7inde \u00e7\u00f6z\u00fcl\u00fcp, magnetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılan 245 mL saf suya yavaşça damla damla ilave edilerek hazırlanmıştır.

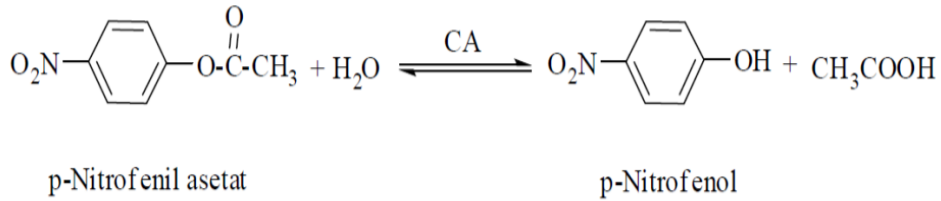
0.05 M Tris-SO₄ Tamponu (pH:7,4): 6,05 g tris(hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 1 M H₂SO₄ ile 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

BCA enzim çözeltisi (0,1 mg/mL): 1 mg BCA, 10 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

0.025 M Sülfanilamid çözeltisi: 215 mg sülfanilamid 50 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır.

0.005 M Asetazolamid çözeltisi: 55 mg asetazolamid 50 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır.

Bu metodun temeli, Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olmasına dayanmaktadır. Bu metoda göre Karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm' de absorbans veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir. *p*- nitrofenol ve *p*-nitrofenolat'ın her ikisi de 348 nm' de aynı absorbansı göstermektedir. Bundan dolayı fenolik OH grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong vd., 1966; Kandel vd., 1970; Landolfi vd., 1997).



Şekil 54. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi aracılığıyla *p*-Nitrofenil asetatın *p*-Nitrofenole dönüşüm reaksiyonu

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenil asetat (substrat) çözeltisi, günlük taze olarak hazırlanmıştır. Esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı substrat çözeltisini 3mM' dan daha konsantre hazırlamak mümkün değildir. Diğer organik çözücülere göre aseton, nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçilmiştir (Armstrong vd., 1966). 0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4 olan tampon çözeltisi ile enzim çözeltisinin tamponlanması sağlanmıştır (Kohn ve Wilchek, 1978).

Karbonik anhidraz enzimi saflaştırıldıktan sonra tüplerde toplanan eluatlarda ve diğer inhibisyon çalışmalarında enzim aktivitesi belirlenirken esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. 2 mL' lik küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için eluatların

aktivitesine bakılırken, reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre Tablo 8’ deki prosedür uygulanmıştır.

Tablo 8. Esteraz aktivitesi için 2 mL’lik kuvars küvetlerde kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH 7,4)	500	500
Enzim çözeltisi	-	150
Saf su	100	100
Enzim elusyon tamponu	150	-
<i>p</i> -Nitrofenil asetat	750	750
Toplam hacim	1500	1500

2.2.8.2.1. Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

17 farklı bitkinin, 3 farklı çözücüde (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) hazırlanan ekstraktlarının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyonuna esteraz aktivite tayin metoduyla bakılmıştır. Tablo 9’ da gösterilen çözeltiler kullanılarak pipetleme yapılmıştır.

Tablo 9. Bitki ekstraktlarının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesinde kullanılan maddeler

Kullanılan Maddeler	Numune (µL)	Numune Körü (µL)	Kontrol (µL)	Kontrol Körü (µL)
Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH 7,4)	550	550	550	550
Enzim çözeltisi	150	-	150	-
Saf su	-	150	-	150
İnhibitör	50	50	-	-
İnhibitör Çözücüsü	-	-	50	50
<i>p</i> -Nitrofenil asetat	750	750	750	750
Toplam hacim	1500	1500	1500	1500

% inhibisyon hesaplamasında, kör çıkarılmış değerler kullanılmıştır. Üç paralel çalışılıp, ortalama absorbans değerleri kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Kullanılan standartların ve bitki ekstraktlarının % inhibisyonunun belirlenmesi için hesaplamada kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol absorbansı} - \text{Numune absorbansı}}{\text{Kontrol absorbansı}} * 100 \quad (4)$$

2.2.8.2.2. Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Çalışmamızda, 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) 12 farklı konsantrasyonda (% 0, %1, %2, %4, %6, %8, %10, %14, %18, %22, %26, %32) sığır CA (BCA) aktivitesi üzerine etkisine CA'nın esteraz aktivite yöntemiyle ilk defa bakılmıştır. Tablo 10' da gösterilen çözeltiler kullanılarak pipetleme yapıldı.



Tablo 10. Organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesinde kullanılan maddeler

Esteraz	µL	%0	%1	%2	%4	%6	%8	%10	%14	%18	%22	%26	%32
Numune	Tris Tamponu	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
	Organik Çözücü	0	15	30	60	90	120	150	210	270	330	390	480
	Saf su	480	465	450	420	390	360	330	270	210	150	90	0
	Enzim	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	Substrat	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Numune Körü	Tris Tamponu	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
	Organik Çözücü	0	15	30	60	90	120	150	210	270	330	390	480
	Saf su	630	615	600	570	540	510	480	420	360	300	240	150
	Enzim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Substrat	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Kontrol	Tris Tamponu	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
	Organik Çözücü	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Saf su	480	480	480	480	480	480	480	480	480	480	480	480
	Enzim	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	Substrat	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
Kontrol Körü	Tris Tamponu	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120
	Organik Çözücü	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Saf su	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630	630
	Enzim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Substrat	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750

Bu yöntemle organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki % inhibisyonu hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(K-KK)-(N-NK)}{(K-KK)} * 100 \quad (5)$$

Numune = N

Numune Körü = NK

Kontrol = K

Kontrol Körü = KK

2.2.8.2.3. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Doygun substrat konsantrasyonunda sığır eritrosit BCA enzimi için CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ölçümler esteraz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilip, bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplanmıştır.

2.2.8.2.4. Esteraz Aktivite Tayin Metoduyla IC₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sülfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Esteraz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamidin %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonundayken organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) tek konsantrasyonda (%10) sığır CA (BCA) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamid IC₅₀ konsantrasyonunda enzimi %50 inhibe ederken %10 konsantrasyonda organik çözücünün BCA aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

Tablo 11'de gösterilen çözeltiler kullanılarak pipetleme yapılmıştır. Bu yöntemle IC₅₀ değerinde asetazolamid ve sülfanilamid varlığında % 10 konsantrasyonda organik

çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki % inhibisyonu hesaplanırken aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(K-KK)-(N-NK)}{(K-KK)} * 100 \quad (6)$$

Numune = N

Numune Körü = NK

Kontrol = K

Kontrol Körü = KK

Tablo 11. Esteraz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesinde kullanılan maddeler

Esteraz		µL
Numune	Tampon (Tris)	120
	Saf su	280
	İnhibitör	50
	Organik Çözücü (%10)	150
	Enzim	150
	Substrat	750
	Numune Körü	Tampon (Tris)
	Saf su	430
	İnhibitör	50
	Organik Çözücü (%10)	150
	Enzim	-
	Substrat	750
Kontrol	Tampon (Tris)	120
	Saf su	280
	İnhibitör çözücüsü	50
	Organik Çözücü (%10)	150
	Enzim	150
	Substrat	750
Kontrol Körü	Tampon (Tris)	120
	Saf su	430
	İnhibitör çözücüsü	50
	Organik Çözücü (%10)	150
	Enzim	-
	Substrat	750

2.2.9. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini

Sulu ekstraktları hazırlanan bitki numunelerinin toplam fenolik içeriği, literatürde sıklıkla tercih edilen antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden biri olan Folin-Ciocalteu ile belirlenmiştir. Gallik asit (GA) ve kateşin (CA) standartlarının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Numunelerin fenolik madde içerikleri, standartların grafiklerinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak, 765 nm’de, mL numune başına eşdeğer miktarda mikrogram (μg) gallik asit veya kateşinin artan konsantrasyonlarına karşılık gelen değerler grafiğe geçirilerek belirlenmiştir.

2.2.10. On-line HPLC-Biyoaktivite Çalışmaları

2.2.10.1. On-line HPLC-Frap Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi

Kullanılan Çözeltiler:

FRAP reaktifinin hazırlanışı:

100 mM HCl çözeltisi: 82 μL der. (%37’lik) HCl 10 mL saf suda çözülmüştür.

A: (300 mM Asetat tamponu): 0,345 μL der. (%99,5’lik) asetik asite 12 mL metanol ve 8 mL saf su eklenip, 0,05 M NaOH çözeltisi ile pH 3,6’ya ayarlanmıştır.

B: (10 mM TPTZ çözeltisi): 0,0063 g TPTZ önce 800 μL 100 mM HCl’de çözülüp, sonra hacim metanolle 2 mL’ye tamamlanmıştır.

C: (20 mM FeCl₃ çözeltisi): 0,0065 g FeCl₃ önce 800 μL saf suda çözülüp, sonra hacim metanolle 2 mL’ye tamamlanmıştır.

Bir beherin içerisinde A çözeltisi manyetik karıştırıcıda karıştırırken, sırayla B ve C çözeltileri yavaşça eklenip, sarı-kahverengi bir çözelti elde edilmiştir. Reaktifin ışıktan bozulmaması için çözelti şırıngaya konulduktan sonra da alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Biyoaktivite Araştırma Laboratuvarımızda (BAL) daha önce geliştirilen On-line HPLC-Frap antioksidan aktivite tayin yöntemi (Arslan-Burnaz vd., 2017) sumak, karanfil, kantaron ve adaçayının asetonitrilli ekstraktlarına uygulanmıştır. DAD sayesinde 8 farklı dalga boyunda (240, 254, 260, 274, 280, 308, 324, 348 nm) fenolik bileşiklere ait pikleri içeren kromatogramlar, UV dedektör ile de 595 nm’de bu bileşiklere ait FRAP antioksidan

piklerini veren kromatogramlar elde edilmiştir. Agilent ChemStation programı kullanılarak alanlar ve pik yükseklikleri hesaplanmıştır. FRAP reaktifi ile reaksiyona giren fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları (RT) UV dedektöre giderken reaksiyon süresince bir süre daha alıkonulmuş oldukları için 595 nm'deki alıkonma zamanları 280 nm'deki alıkonma zamanlarından daha büyüktür

2.2.10.2. On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yöntemi

2.2.10.2.1. On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yöntemi Geliştirilmeden Önce Bazı Parametrelerin BCA Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi

2.2.10.2.1.1. BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

pH'sı 7,4 olan 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM) Tris-SO₄ tamponunun enzim aktivitesi üzerine etkisine esteraz aktivite tayin yöntemiyle bakılmıştır. Aynı zamanda her bir tampon konsantrasyonunun 7 farklı sıcaklık değerinde (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 °C) enzim aktivitesine bakılarak enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.2.10.2.1.2. BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

7 farklı sıcaklık değerinde (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 °C) enzim aktivitesinin etkilenmediği görülmüştür. Sıcaklık aralığı değiştirilerek pH' sı 7,4 olan tek tampon konsantrasyonunda (100 mM) 12 farklı sıcaklık değerinde (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 °C) çalışılıp, enzimin optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Enzimin optimum sıcaklık değeri belirlendikten sonra hem optimum sıcaklık değerinde hem de 37 °C'de (vücut sıcaklığında) 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM) Tris-SO₄ tamponunun enzim aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır.

HPLC' de polar ve iyonlaşabilen bileşiklerin ters faz ayırımında çözücü sisteminin yanlış seçimi, kuyruklanmalarla ve tekrarlanamayan alıkonma zamanlarıyla sonuçlanabilir. Bu sebeple, geliştirilecek olan on-line HPLC -CA inhibitör belirleme yönteminde biyokimyasal dedeksiyonda kullanılacak tamponun, çözücü sisteminde kullanılan asit

yüzdesini nötralize edebilecek konsantrasyonda olması gerekir. Aksi takdirde enzim aktivitesi çözücü sisteminden etkilenerek inhibisyona sebep olabilir. Bu sebeple formik asit ve asetik asit kullanılarak enzim aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır.

2.2.10.2.1.3. BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Farklı yüzdelerde hazırlanan asetik asitin (%0,5; %1; %1,5; %2; %2,5; %3; %3,5; %4) pH değerleri pH metre ile ölçülmüştür ve daha sonra enzimin optimum pH değerini belirlemek için HPLC gradient programındaki çözücü oranları ve akış sistemleri esteraz aktivitesine uyarlanarak optimum pH değeri belirlenmiştir.

2.2.10.2.1.4. Substrat Çözeltisinin Bekleme Süresinin Bozunmaya Etkisi

Karbonik anhidrazın esteraz aktivite tayin yönteminde kullanılan substratı olan *p*-nitrofenil asetat zamanla bozduğundan absorbans değişimine bakılmıştır. Hazırlanan substrat 16 ve 32 saat sonrasında 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 seyreltilerek absorbansları spektrofotometrede okunmuştur.

2.2.10.2.2. On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi

HPLC, klasik kolon kromatografisinden türetilmiştir ve bugün ilaç endüstrisinde kullanılan en önemli araçlardan birisidir. Günümüzde HPLC ile metod geliştirmenin birçok farklı stratejileri kullanılmaktadır.

Tezimde, afinite kromatografisiyle sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA), ve insan CAI ve CAII izoenzimleri saflaştırılarak yeni bir on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yöntemi ilk defa geliştirilerek biyoaktif bitki ekstraktlarına uygulanmıştır.

2.2.10.2.2.1. HPLC-DAD-UV-CA İnhibitör Belirleme Yöntem Koşulları

HPLC-DAD-UV analizleri yapılırken Agilent (Waldbronn, Almanya)'in 1100 serisine ait 4'lü çözücü pompası, gaz gidericisi (degasser) ve ultra viyole dedektörü (UV) ile 1200 serisine ait diyot serili dedektörü (DAD) kullanılmıştır. Enstrüman Chem Station

programı ile (Agilent) kontrol edilmiştir. Numune enjeksiyonunda Hamilton şırınga (25 µL) kullanılmıştır. Yürütmelerde enjeksiyon hacmi 20 µL' dir. Tüm analizlerde bir Hichrom C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; UK) kullanılmıştır.

Hem on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yöntemi geliştirilirken kullanılan standartlar, hem de bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşikleri belirleme de kullanılan standartlara ait piklerin birbirinden mümkün olabildiğince ayrılabilmesi için uygun gradient program (metot) geliştirilmiştir. Bitki ekstraktlarındaki bileşenlere ait piklerin ve CA inhibisyon yöntemi kullanılarak inhibisyon pik alanlarının eş zamanlı olarak belirlenebilmesi için yeni bir on-line HPLC-DAD-UV-CA yöntemi geliştirilmiş ve yüksek karbonik anhidraz inhibisyon etkisine sahip oldukları belirlenen bitki ekstraktlarından birkaçı seçilip, geliştirilen yöntem bu bitki ekstraktlarına uygulanmıştır.

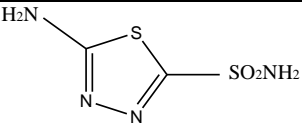
2.2.10.2.2.2. HPLC ile On-line CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi İçin Standartların Belirlenmesi

CA inhibisyonu on-line HPLC' ye uyarlanırken asetazolamid, sülfanilamid gibi CA' nın standart inhibitörleri ve literatürde yer alan CA inhibisyonu gösteren fenolik bileşikler kullanılarak yöntem optimize edilmiştir. Kullanılan standartlar Tablo 12' de listelenmiştir.

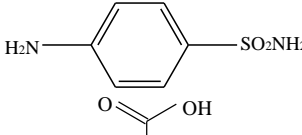
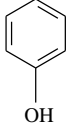
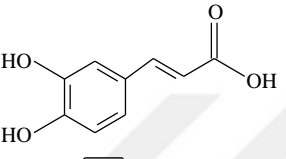
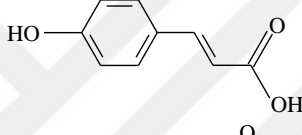
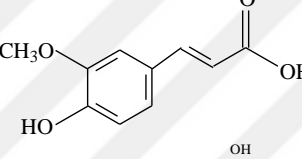
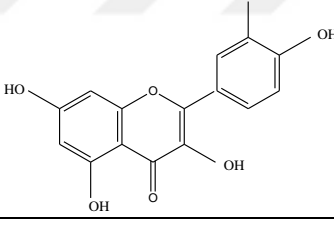
2.2.10.2.2.3. Bitki Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşik Analizi için Standartların Belirlenmesi

Bu aşamada, literatürde yer alan fenolik standartlara olabildiğince ulaşılmıştır. Kullanılan standartlar Tablo 13' de ve spektrumları Tablo 14' de listelenmiştir.

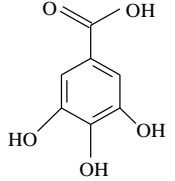
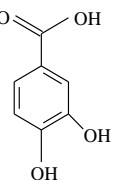
Tablo 12. HPLC ile on-line CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesinde kullanılan standartlar

Standartın Adı	Standartın Molekül Şekli	Standartın Molekül Ağırlığı (g/mol)	DAD'da Maksimum Dalga Boyu (nm)
1 Asetazolamid		222,24	266

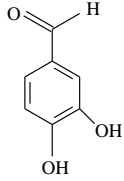
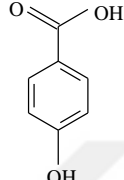
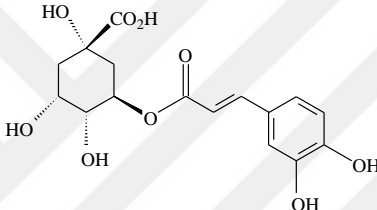
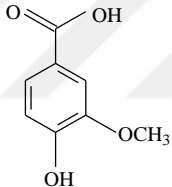
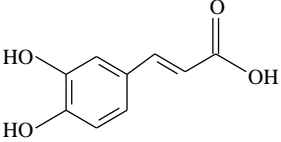
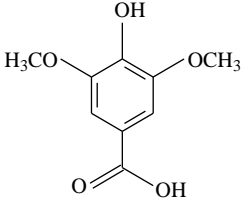
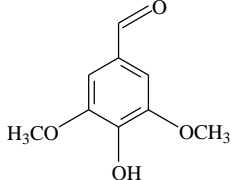
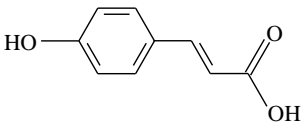
Tablo 12'nin devamı

Standardın Adı	Standardın Molekül Şekli	Standardın Molekül Ağırlığı (g/mol)	DAD'da Maksimum Dalga Boyu (nm)
2 Sülfanilamid		172,20	260
3 p-OH Benzoik asit		138,12	260
4 Kafeik asit		180,10	324
5 p-Kumarik asit		164,16	308
6 Ferulik asit		194,19	324
7 Kuersetin		302,236	372

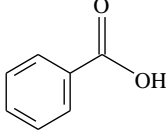
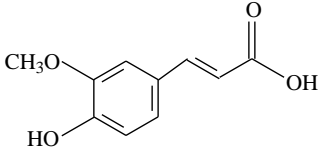
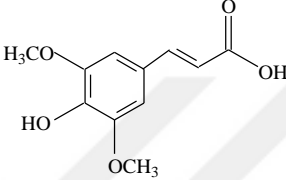
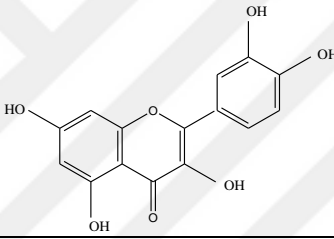
Tablo 13. Bitki ekstraktlarındaki fenolik bileşik analizinde kullanılan standartlar

Standardın adı	Standardın molekül şekli	Standardın molekül ağırlığı (g/mol)	DAD'da maksimum dalga boyu (nm)
1 Gallik asit		170,12	272
2 Protokatekuik asit		154,12	260

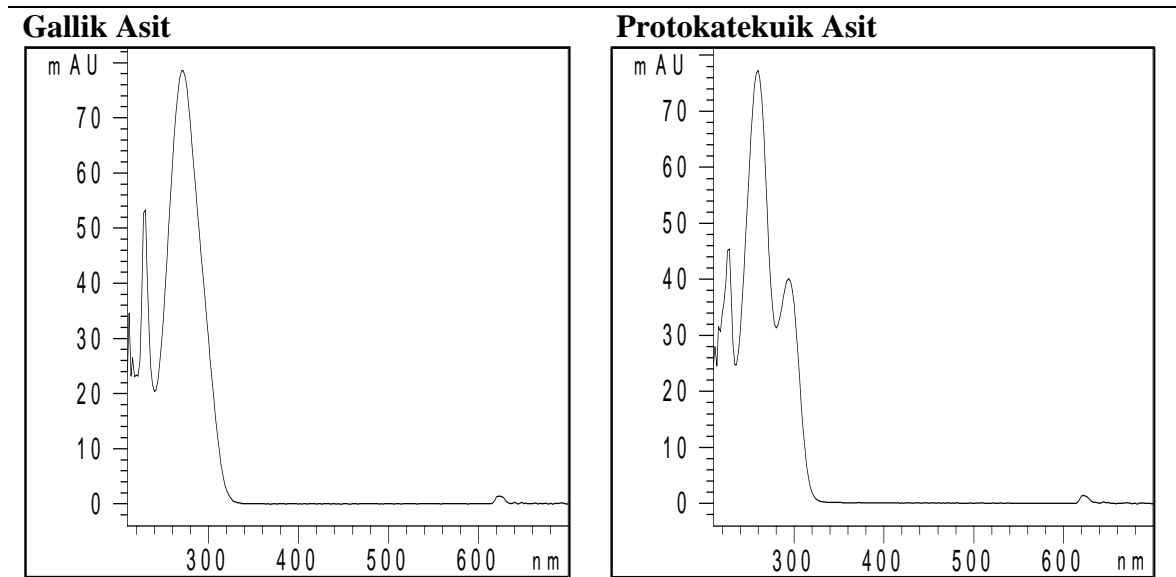
Tablo 13'ün devamı

Standardın adı	Standardın molekül şekli	Standardın molekül ağırlığı (g/mol)	DAD'da maksimum dalga boyu (nm)
3 Protokatekual dehit		138,12	280
4 <i>p</i> -OH Benzoik asit		138,12	256
5 Klorojenik asit		168,15	326
6 Vanilik asit		354,17	260
7 Kafeik asit		180,10	324
8 Siringik asit		198,17	274
9 Siringaldehit		182,18	308
10 <i>p</i> -Kumarik asit		164,16	310

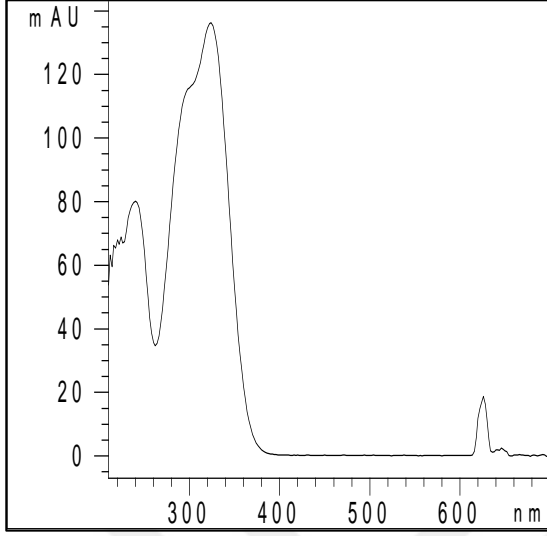
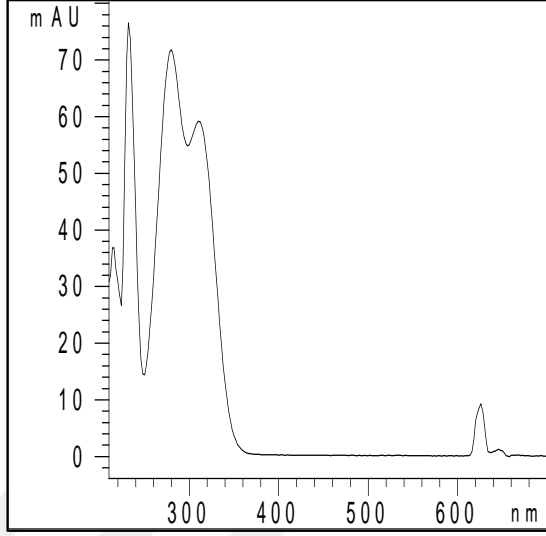
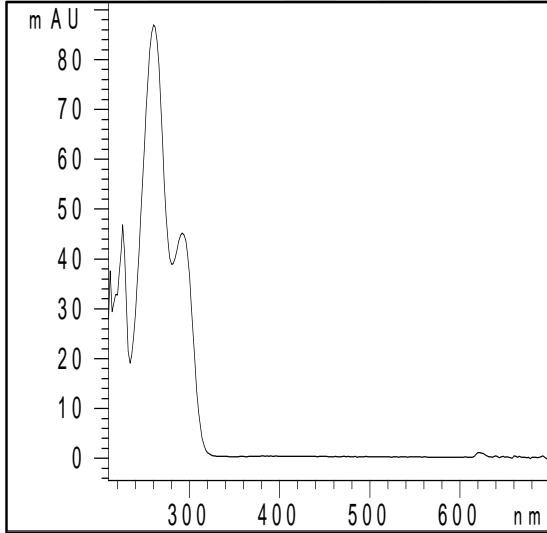
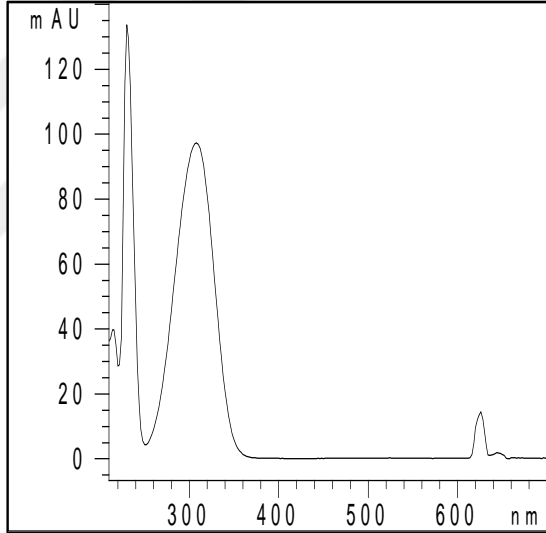
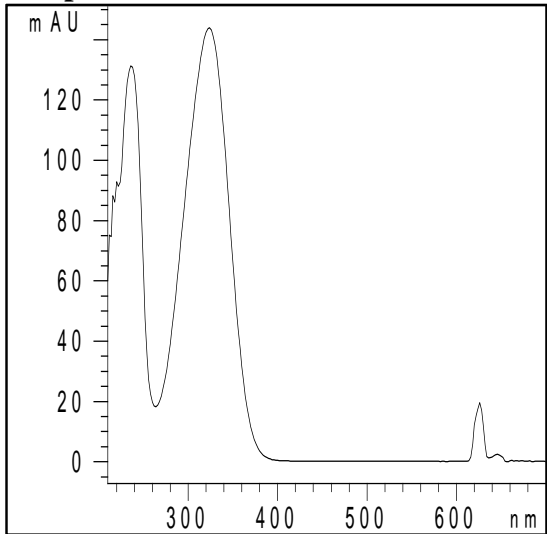
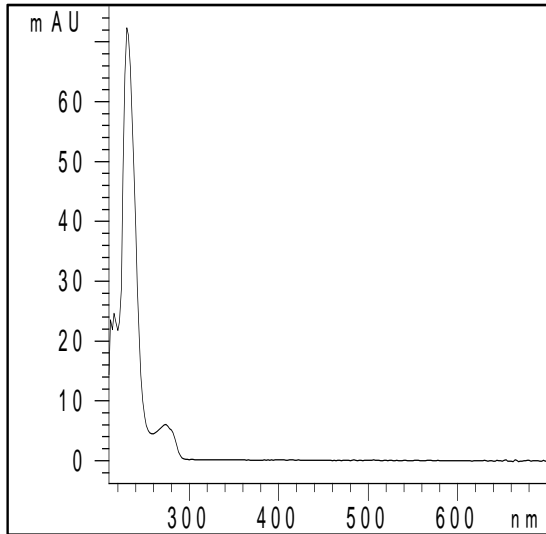
Tablo 13'ün devamı

Standardın adı	Standardın molekül şekli	Standardın molekül ağırlığı (g/mol)	DAD'da maksimum dalga boyu (nm)
11 Benzoik asit		122,12	234
12 Ferulik asit		194,19	322
13 Sinapik asit		224,21	324
14 Kuersetin		302,23	372

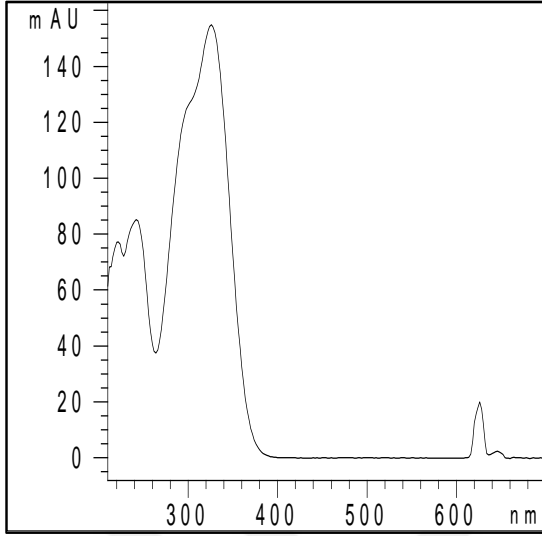
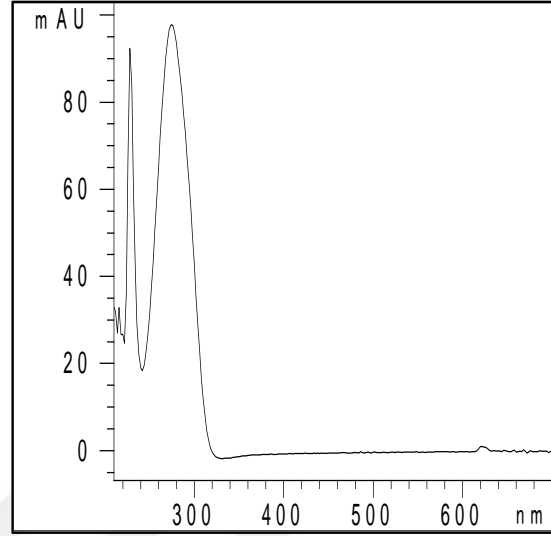
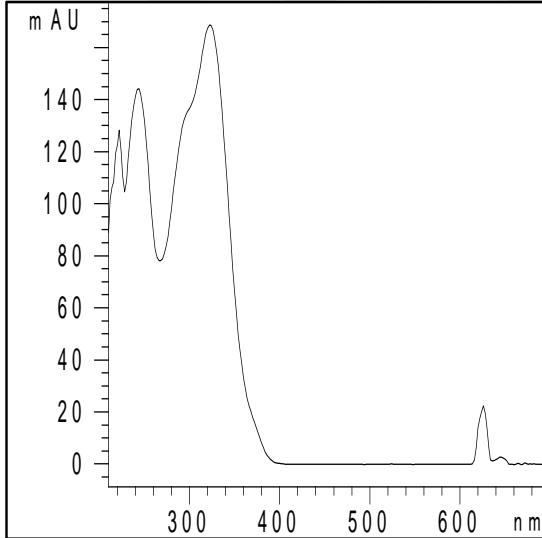
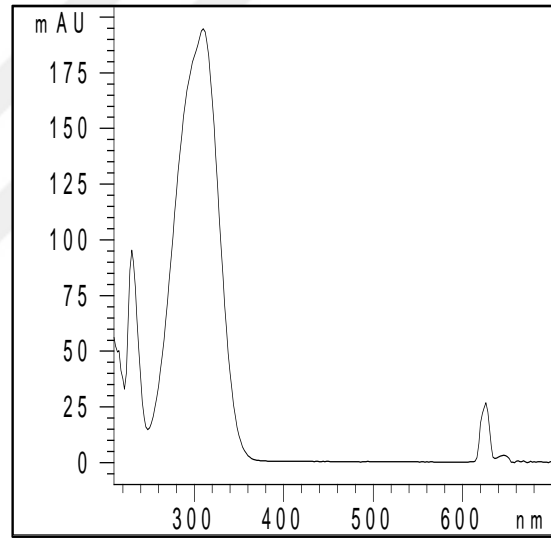
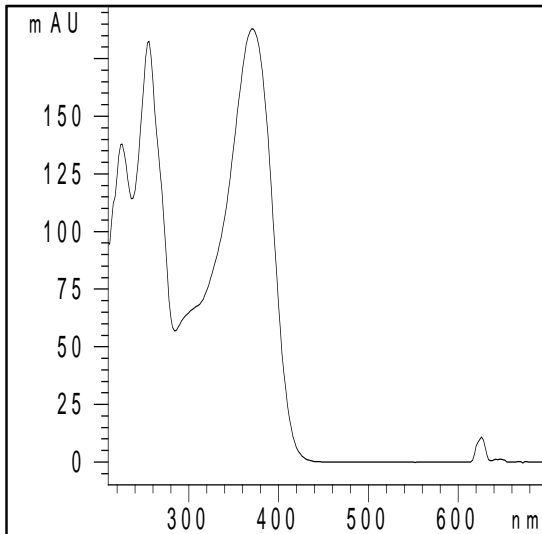
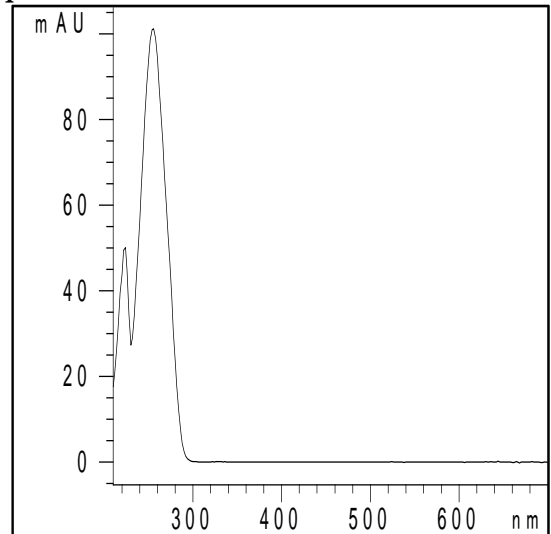
Tablo 14. Kullanılan standartların spektrumları



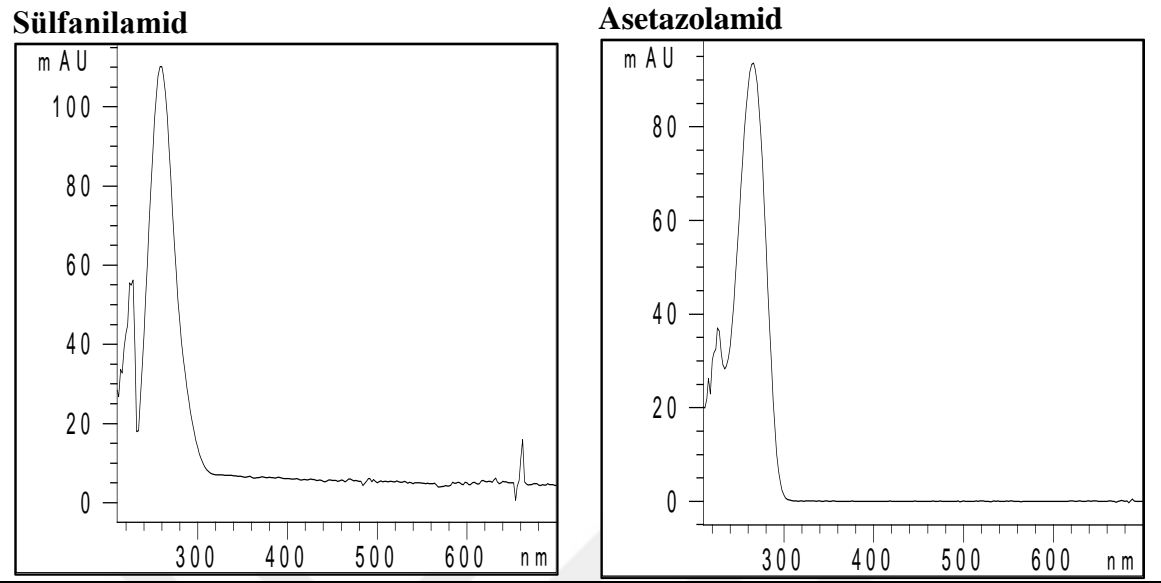
Tablo 14'ün devamı

Protokatekualdehit**Kafeik Asit****Vanilik Asit****Siringaldehit****Sinapik Asit****Benzoik Asit**

Tablo 14'ün devamı

Klorojenik Asit**Siringik Asit*****p*-Kumarik Asit****Ferulik Asit****Kuersetin*****p*-OH Benzoik Asit**

Tablo 14'ün devamı



2.2.10.2.2.4. Analiz Örneğinin Hazırlanması

Standartların stok çözeltileri 10 mM, 2 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. CA' nın standart iki inhibitörü olan asetazolamid ve sülfanilamid hazırlanırken stok çözeltileri %100 asetonitrilde çözülüp, istenen konsantrasyona seyreltmeler %100 asetonitrille yapıldığı zaman, HPLC' deki yürütmelerinde pik yarılmaması gözlemlenmiştir. Pik yarılmamasının olmaması için hareketli fazın kompozisyonu ile enjeksiyonu yapılacak numunenin çözücüsü uyumlu olmalıdır. Bu yüzden asetazolamid ve sülfanilamidin stok çözeltileri istenilen konsantrasyona seyreltilirken %95 H₂O-%5 asetonitril kullanılmıştır. Elajik asit ve kuersetinin stok çözeltileri %100 metanolde çözülmüştür. İstenilen konsantrasyona seyreltmeleri %40 metanol- H₂O ile yapılmıştır. Bu standartlar dışında tüm standartların tartılan miktarları önce bir miktar metanolde çözülmüş, sonra son hacim %40 metanol- H₂O olacak şekilde ultra saf su ile istenilen hacme tamamlanmıştır. İstenilen konsantrasyona seyreltmeleri yine %40 metanol- H₂O ile yapılmıştır.

HPLC sisteminde, analizi yapılacak her bir bitkinin ekstraktları üç farklı çözücüde (%100 H₂O, %40 asetonitril-H₂O, %40 metanol- H₂O) hazırlanmıştır. HPLC' deki yürütmelerinden önce 0,45 µm gözenek boyutuna sahip tek kullanımlık şırınga filtrelerinden geçirilmiş, sonrasında numuneler kendi çözücülerıyla gerektiği kadar seyreltilmiş ve HPLC sistemine 20 µL enjeksiyon yapılarak yürütülmüştür.

Tablo 15. Standartların stok çözeltilerinin hazırlanmasında yararlanılan veriler

	Standardın adı	Molekül Ağırlığı	10 mM, 2 mL	
			Tartılan Miktar (mg)	mg/mL Eşdeğeri
1	Gallik asit	170,12	3,402	1,701
2	Protokatekuik asit	154,12	3,082	1,541
3	p-OH Benzoik asit	138,12	2,762	1,381
4	Vanilik asit	168,15	3,363	1,682
5	Kafeik asit	180,10	3,602	1,801
6	Siringaldehit	182,18	3,644	1,822
7	Sinapik asit	224,21	4,484	2,242
8	Benzoik asit	122,12	2,442	1,221
9	Protokatekualdehit	138,12	2,762	1,381
10	Klorojenik asit	354,17	7,083	3,542
11	Siringik asit	198,17	3,963	1,982
12	p- Kumarik asit	164,16	3,283	1,642
13	Ferulik asit	194,19	3,884	1,942
14	Kuersetin	302,23	6,044	3,022

2.2.10.2.2.5. Kromatografik Ayırma Üzerine Mobil Faz İçeriğinin ve Akış Hızının Etkisi

İyonik analitlerin ters faz kromatografisi ile metod geliştirilmesinde, analitin alıkonma zamanı üzerinde pH' nın etkisi, kullanılan tamponun türü, konsantrasyonu, organik modifikatördeki çözünürlüğü ve dedeksiyon üzerine etkisinin göz önünde bulundurulması önemlidir. HPLC' de polar ve iyonlaşabilen bileşiklerin ters faz ayırımında çözücü sisteminin yanlış seçimi, kuyruklanmalarla ve tekrarlanamayan alıkonma zamanlarıyla sonuçlanabilir.

Kromatografik ayırma üzerine mobil faz içeriğinin ve akış hızının etkisini görebilmek için, HPLC ile on-line CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesinde kullanılan standartların (asetazolamid, sülfanilamid, p-OH benzoik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, kuersetin) her birinin 1mM olduğu standart karışımlar mobil faz 0,5 mL/dk akış hızındayken mobil faz içeriğindeki % asetik asit oranı değiştirilerek (%0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5) yürütülmüştür. DAD 280 nm' de ve UV 280 nm' deki alıkonma zamanları ve bant genişliği grafiğe geçirilmiştir.

2.2.10.2.2.6. HPLC Çözücü Sistemi

HPLC sisteminde metod geliştirirken, hareketli fazın bileşiminin aşamalı olarak değiştiği gradient elusyon kullanılmıştır. Defalarca hem mobil faz içeriği, hem de akış hızları değiştirilerek yöntemin geliştirilmesi sağlanmıştır Polaritede farklılık gösteren 4 farklı çözücü sistemi kullanılmıştır. Bu çözücüler aşağıdaki gibidir:

Tablo 16. HPLC’de çözücü sistemi

Hareketli Faz	Hareketli Faz İçeriği
A şişesi	%0,1’lik asetik asit- su
B şişesi	%50-50 asetonitril-su içinde %0,1 asetik asit
C şişesi	%100 HPLC gradient kalitesinde metanol
D şişesi	%100 HPLC gradient kalitesinde asetonitril

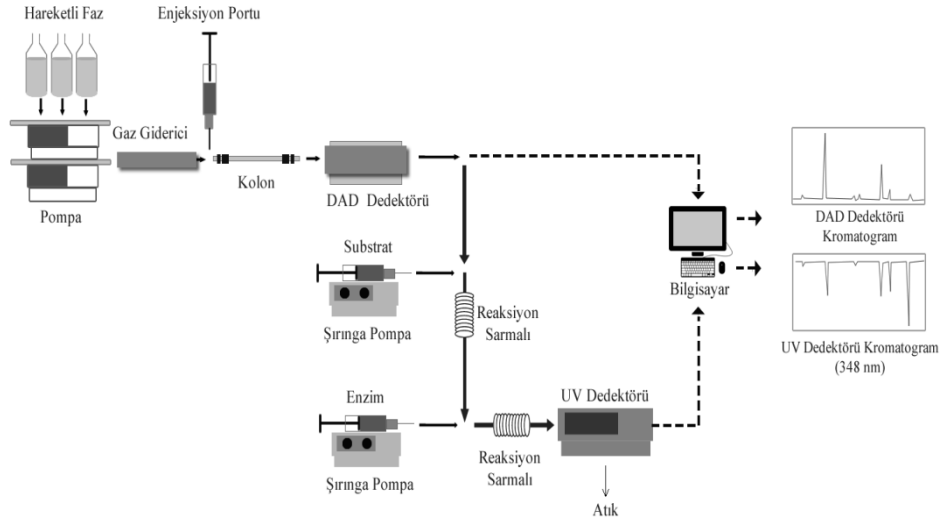
C şişesindeki çözücü yıkama çözeltisi olarak kullanılmıştır. Yürütmelerde A, B ve D şişeleri kullanılmıştır.

Hareketli fazı oluşturan çözeltiler (A, B ve D) farklı zamanlarda farklı yüzdelerle sisteme verilerek fenolik standartlara ait piklerin birbirlerinden olabildiğince ayrılabilmesi ve eş zamanlı olarak CA inhibisyonlarının belirlenmesi için uygun gradient programı (metot) geliştirilmiştir. Uygulanan gradient programı Tablo 17’ de, geliştirilen on-line HPLC-CA inhibitör belirleme sistemi (RP-HPLC-DAD-UV) Şekil 55’ de verilmiştir.

Tablo 17. Fenolik bileşiklerin HPLC’de ayrılmasında kullanılan hareketli faz gradient programı

	Zaman (dk)	%A Çözücüsü	%B Çözücüsü	%D Çözücüsü	Akış Hızı (mL/dk)	Maksimum Basınç (bar)
1	0,00	90,0	10,0	0,0	0,500	275
2	28,00	50,0	50,0	0,0	0,500	275
3	32,00	10,0	90,0	0,0	0,500	275
4	35,00	0,0	20,0	80,0	0,500	275
5	42,00	0,0	20,0	80,0	0,500	275
6	44,00	90,0	10,0	0,0	0,500	275
7	45,00	90,0	10,0	0,0	0,500	275

C çözücüsü, numuneler arası yürütmelerde uygulanan yıkama programında kullanılmıştır.



Şekil 55. Geliştirilen on-line HPLC-CA inhibitör belirleme sistemi (RP-HPLC-DAD-UV)

Geliştirilen yöntemle birlikte DAD sayesinde 8 farklı dalga boyunda (280, 254, 260, 274, 240, 266, 324, 348) fenolik bileşiklere ait pikleri içeren kromatogramlar ve 3D spektrumları elde edilmiştir. UV dedektör ile de 348 nm’de bu bileşiklere ait CA inhibisyon piklerini veren kromatogramlar elde edilmiştir. CA inhibisyon piklerine ait alanlar ve pik yükseklikleri Agilent ChemStation programı kullanılarak hesaplanabilmektedir.

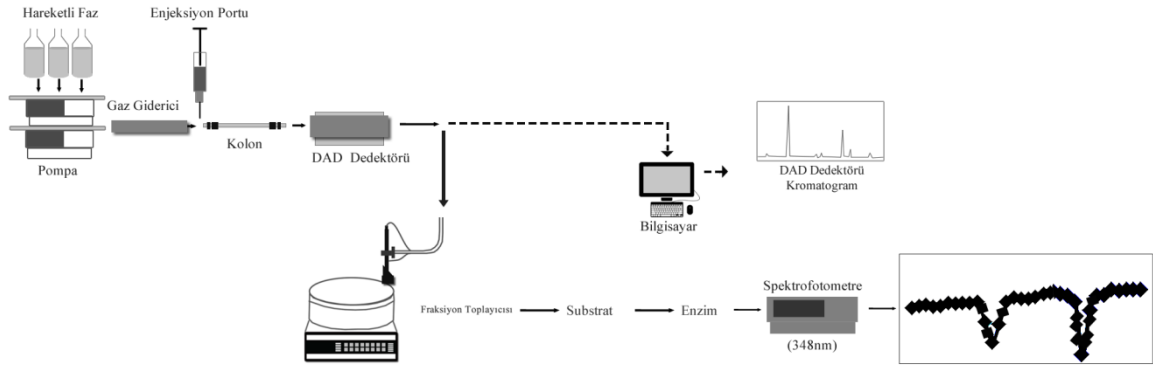
Biyokimyasal dedektördeki (UV) piklerin RT’leri DAD dedektördeki piklerin RT’lerinden daha büyük olmasının nedeni şırınga pompalarla sisteme gönderilen enzim ve substrat ile reaksiyona giren fenolik bileşikler ikinci bir dedektöre (UV) giderken reaksiyon süresince bir süre daha alıkonulmuş olmalarından kaynaklıdır.

2.2.10.2.3. Kombine HPLC-DAD Spektrofotometrik CAI Yöntemi

Kombine HPLC-DAD analizleri yapılırken Agilent (Waldbronn, Almanya)’in 1100 serisine ait 4’lü çözücü pompası, gaz gidericisi (degasser) ile 1200 serisine ait diyot serili dedektörü (DAD) kullanılmıştır. Enstrüman Chem Station programı ile (Agilent) kontrol edilmiştir. Numune enjeksiyonunda Hamilton şırınga (25 µL) kullanılmıştır. Yürütmelerde enjeksiyon hacmi 20 µL’dir. Tüm analizlerde bir Hichrom C18 kolon (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm partikül; UK) kullanılmıştır.

Numune bileşenleri kolonda ayrıldıktan sonra DAD dedektör sayesinde 8 farklı dalga boyunda (280, 254, 260, 274, 240, 266, 324, 348) fenolik bileşiklere ait pikleri içeren

kromatogramlar elde edilmiştir. DAD detektörden çıkan tübingin ucu fraksiyon toplayıcısına bağlanarak eluatlar toplanıp, ağızları bir parafilm ile kapatılmıştır. Sonrasında klasik esteraz inhibisyon çalışması yapılarak spektrofotometrik olarak 348 nm’ de okuma yapılmıştır. Bu yöntem sayesinde on-line yöntemdeki reaksiyon sarmalındaki süre kısıtlaması (2-3 dk) ortadan kaldırılmıştır. Toplanan fraksiyonlar için istenen herhangi bir reaksiyon süresi belirlenebilmektedir. Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI belirleme sistemi Şekil 56’ da verilmiştir.



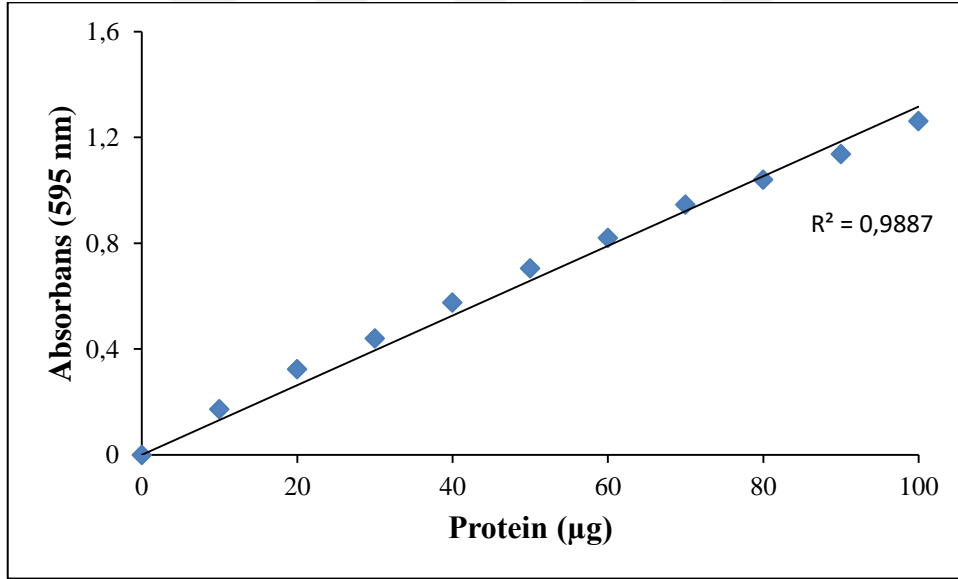
Şekil 56. Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI belirleme sistemi

3. BULGULAR

3.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

3.1.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Elue edilen hCAI, hCA II ve BCA enzimlerinde, Bradford metoduyla protein tayini yapıldı. Protein tayini; 100 µL enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Bradford metoduyla yapılan kantitatif protein tayininde standart grafik referans alınarak (Şekil 57), saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları hesaplanmıştır. Ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları standart grafiğin denkleminde hesaplanmıştır.

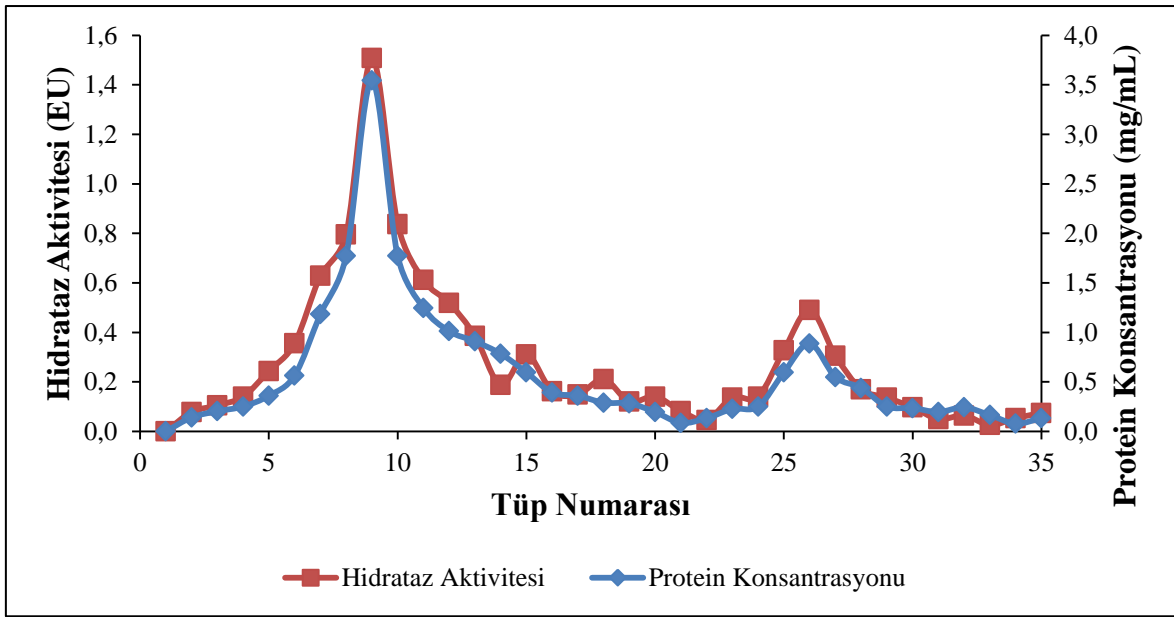


Şekil 57. Bradford metoduyla protein tayini için kullanılan standart grafik

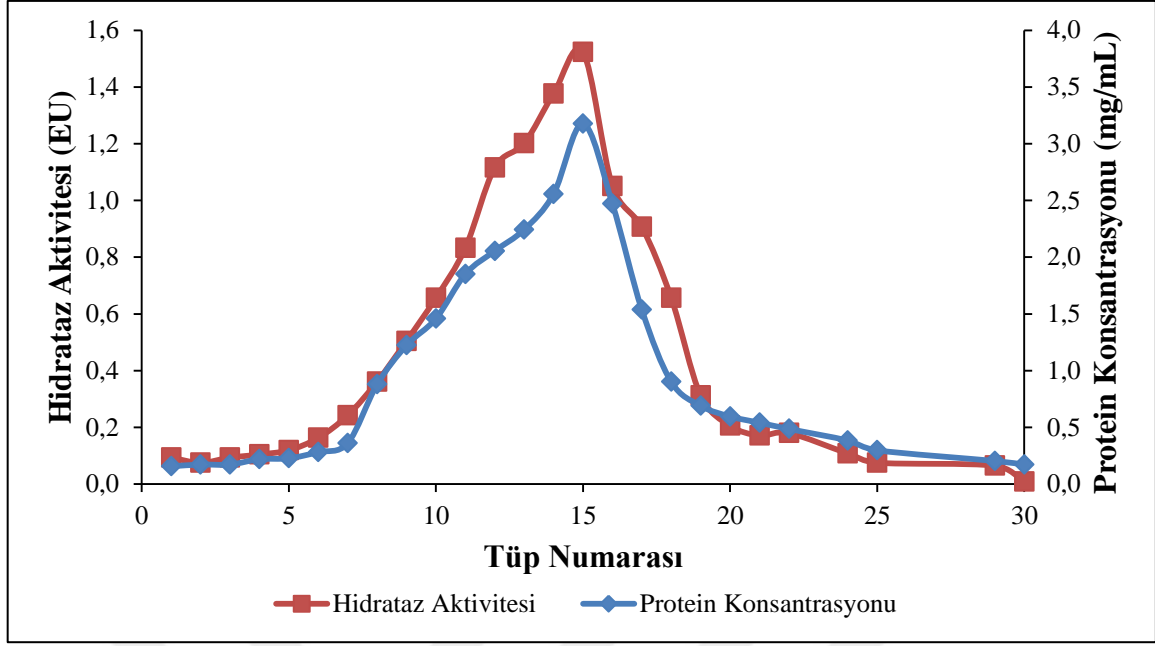
3.1.2. İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCAI, hCA II ve Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

İnsan eritrositlerinden hCAI ve hCAII izoenzimleri ve sığır eritrositlerinden BCA enzimi saflaştırılması ayrı ayrı yapılmıştır. Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan

hemolizat kolona yüklenmiştir. Kolondan önce 1 M NaCl/50 mM Na₂HPO₄ (pH:6,3) tamponu geçirilerek hCAI enzimi, daha sonra 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) tamponu geçirilerek hCAII enzimi elue edilmiştir. Sonra sistem dengeleme tamponuyla dengelendikten sonra kolona sığır kanıyla hazırlanan hemolizat verilmiştir. 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH:5,6) tamponu verilerek, fraksiyon toplayıcı yardımıyla eluatlar 5'er ml halinde tüplere alınmıştır ve 280 nm'deki absorbanlarına bakılarak absorbans gösteren fraksiyonlar için CO₂ hidrataz aktivitesine bakılmıştır (Şekil 58-59).



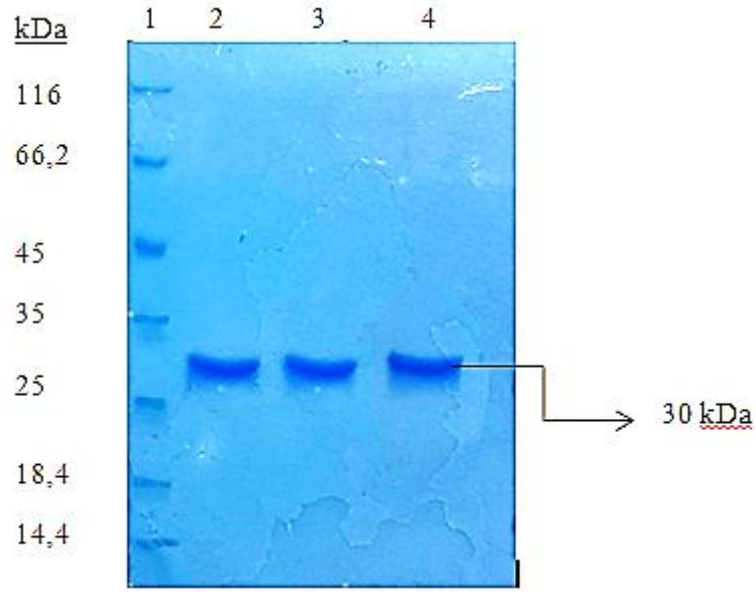
Şekil 58. Afinite kromatografisi ile hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin elusyon grafiği



Şekil 59. Afinite kromatografisi ile BCA enziminin saflaştırılmasına ilişkin elusyon grafiği

3.1.3. İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCAI, hCAII ve Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan eritrositlerinden elde edilen hCAI, hCAII ve sığır eritrositlerinden elde edilen BCA enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrezisi yapılmıştır. Molekül ağırlığı belli olan standart protein markırları kullanılmıştır. SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine hCAI, hCA II ve BCA enzimleri tatbik edilmiştir. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 60).

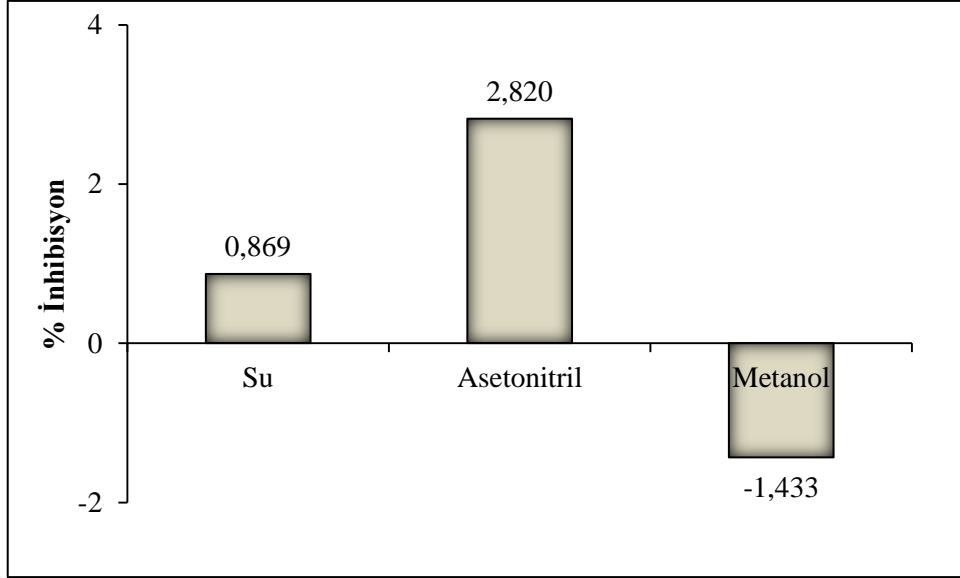


Şekil 60. SDS-PAGE elektroforezi, 1- Moleküler ağırlık markerleri (Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker), 2- hCA I, 3- hCA II, 4- BCA

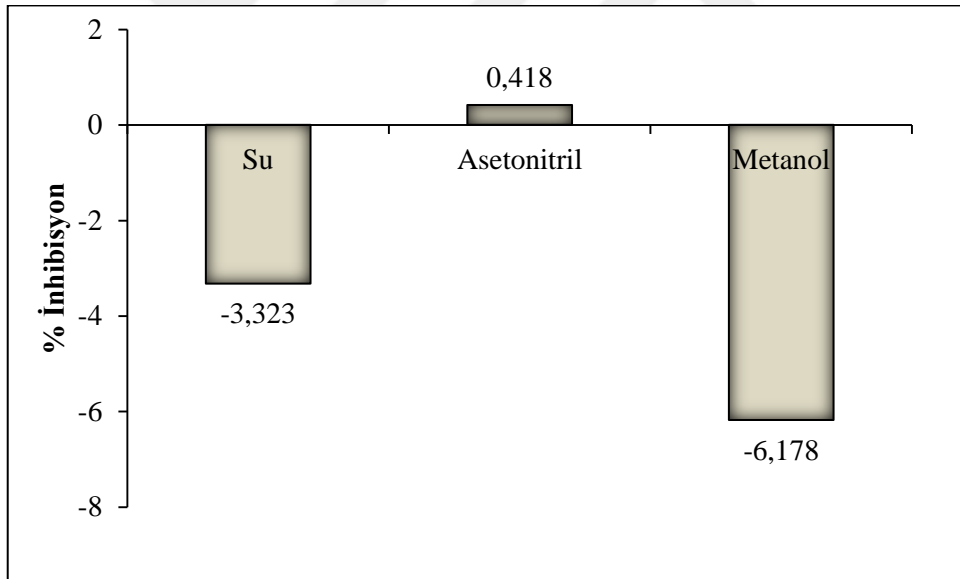
3.2. Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

3.2.1. Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

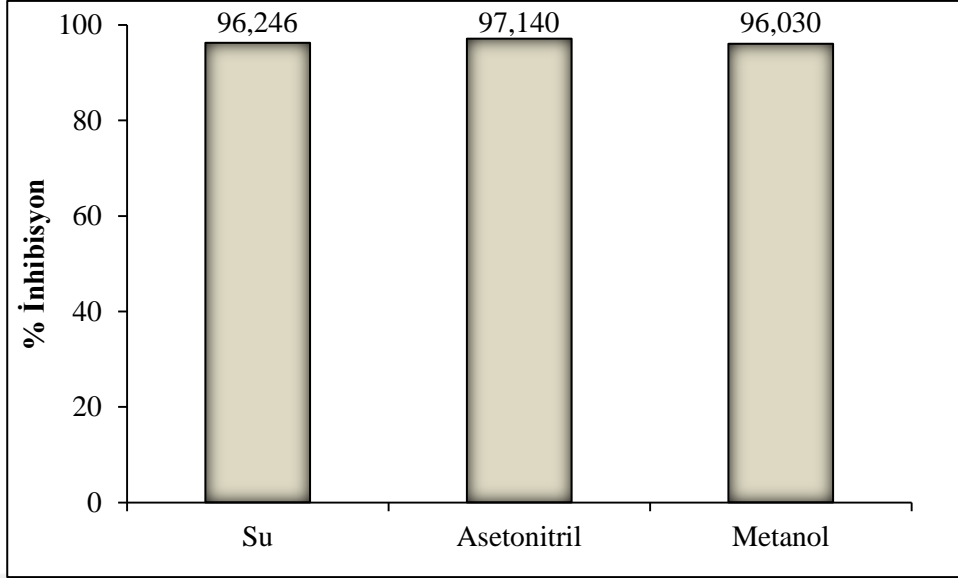
Ebegümeçi, zerdeçal, sumak, kuşburnu, zencefil, keçiboynuzu, ballıbaba, sarı kantaron, karayemiş, adaçayı, sarımsak, karanfil, maydanoz, lavanta, nane, mercanköşk ve kınanın %100 su, %40 asetonitril, %40 metanol olmak üzere üç farklı çözücüde hazırlanan ekstraktlarının CA inhibisyonuna esteraz aktivite yöntemiyle bakılmıştır. Çalışmada 0,1 mg/mL BCA, 50 mM Tris-SO₄ (pH:7,4) tamponu ve 3 mM *p*-nitrofenil asetat kullanılmıştır. Ekstraktların % inhibisyonları üç farklı çözücü için hesaplanıp Microsoft Excel programında grafiğe geçirilmiştir. Her bir bitki ekstraktının üç farklı çözücüdeki inhibisyon sonuçları Şekil 61-77'de gösterilmiştir.



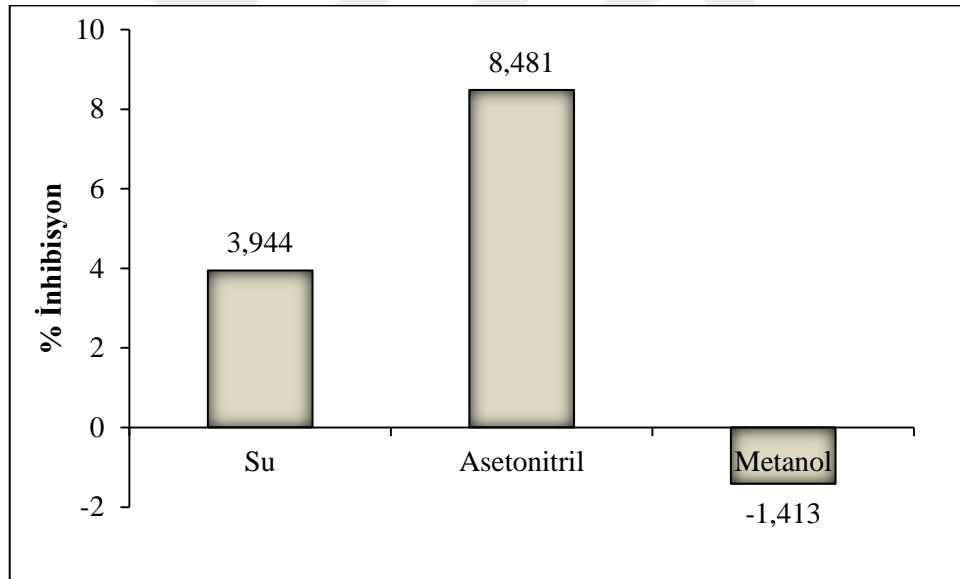
Şekil 61. Üç farklı çözücüde hazırlanan ebeğümeci ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



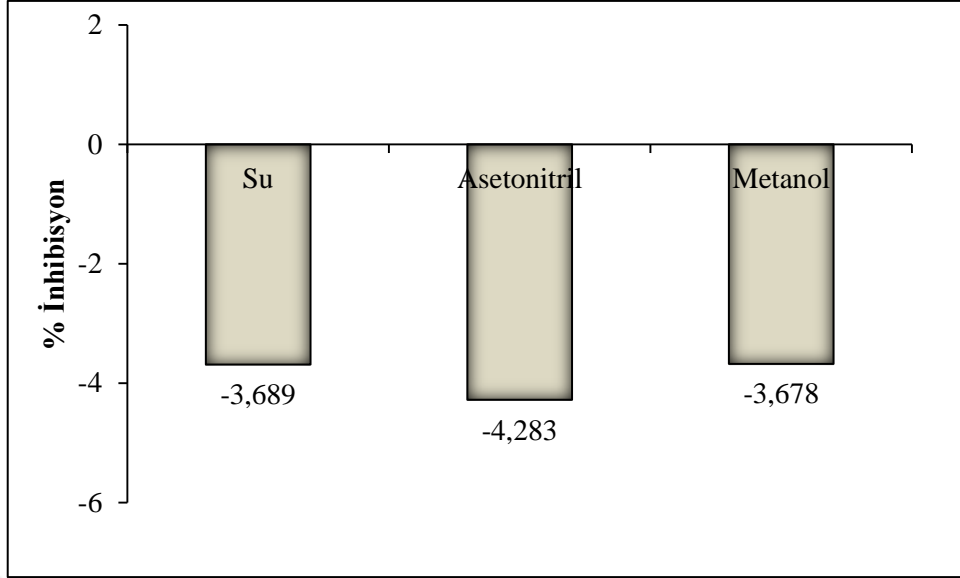
Şekil 62. Üç farklı çözücüde hazırlanan zerdeçal ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



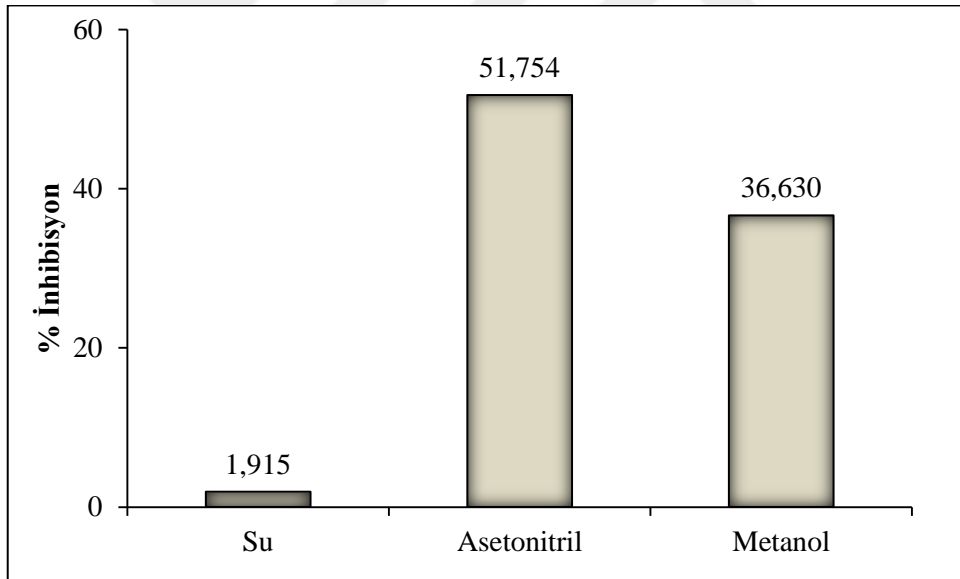
Şekil 63. Üç farklı çözücüde hazırlanan sumak ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



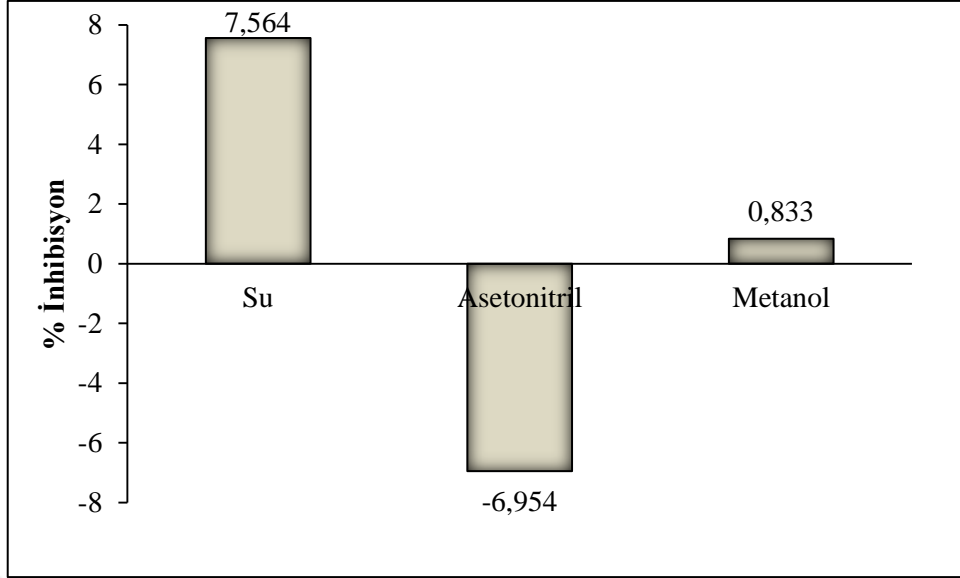
Şekil 64. Üç farklı çözücüde hazırlanan kuşburnu ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



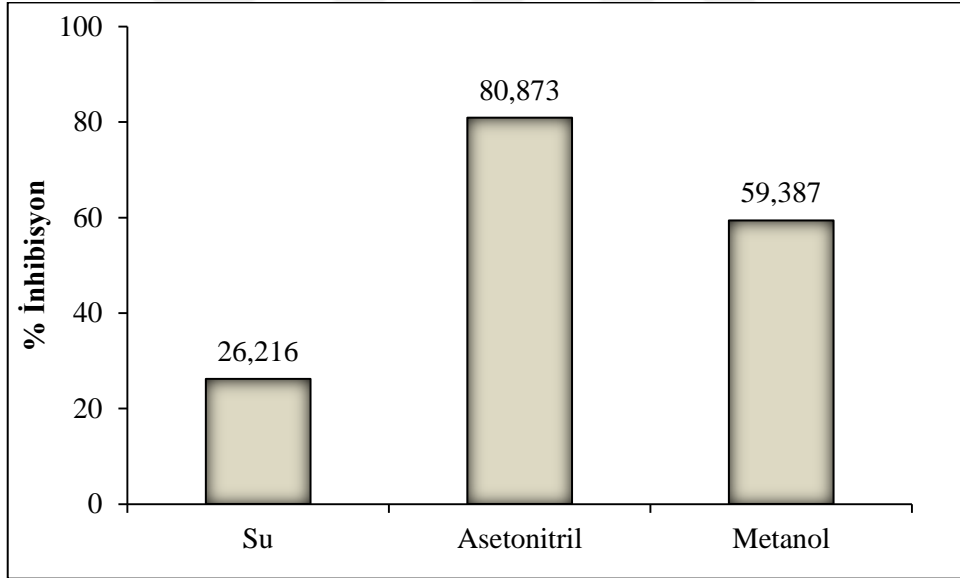
Şekil 65. Üç farklı çözücüde hazırlanan zencefil ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



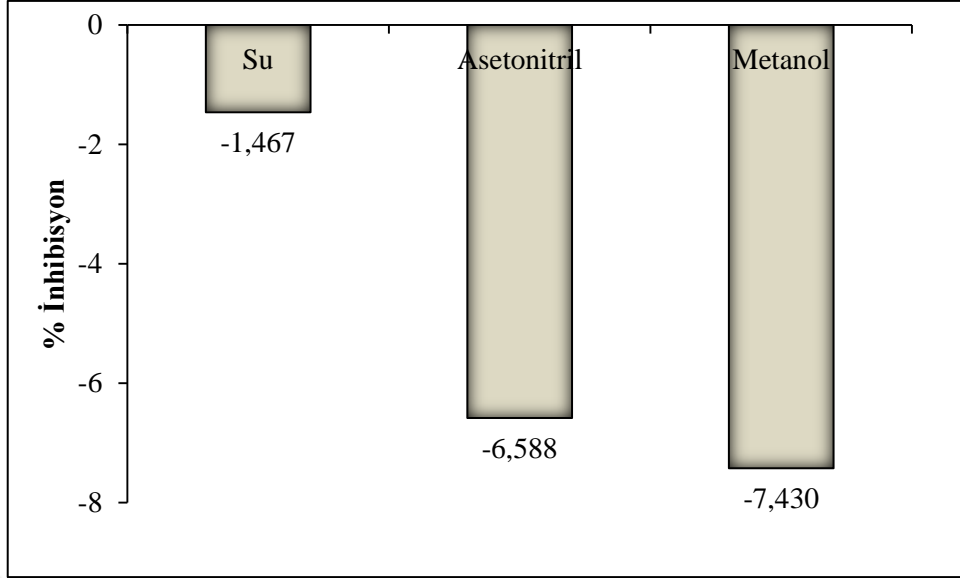
Şekil 66. Üç farklı çözücüde hazırlanan keçi boynuzu ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



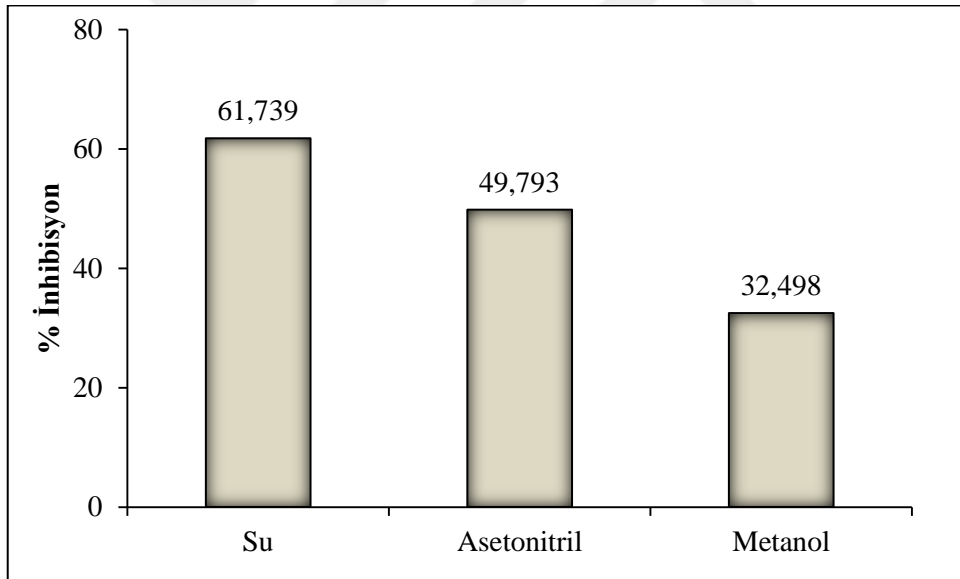
Şekil 67. Üç farklı çözücüde hazırlanan ballıbabı ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



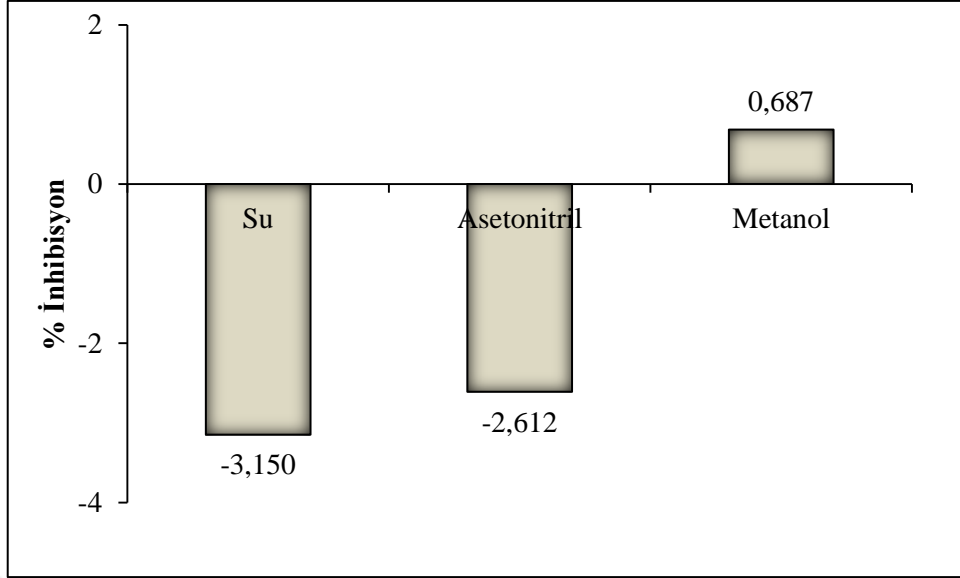
Şekil 68. Üç farklı çözücüde hazırlanan sarı kantaron ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



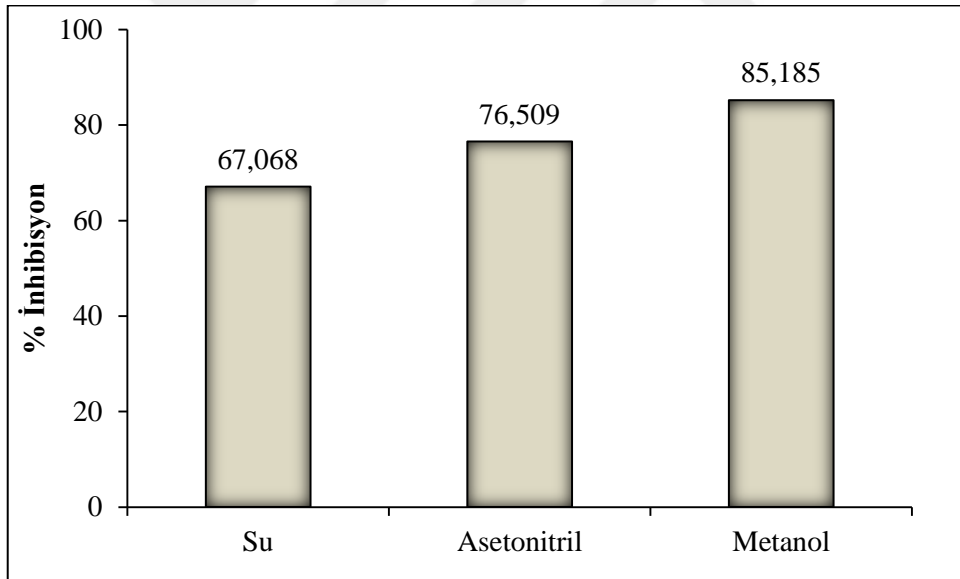
Şekil 69. Üç farklı çözücünde hazırlanan karayemiş ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



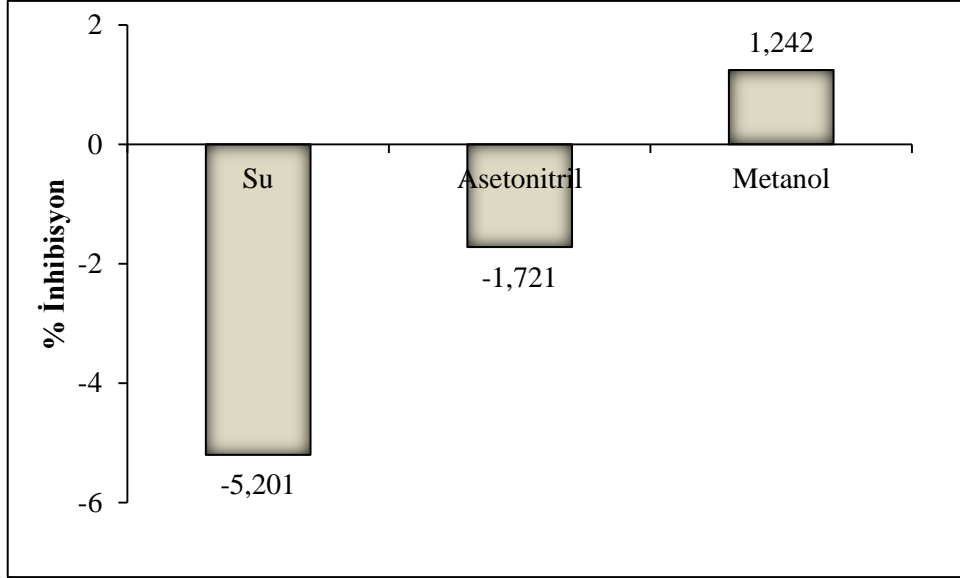
Şekil 70. Üç farklı çözücünde hazırlanan adaçayı ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



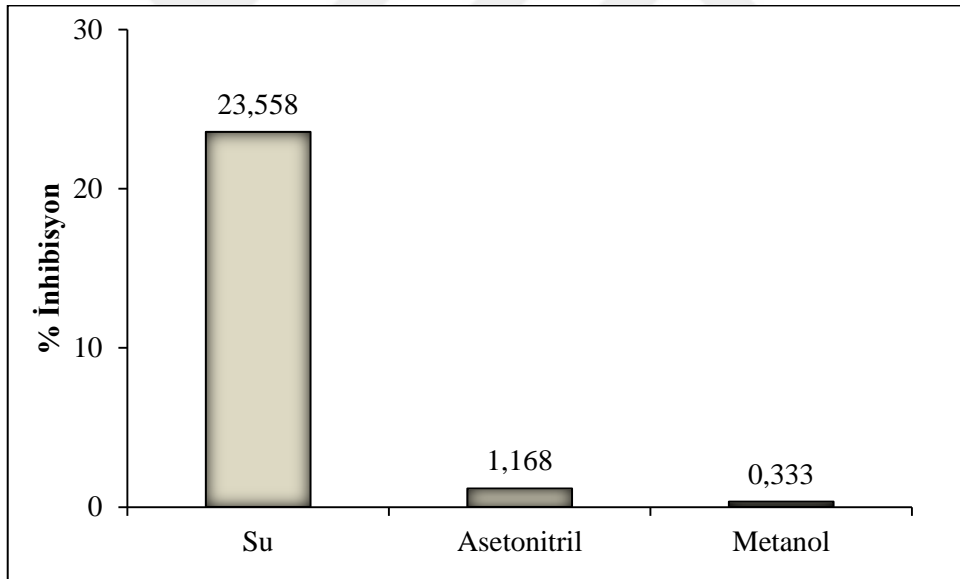
Şekil 71. Üç farklı çözücüde hazırlanan sarımsak ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



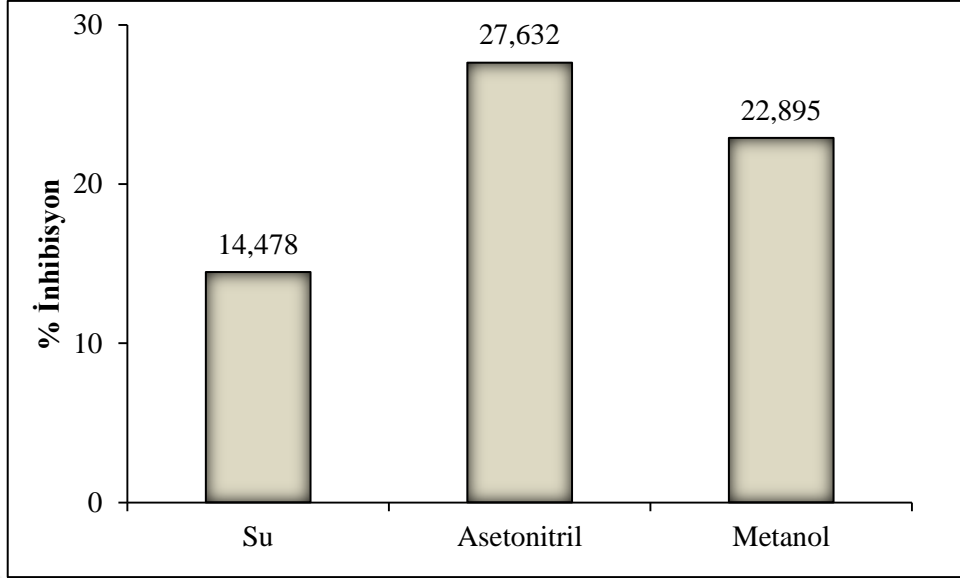
Şekil 72. Üç farklı çözücüde hazırlanan karanfil ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



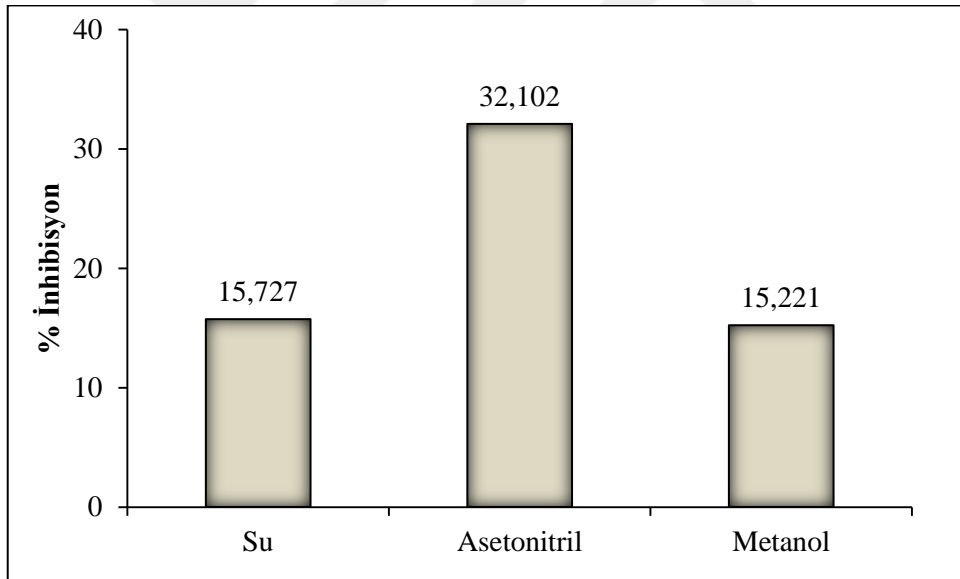
Şekil 73. Üç farklı çözücüde hazırlanan maydanoz ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



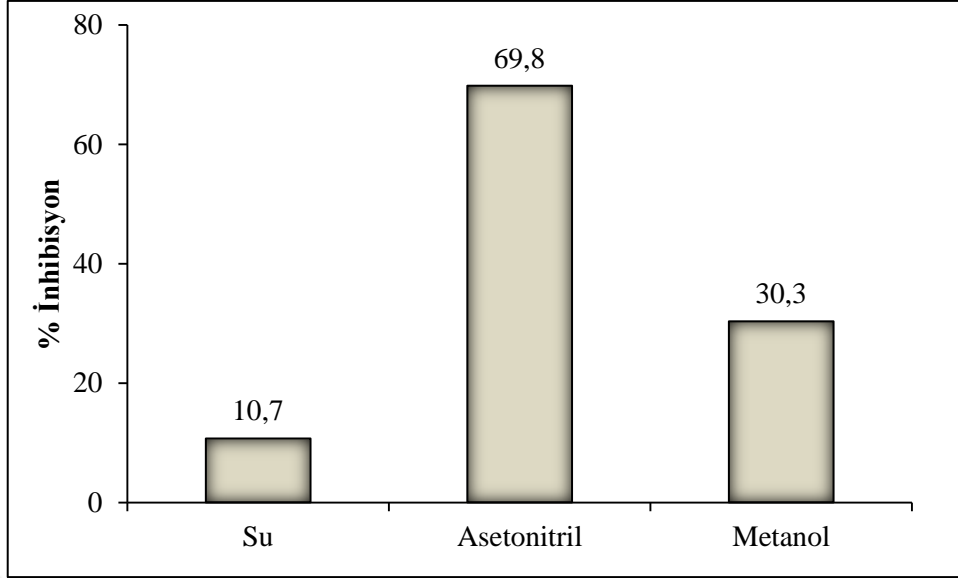
Şekil 74. Üç farklı çözücüde hazırlanan lavanta ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



Şekil 75. Üç farklı çözücüde hazırlanan nane ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



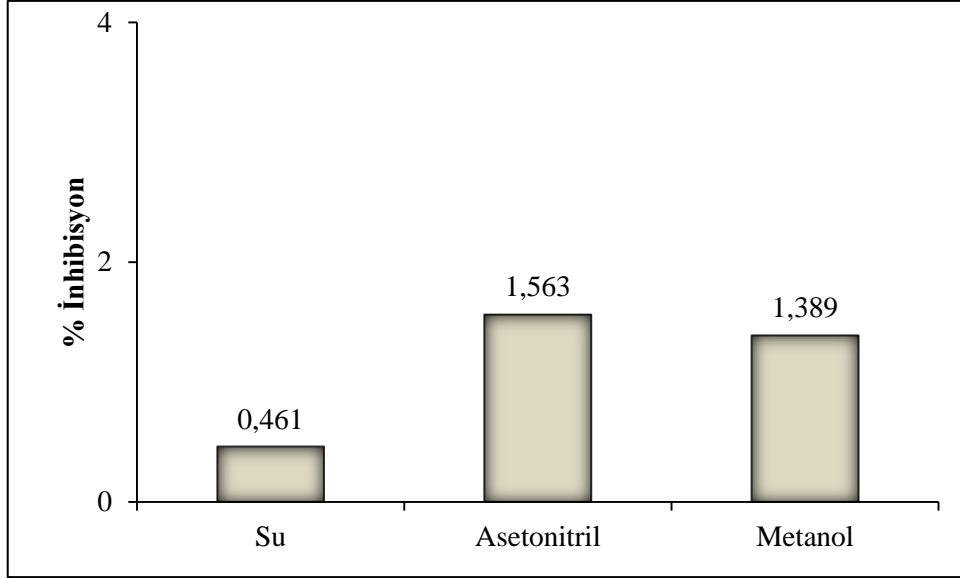
Şekil 76. Üç farklı çözücüde hazırlanan mercanköşk ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



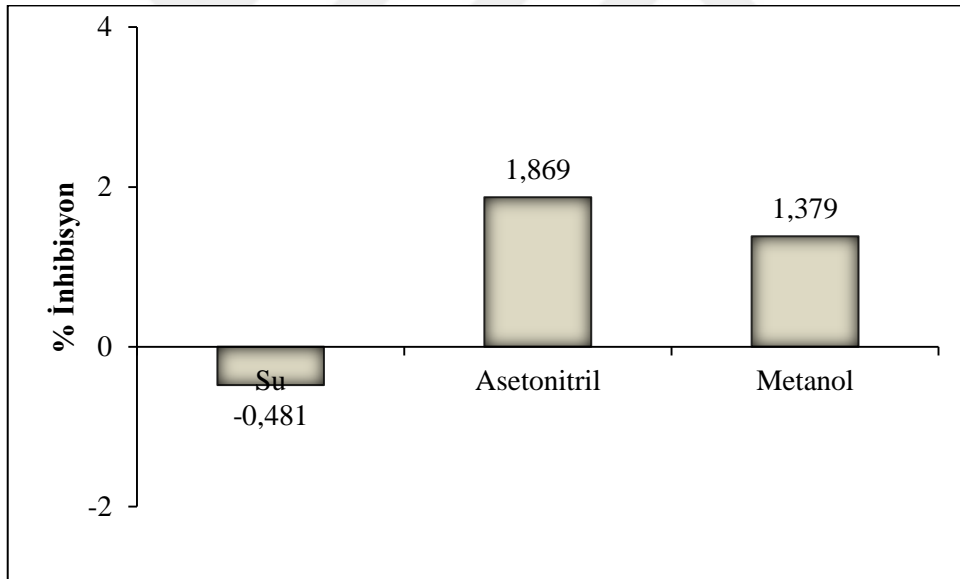
Şekil 77. Üç farklı çözücüde hazırlanan kına ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri

3.2.2. Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

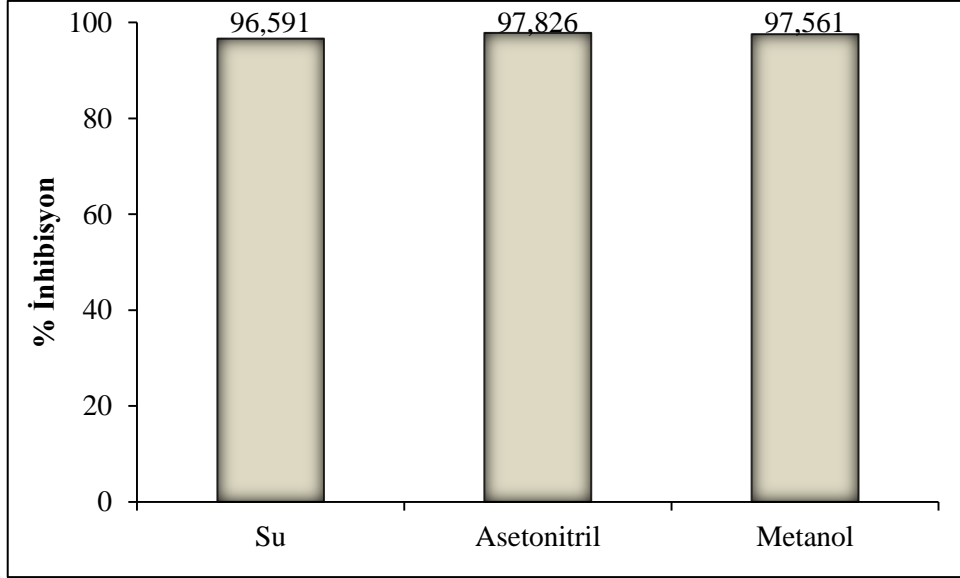
Ebegümeçi, zerdeçal, sumak, kuşburnu, zencefil, keçiboynuzu, ballıbaba, sarı kantaron, karayemiş, adaçayı, sarımsak, karanfil, maydanoz, lavanta, nane, mercanköşk ve kınanın %100 su, %40 asetonitril, %40 metanol olmak üzere üç farklı çözücüde hazırlanan ekstraktlarının CA inhibisyonuna hidrataz aktivite yöntemiyle bakılmıştır. Çalışmada 0,1 mg/mL BCA, 2,5 mM HEPES tamponu (pH:8,8) ve doymuş karbondioksit çözeltisi kullanılmıştır. Ekstraktların % inhibisyonları üç farklı çözücü için hesaplanıp Microsoft Excel programında grafiğe geçirilmiştir. Her bir bitki ekstraktının üç farklı çözücüdeki inhibisyon sonuçları Şekil 78-94'de gösterilmiştir.



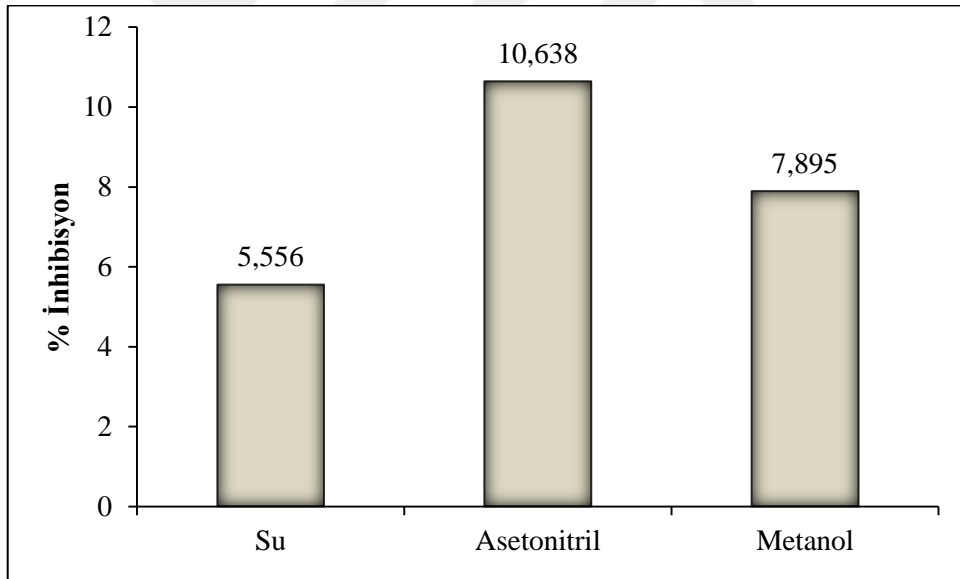
Şekil 78. Üç farklı çözücüde hazırlanan ebeğümeci ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



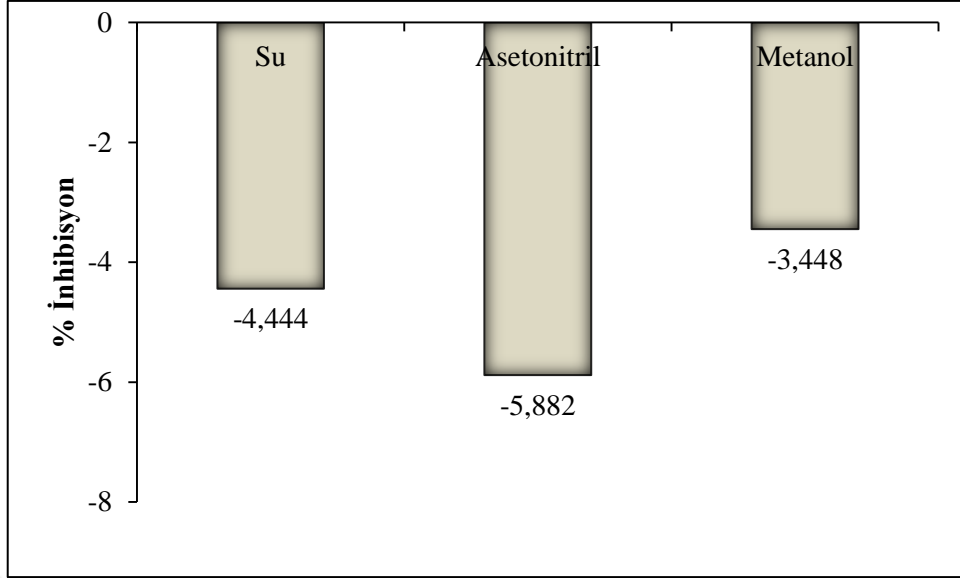
Şekil 79. Üç farklı çözücüde hazırlanan zerdeçal ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



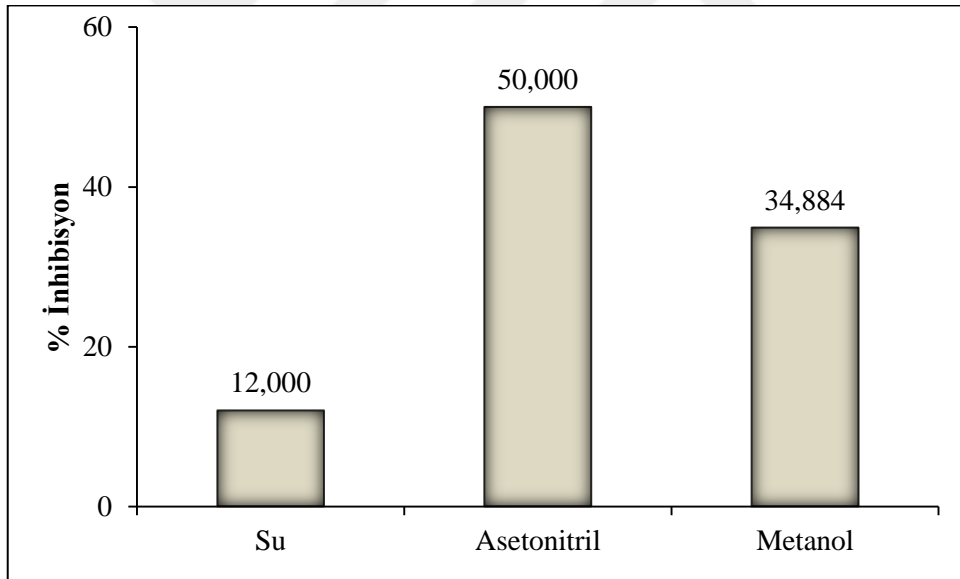
Şekil 80. Üç farklı çözücüde hazırlanan sumak ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



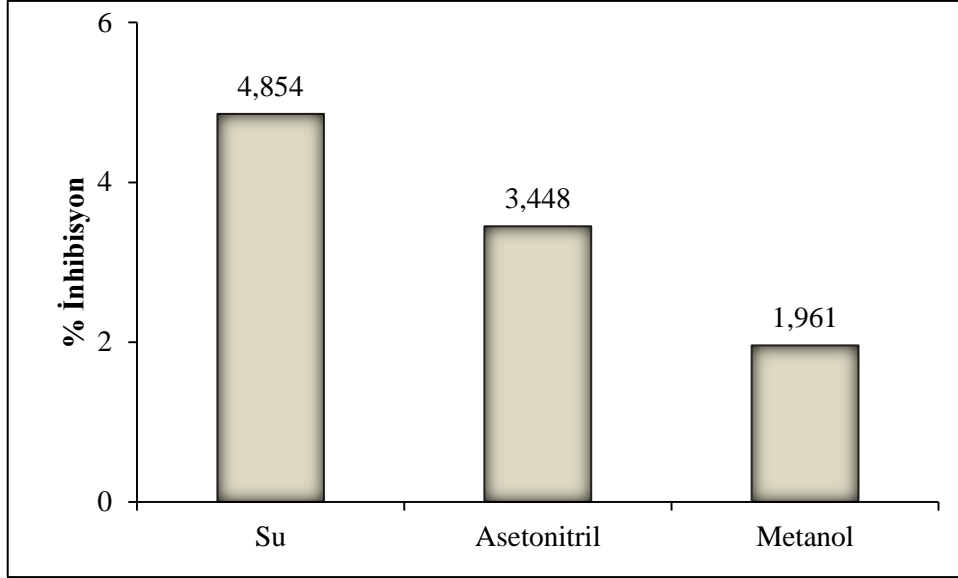
Şekil 81. Üç farklı çözücüde hazırlanan kuşburnu ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



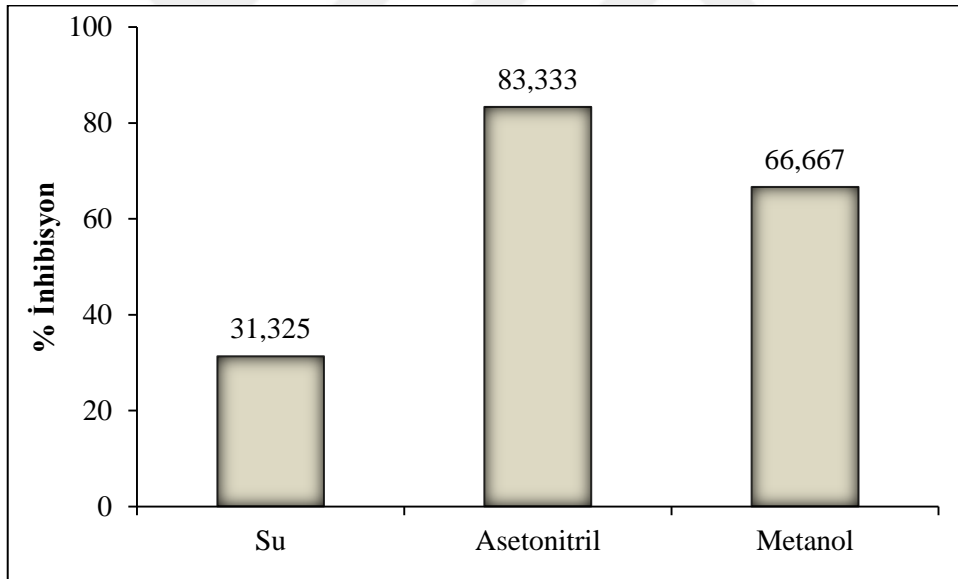
Şekil 82. Üç farklı çözücüde hazırlanan zencefil ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



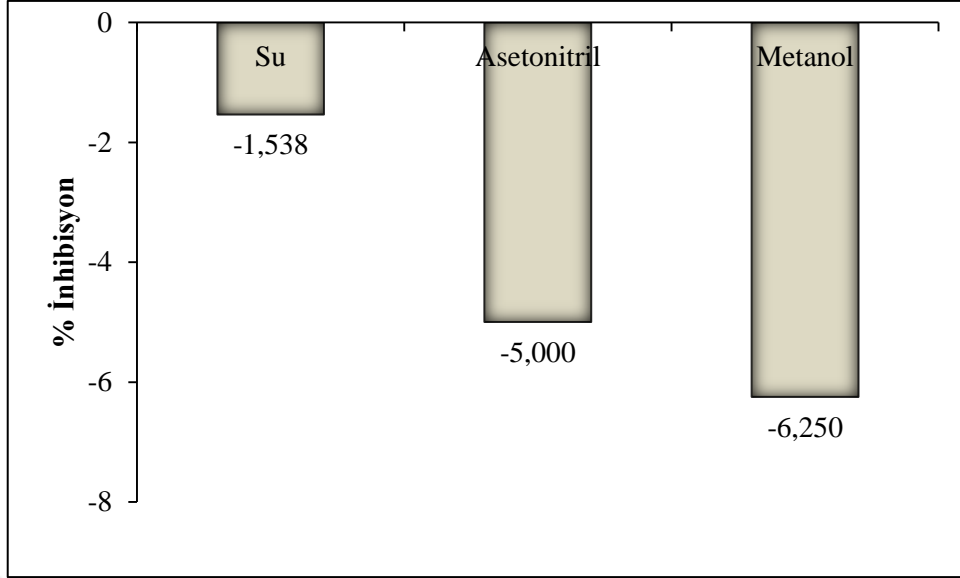
Şekil 83. Üç farklı çözücüde hazırlanan keçiboynuzu ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



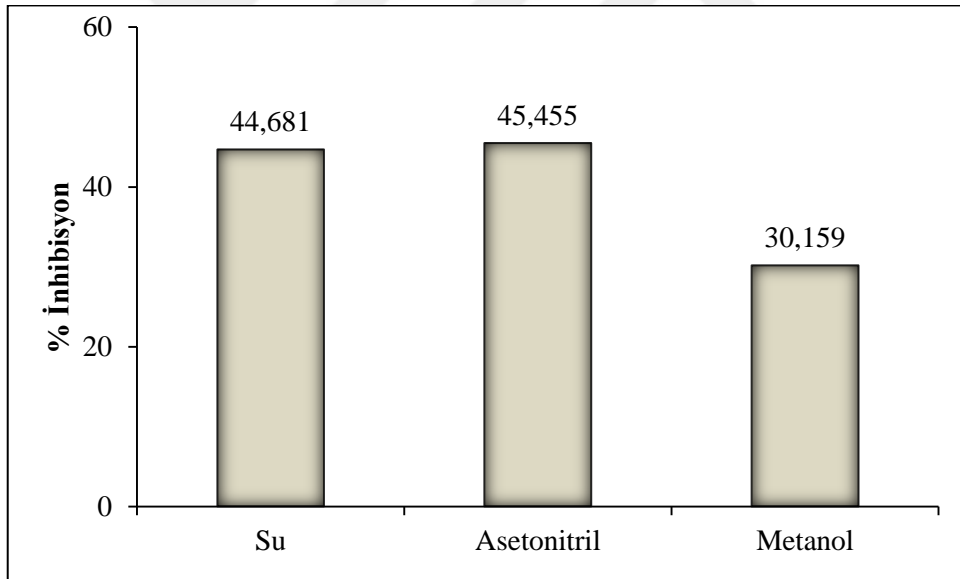
Şekil 84. Üç farklı çözücüde hazırlanan ballı baba ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



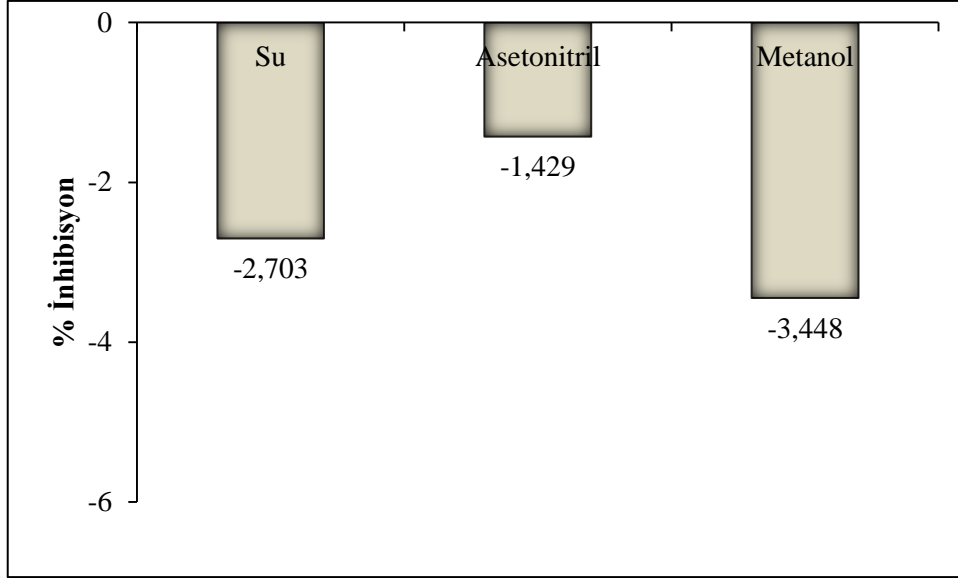
Şekil 85. Üç farklı çözücüde hazırlanan sarı kantaron ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



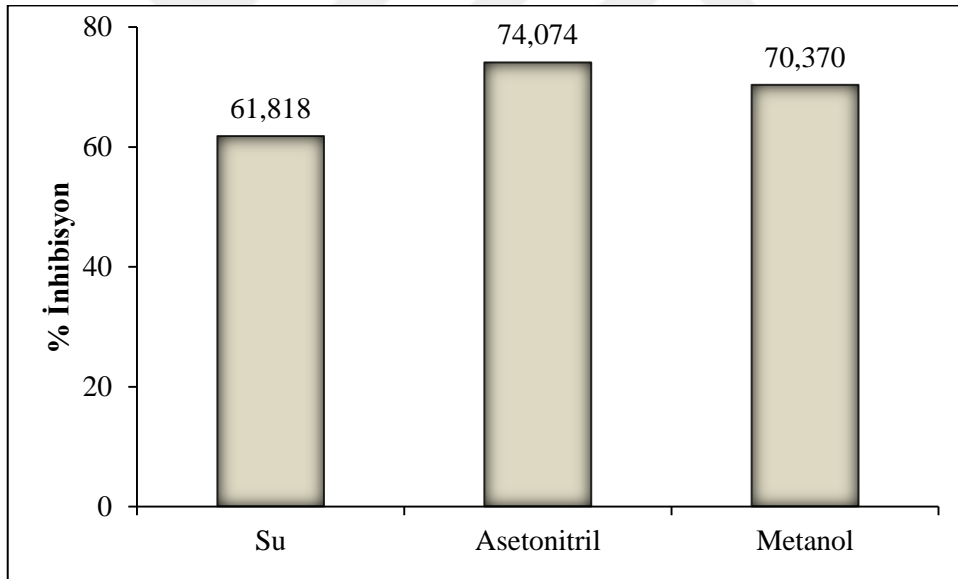
Şekil 86. Üç farklı çözücüde hazırlanan karayemiş ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



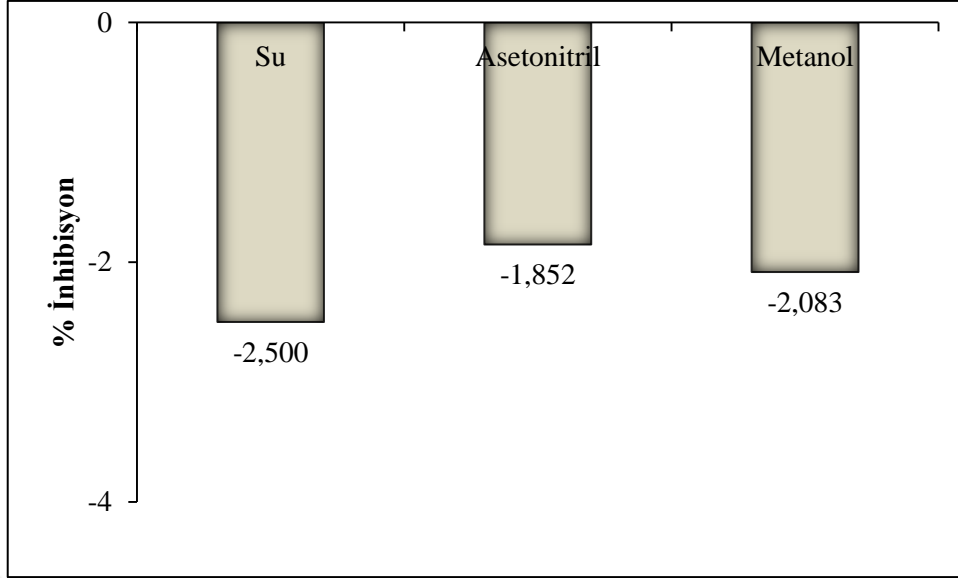
Şekil 87. Üç farklı çözücüde hazırlanan adaçayı ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



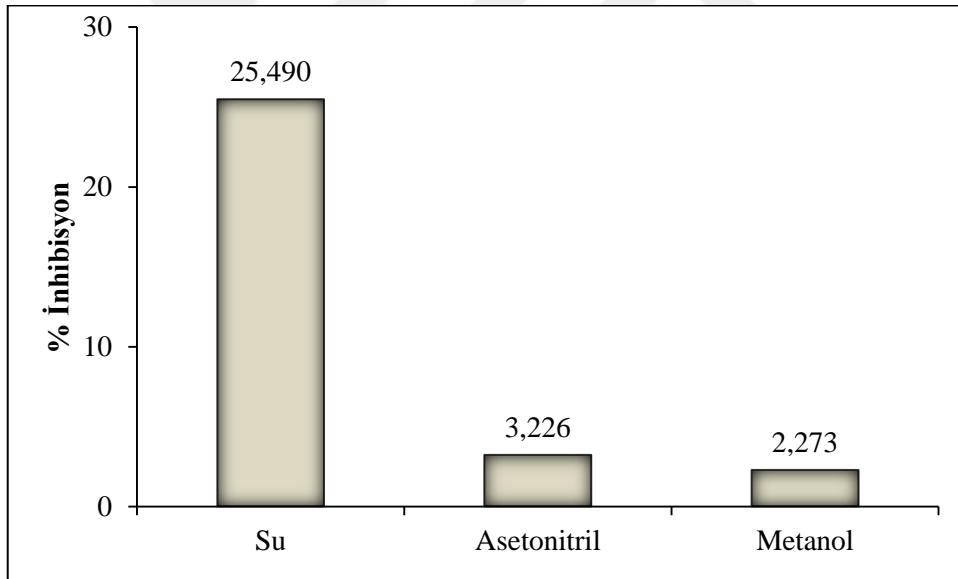
Şekil 88. Üç farklı çözücüde hazırlanan sarımsak ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



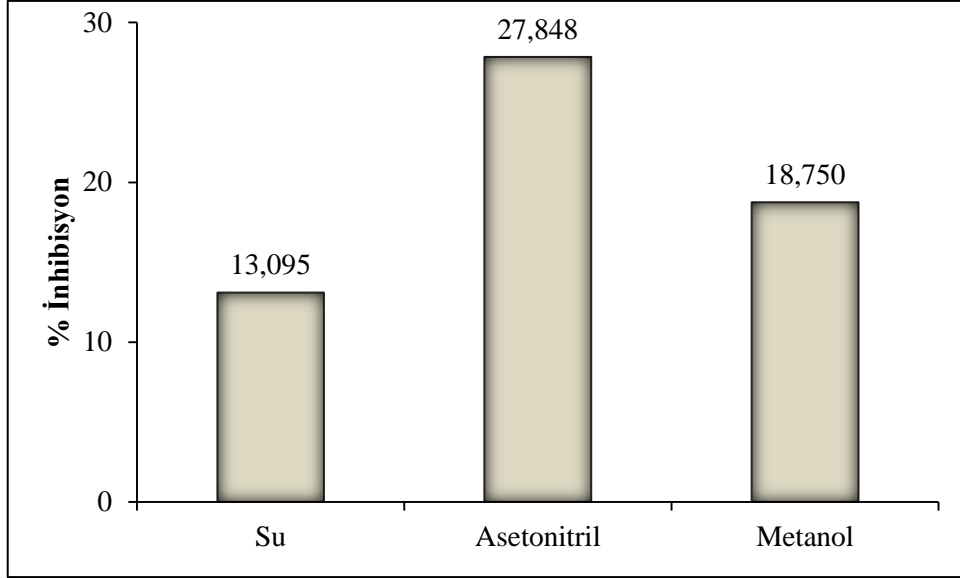
Şekil 89. Üç farklı çözücüde hazırlanan karanfil ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



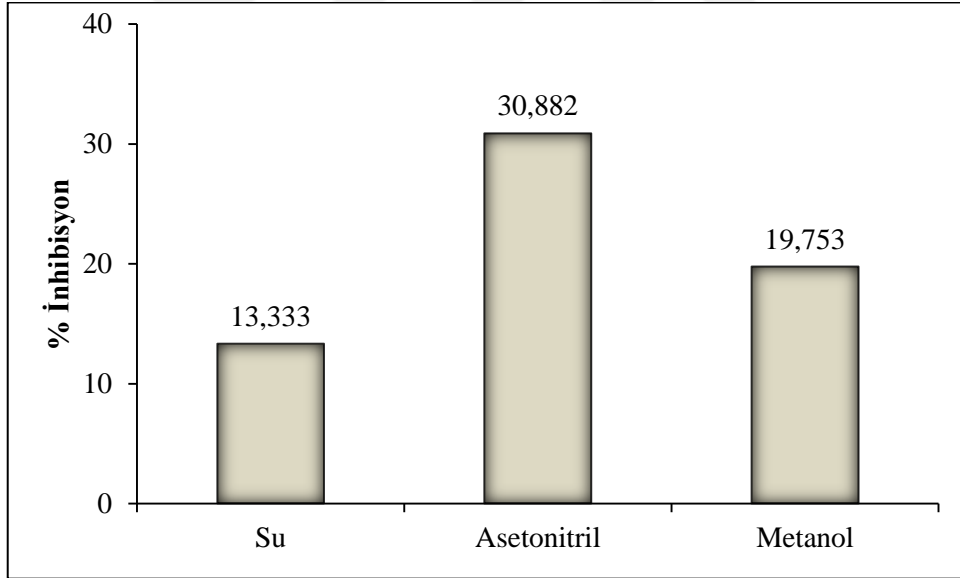
Şekil 90. Üç farklı çözücüde hazırlanan maydanoz ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



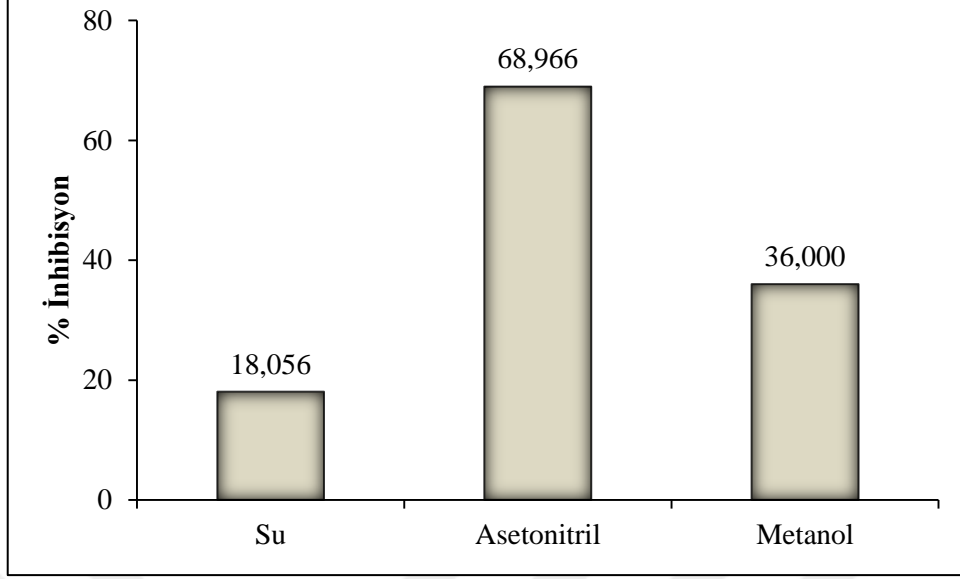
Şekil 91. Üç farklı çözücüde hazırlanan lavanta ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



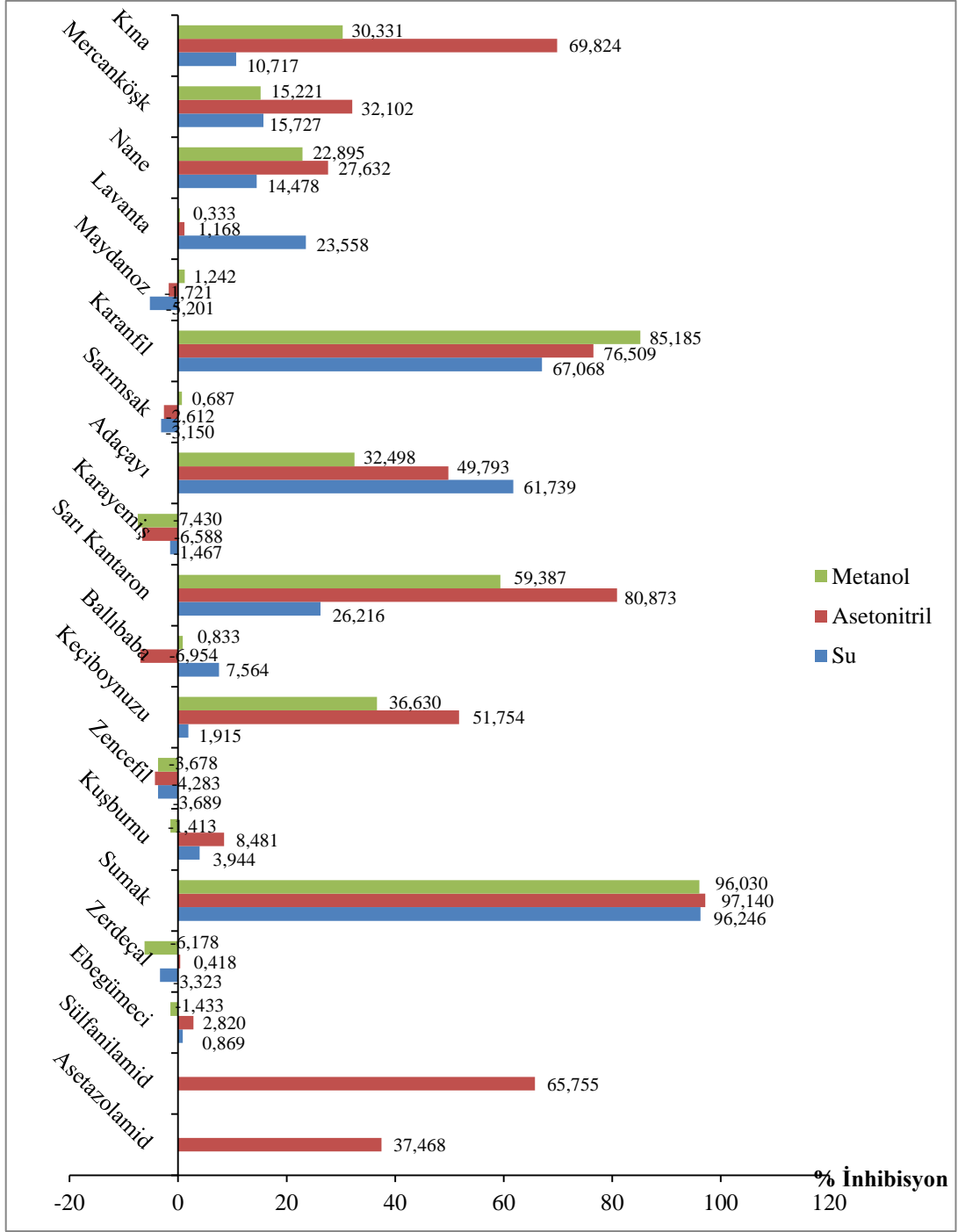
Şekil 92. Üç farklı çözücüde hazırlanan nane ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



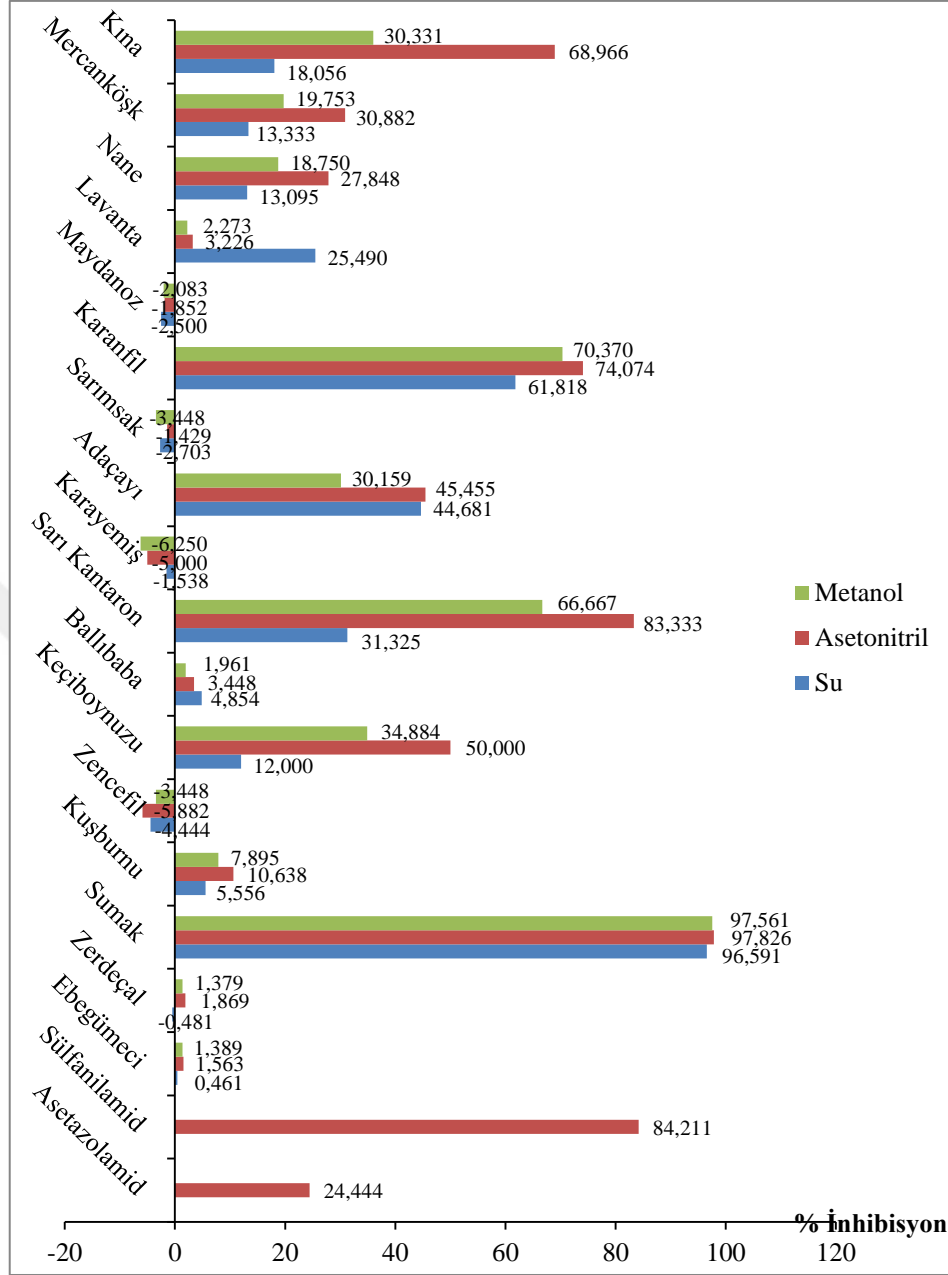
Şekil 93. Üç farklı çözücüde hazırlanan mercanköşk ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



Şekil 94. Üç farklı çözücüde hazırlanan kına ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri



Şekil 95. Üç farklı çözücüde hazırlanan 17 bitki ekstraktının CA'nın esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri

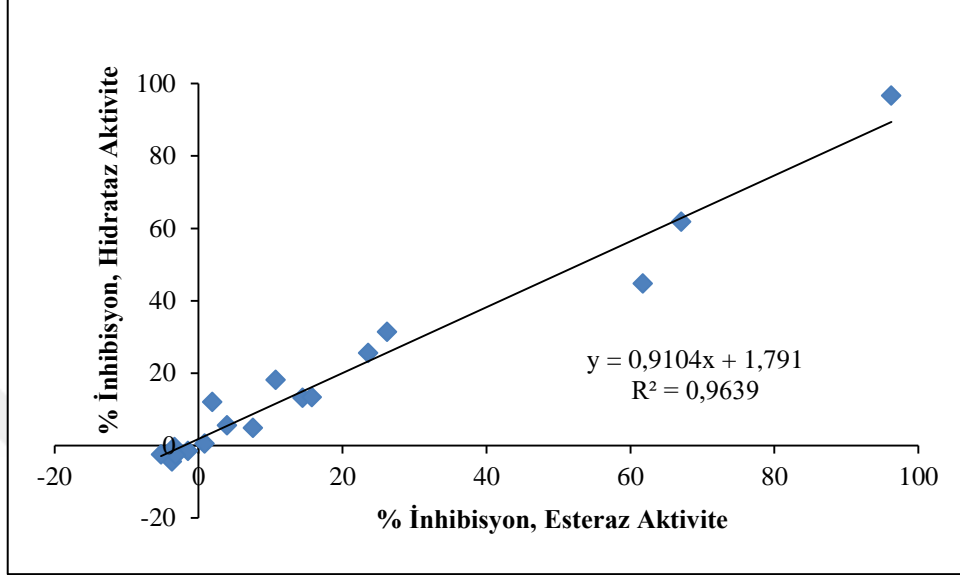


Şekil 96. Üç farklı çözücüde hazırlanan 17 bitki ekstraktının CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerleri

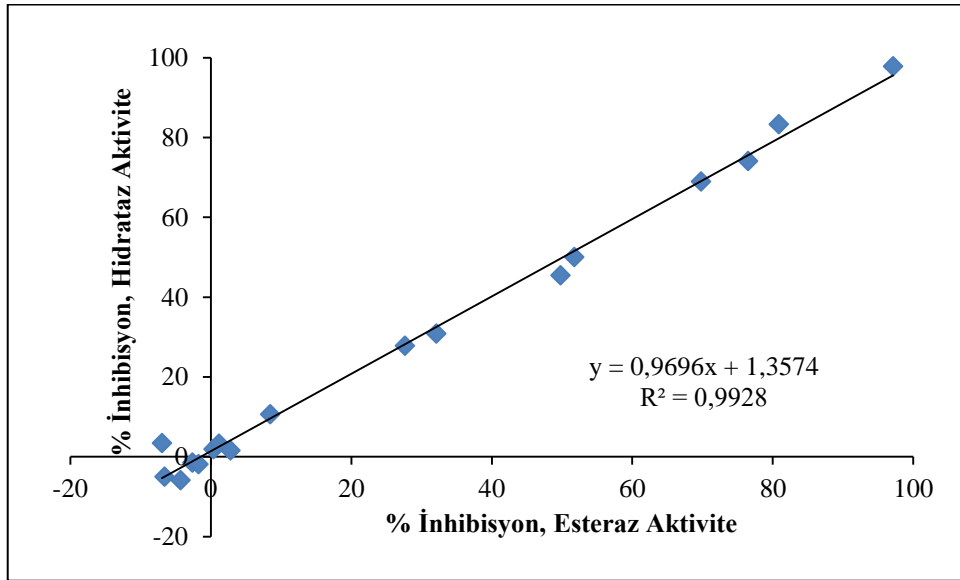
3.2.3. Bitki Ekstraktlarının BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi ile Hidratz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin Korelasyonu

17 farklı bitki ekstraktının 3 farklı çözücüdeki (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) % inhibisyon değerleri hem hidratz aktivite yöntemindeki sonuçlarla hem de esteraz aktivite yöntemindeki sonuçlarla paralellik göstermiştir. Hidratz-esteraz arasında üç farklı çözücü için % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek korelasyon grafikleri

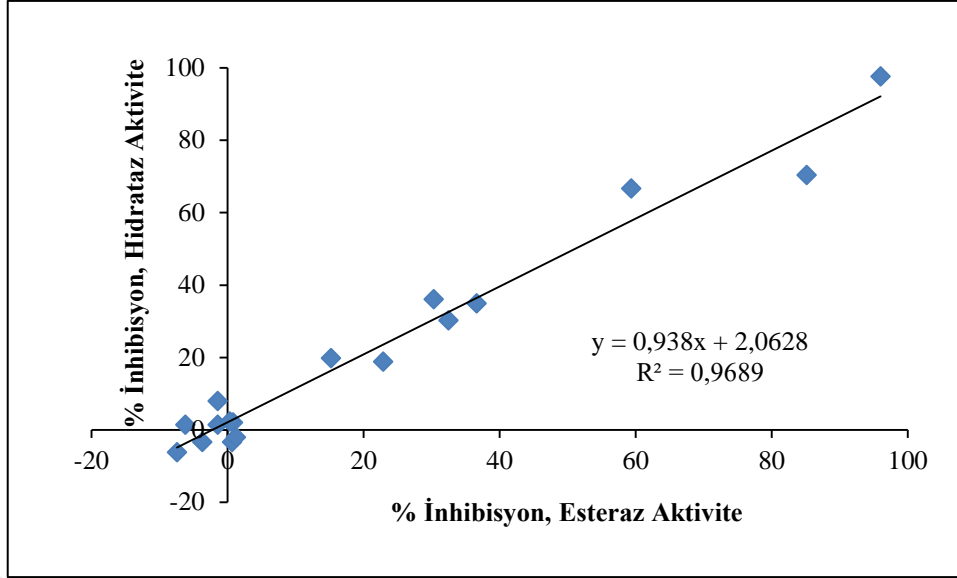
çizilmiş ve %100 su, %40 asetonitril, %40 metanol için sırayla R^2 değerleri 0,9639; 0,9928; 0,9689 olarak bulunmuştur (Şekil 97-99).



Şekil 97. %100 Su ile hazırlanan bitki ekstraktlarının CA'nın hidrataz aktivitesi ile esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerlerinin korelasyonu



Şekil 98. %40 Asetonitril ile hazırlanan bitki ekstraktlarının CA'nın hidrataz aktivitesi ile esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerlerinin korelasyonu

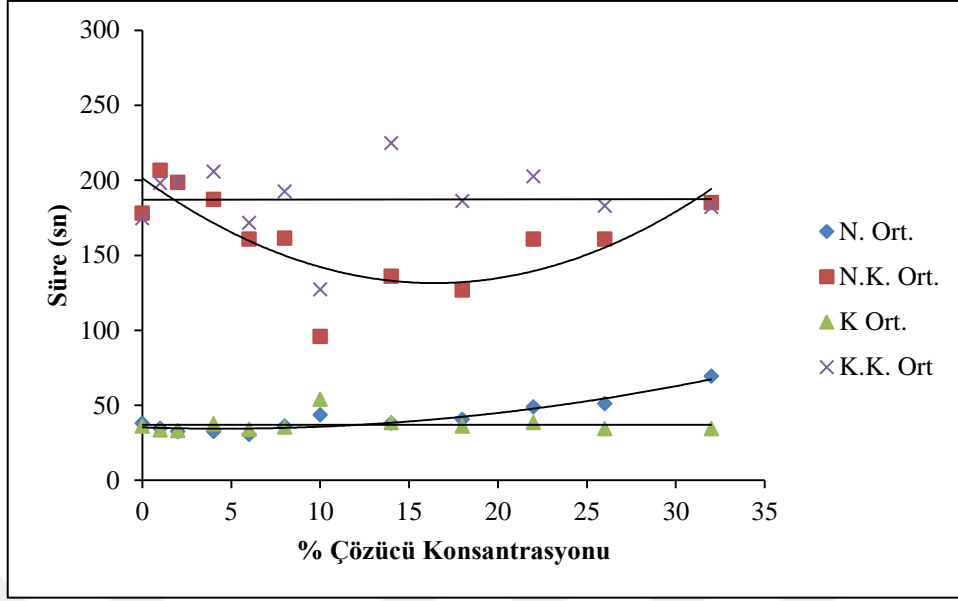


Şekil 99. %40 Metanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının CA'nın hidrataz aktivitesi ile esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyon değerlerinin korelasyonu

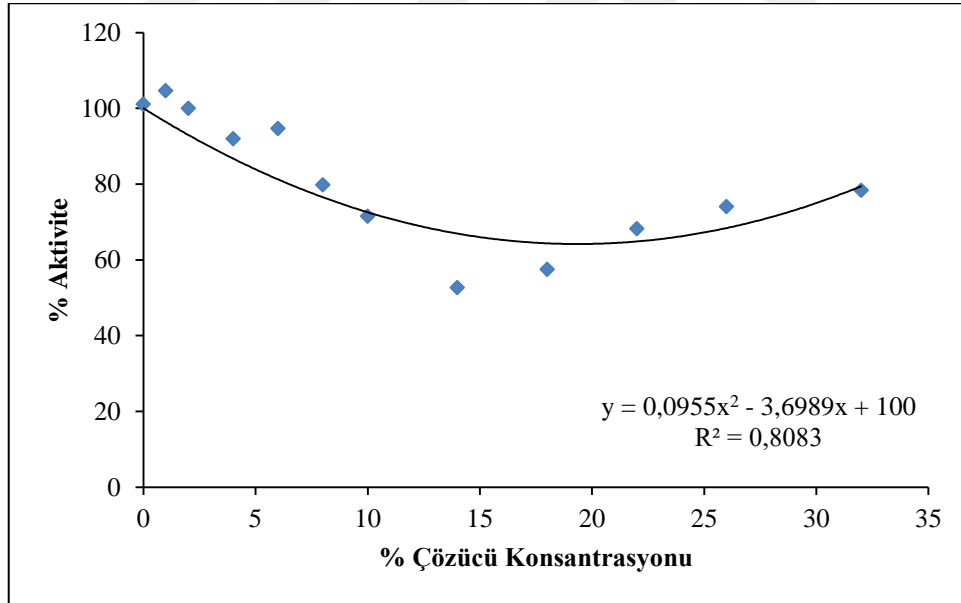
3.3. Organik Çözücülerin Sığır Karbonik Anhidraz (BCA) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

3.3.1. Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerine Etkileri

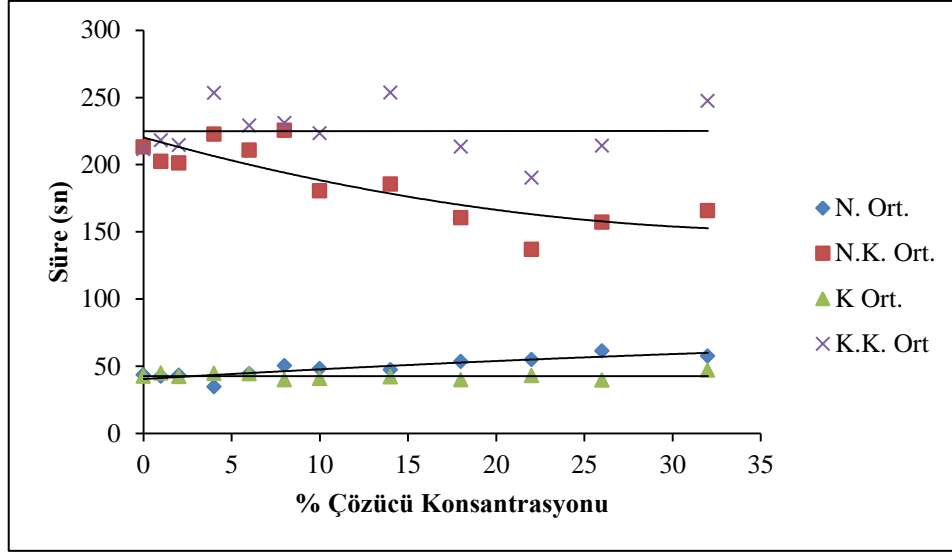
Çalışmamızda, 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) 12 farklı konsantrasyonda (% 0, %1, %2, %4, %6, %8, %10, %14, %18, %22, %26, %32) sığır CA (BCA) aktivitesi üzerine etkisine CA'nın hidrataz aktivite yöntemiyle ilk defa bakılmıştır. BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) eğrilerinin grafikleri ve % Çözücü konsantrasyonuna karşı % aktivite grafikleri Şekil 100-109' da verilmiştir.



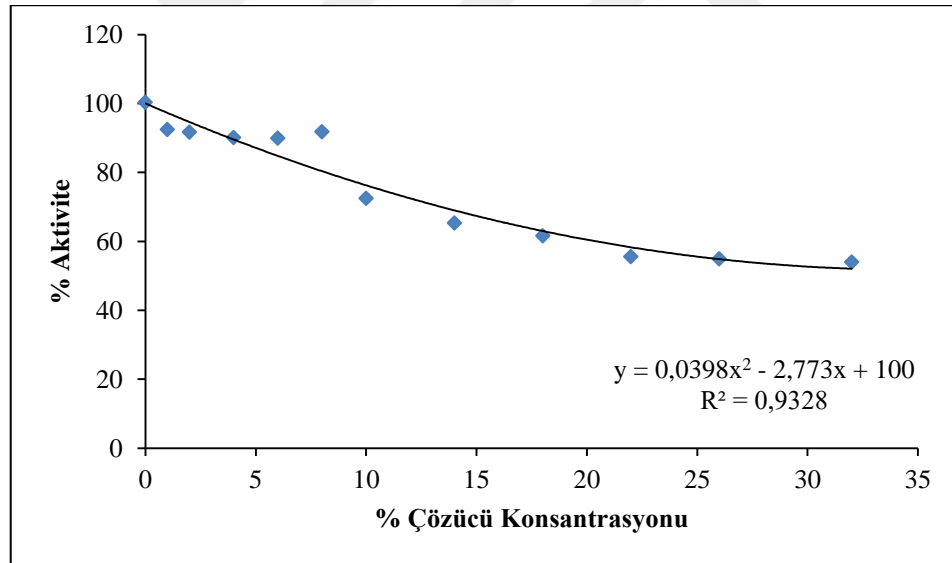
Şekil 100. Asetonitrilin BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



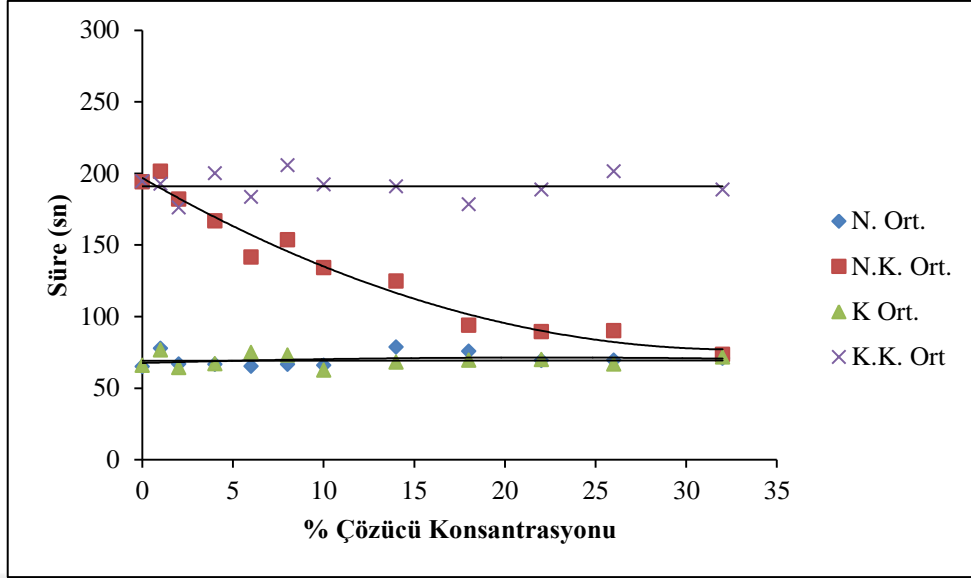
Şekil 101. Asetonitrilin BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi



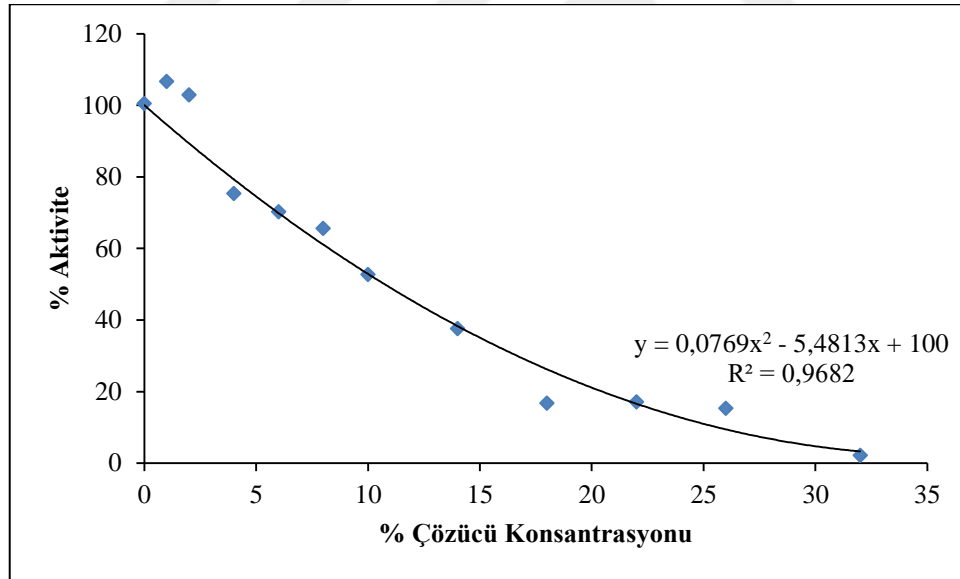
Şekil 102. Asetonun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



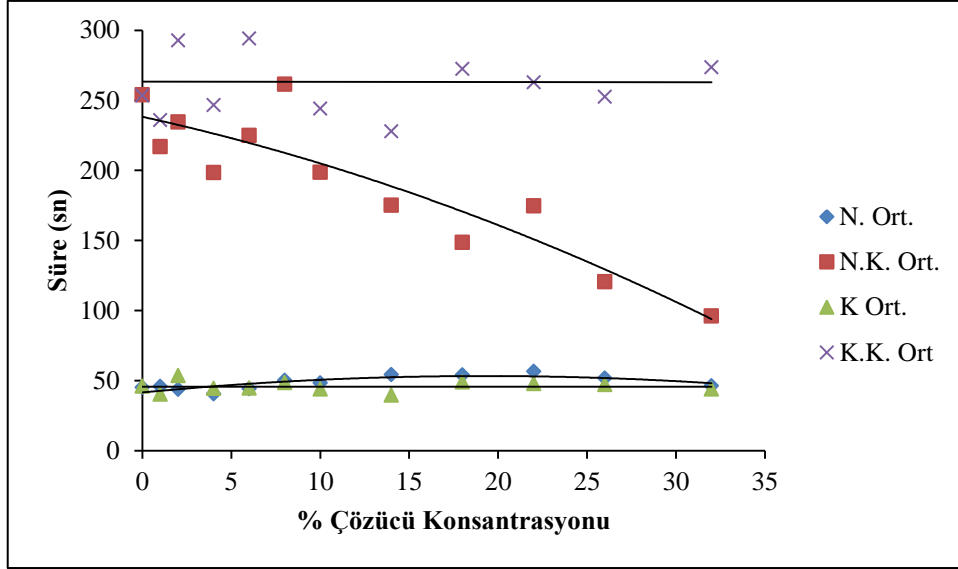
Şekil 103. Asetonun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi



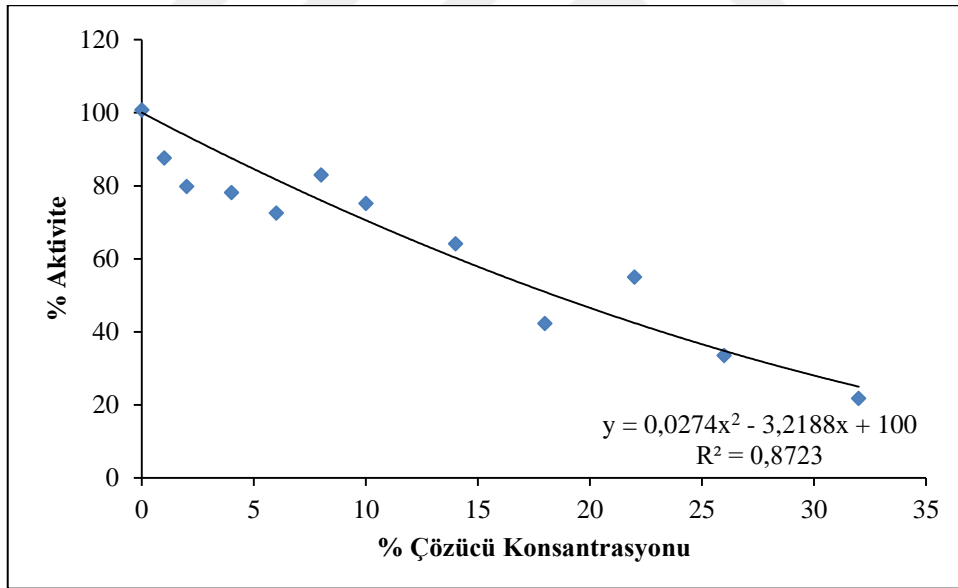
Şekil 104. Metanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



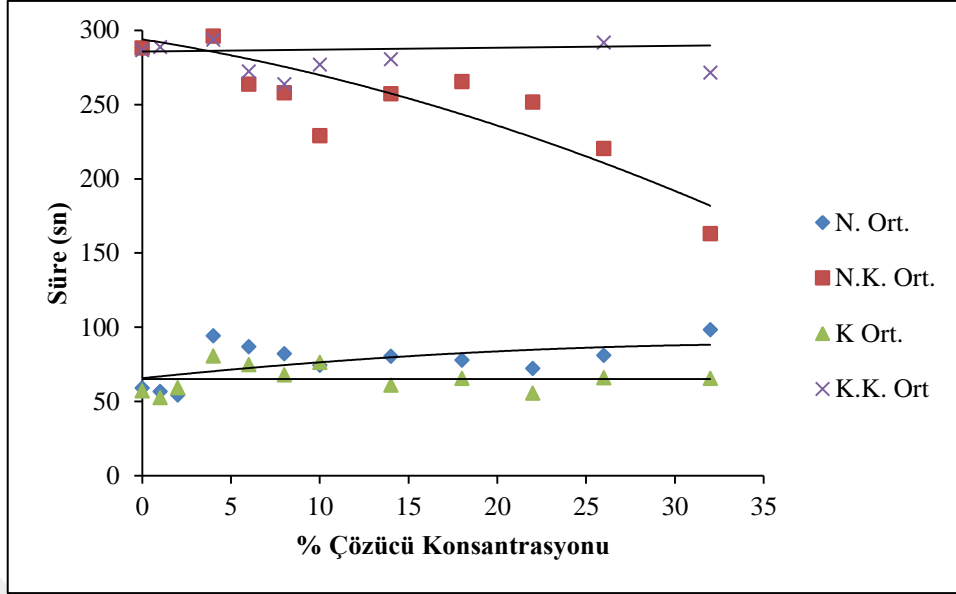
Şekil 105. Metanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi



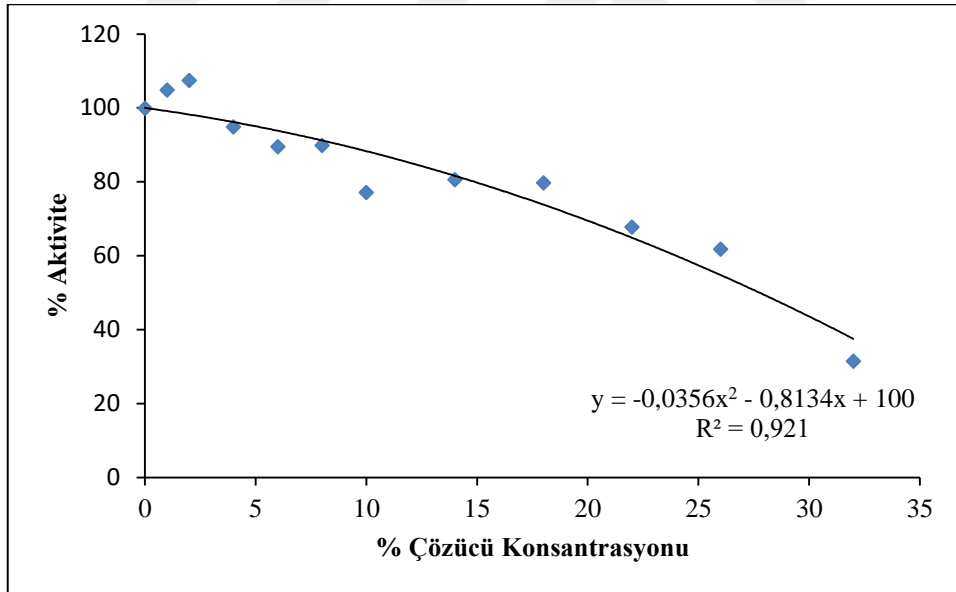
Şekil 106. Etanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



Şekil 107. Etanolün BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 108. DMSO'nun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri

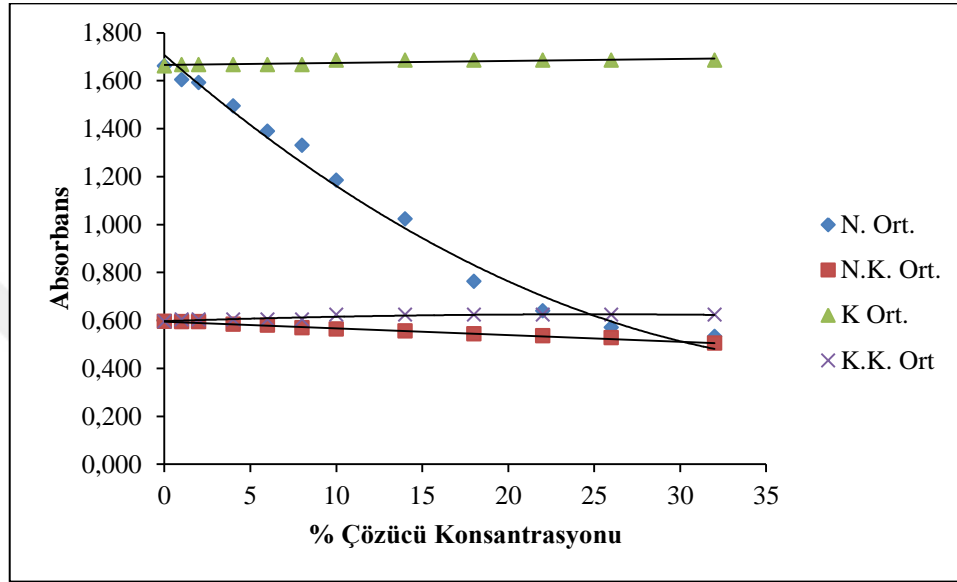


Şekil 109. DMSO'nun BCA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi

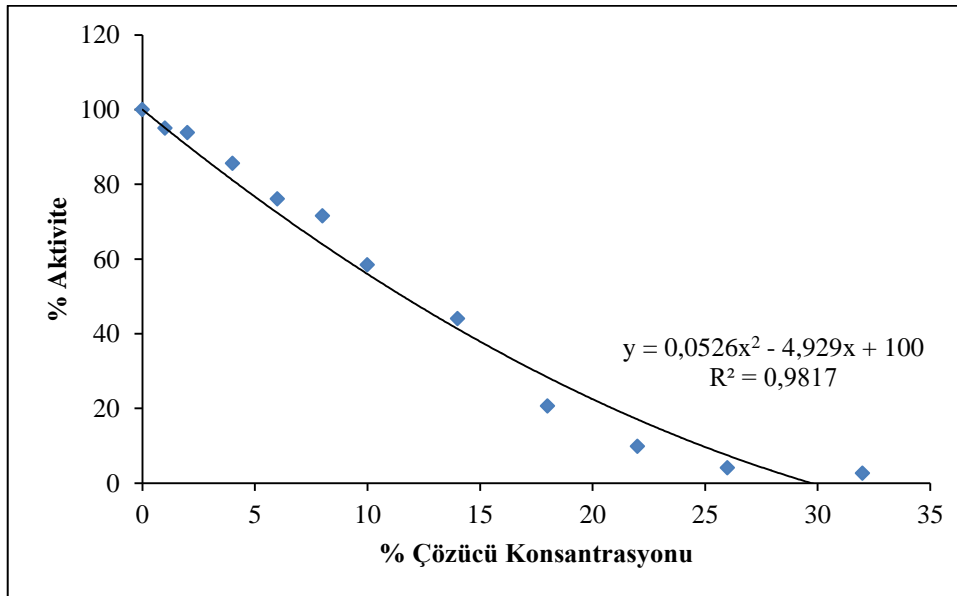
3.3.2. Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Çalışmamızda, 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) 12 farklı konsantrasyonda (% 0, %1, %2, %4, %6, %8, %10, %14, %18, %22, %26, %32)

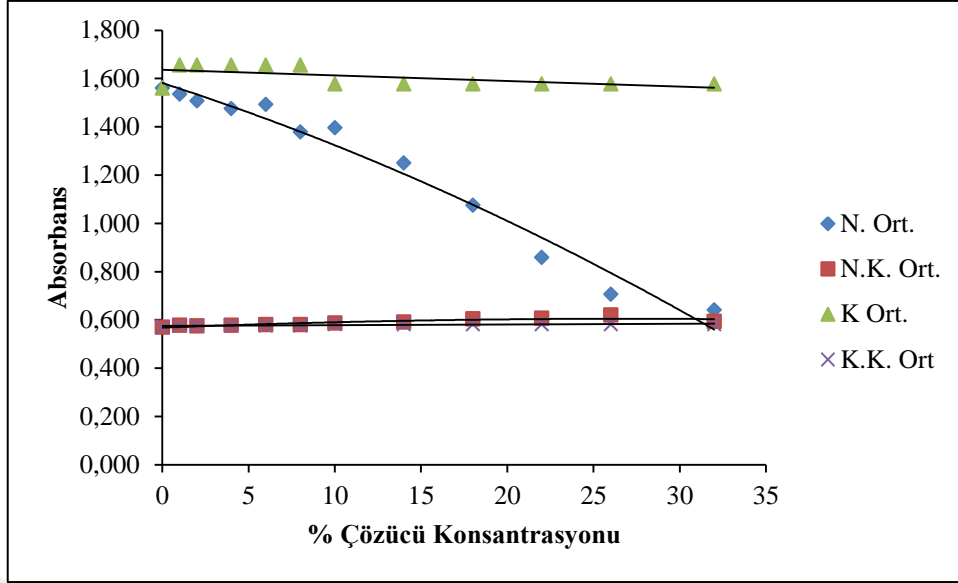
sıgır CA (BCA) aktivitesi üzerine etkisine CA'nın esteraz aktivite yöntemiyle ilk defa bakılmıştır. BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) eğrilerinin grafikleri ve % Çözücü konsantrasyonuna karşı % aktivite grafikleri Şekil 110-119' da verilmiştir.



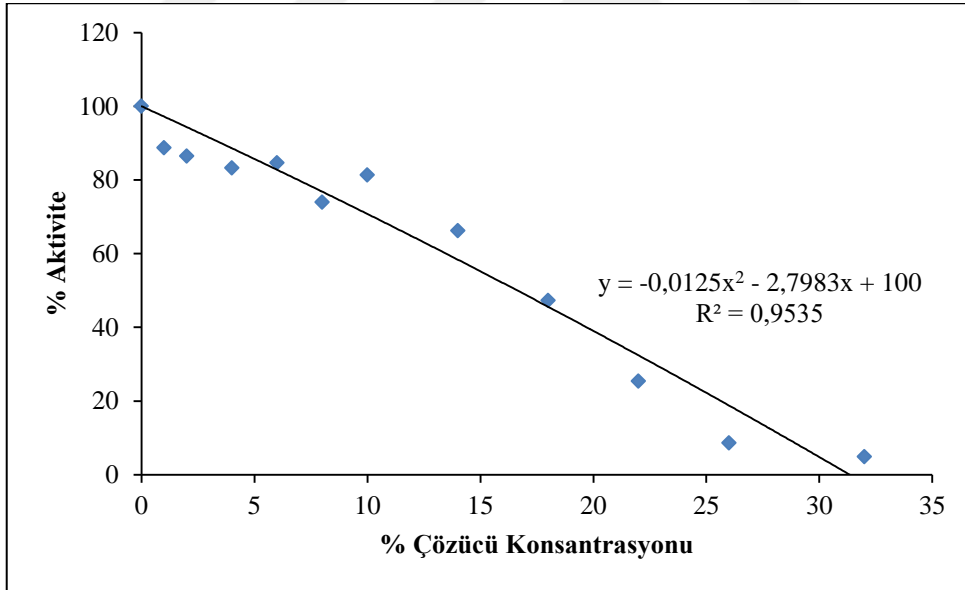
Şekil 110. Asetonitrilin BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



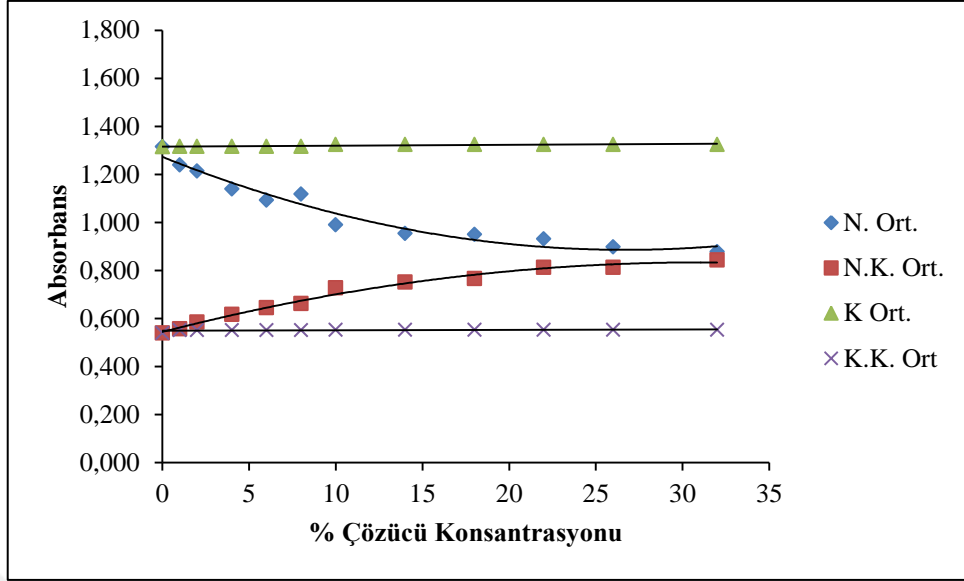
Şekil 111. Asetonitrilin BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi



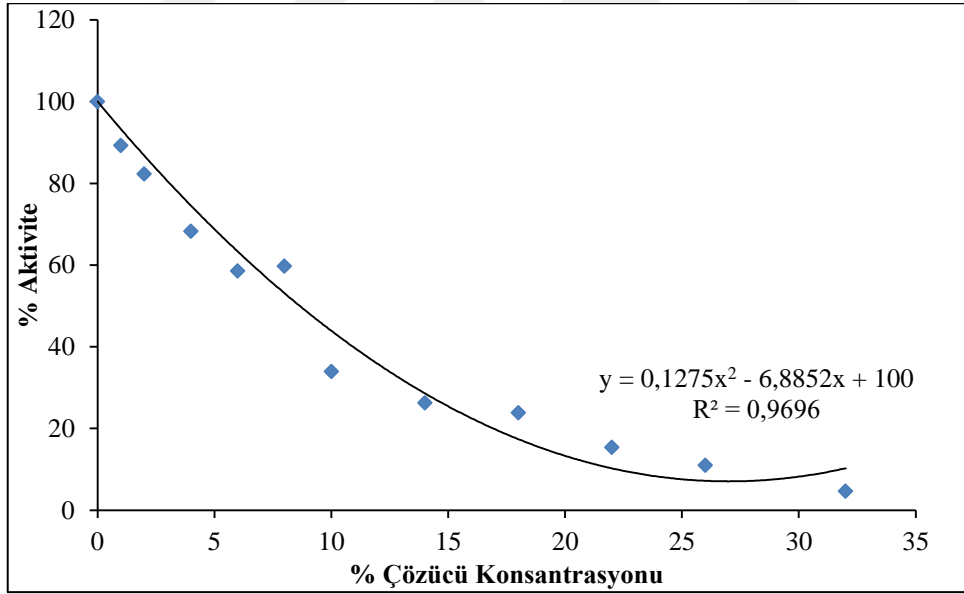
Şekil 112. Asetonun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



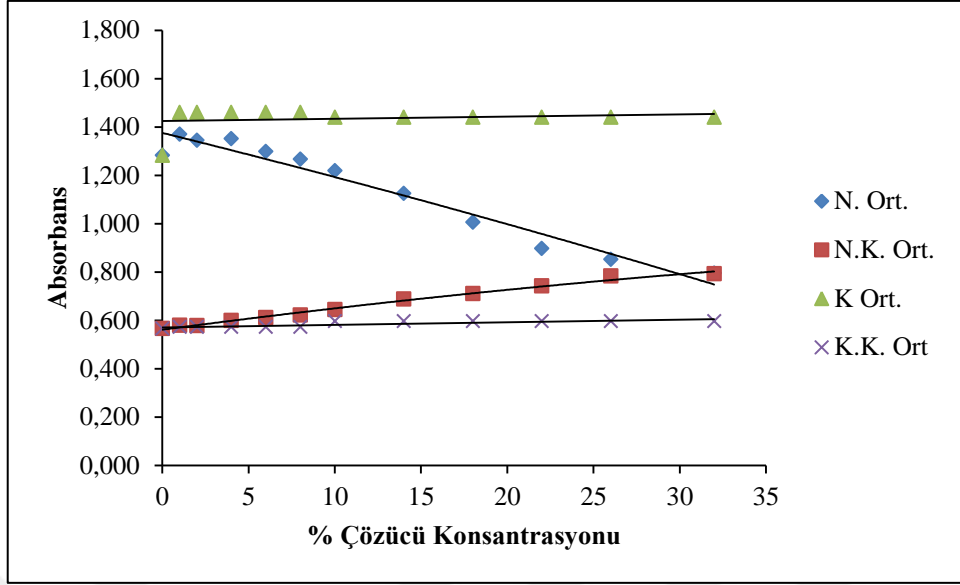
Şekil 113. Asetonun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi



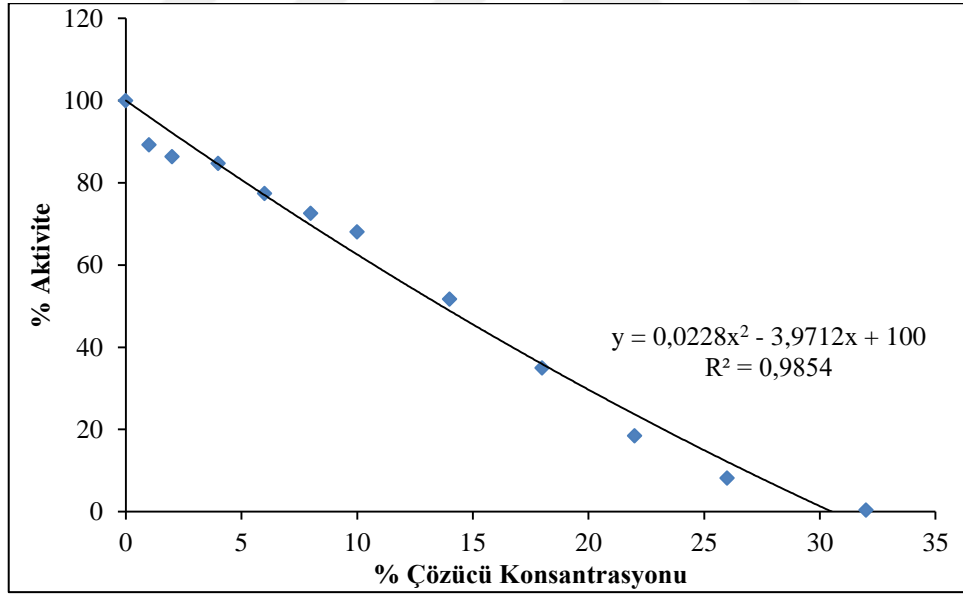
Şekil 114. Metanolün BCA'nın esterez aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



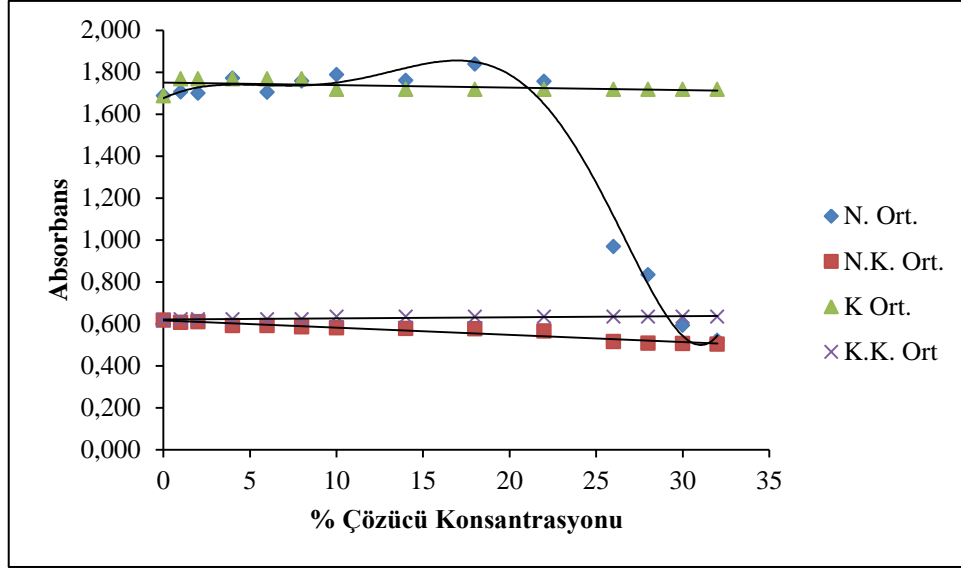
Şekil 115. Metanolün BCA'nın esterez aktivitesi üzerine etkisi



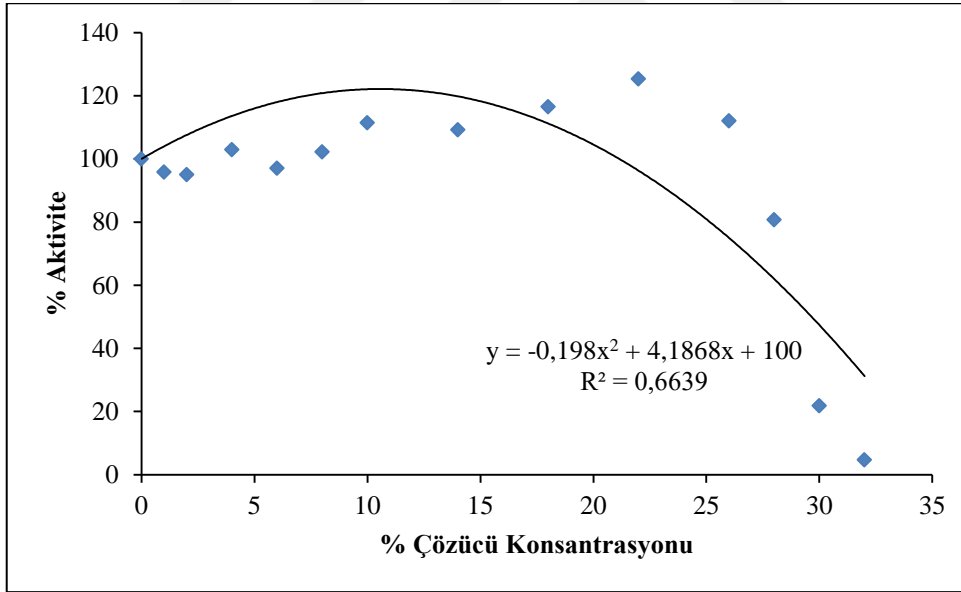
Şekil 116. Etanolün BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri



Şekil 117. Etanolün BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 118. DMSO'nun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesinde kullanılan N (Numune), NK (Numune Körü), K (Kontrol), KK (Kontrol Körü) Eğrileri

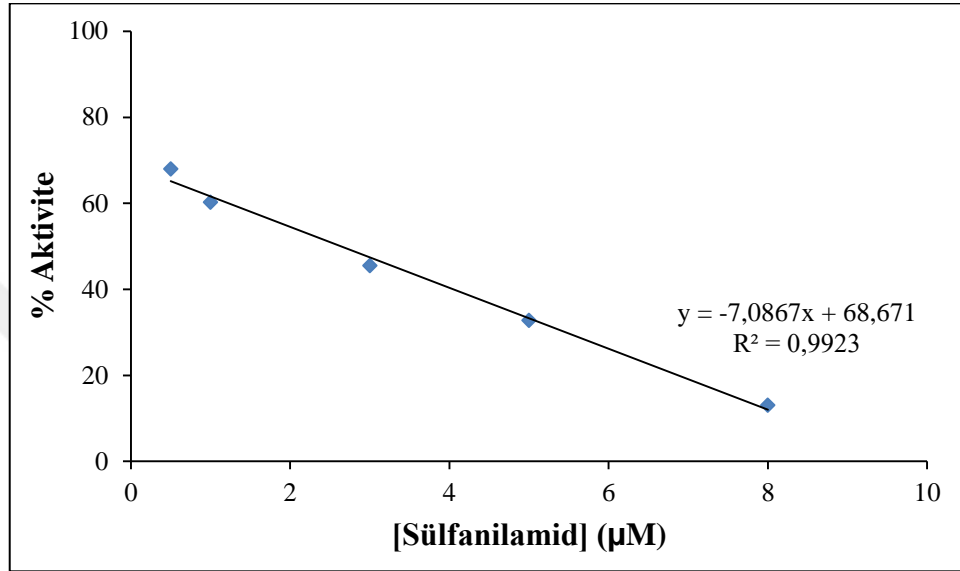


Şekil 119. DMSO'nun BCA'nın esteraz aktivitesi üzerine etkisi

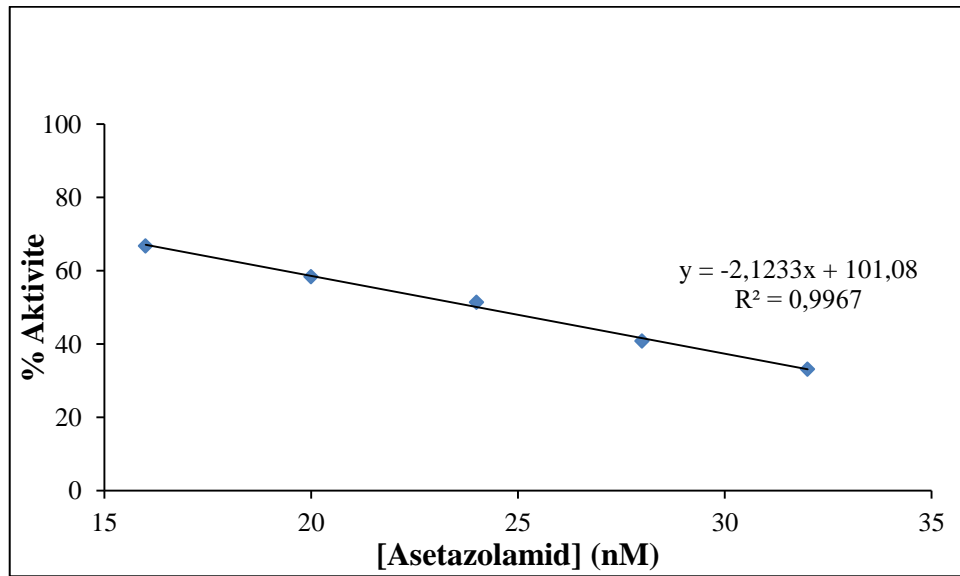
3.3.3. BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Doygun substrat konsantrasyonunda sığır eritrosit BCA enzimi için CA'nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

araştırılmıştır. Ölçümler hidrataz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmıştır. Sülfanilamid için IC_{50} değeri 2,6 μ M ve asetazolamid için bu değer 24 nM olarak bulunmuştur (Şekil 120-121).



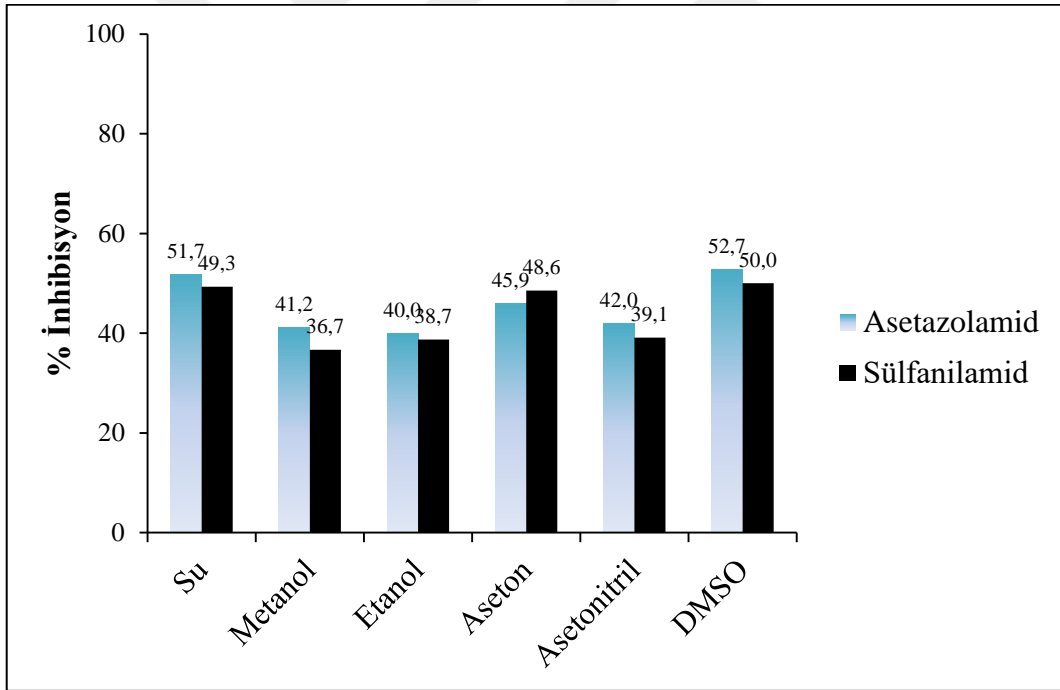
Şekil 120. BCA enziminin hidrataz aktivite yöntemi ile çalışılan 5 farklı sülfanilamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği



Şekil 121. BCA enziminin hidrataz aktivite metodu ile çalışılan 5 farklı asetazolamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Asetazolamid] grafiği

3.3.4. Hidrataz Aktivite Tayin Metoduyla IC₅₀ Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sülfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamidin %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonunda organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) tek konsantrasyonda (%10) sığır CA (BCA) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamid IC₅₀ konsantrasyonunda enzimi %50 inhibe ederken %10 konsantrasyonda organik çözücünün BCA aktivitesini nasıl etkilediğinin sonuçları Şekil 122, Tablo 18' de gösterilmiştir.



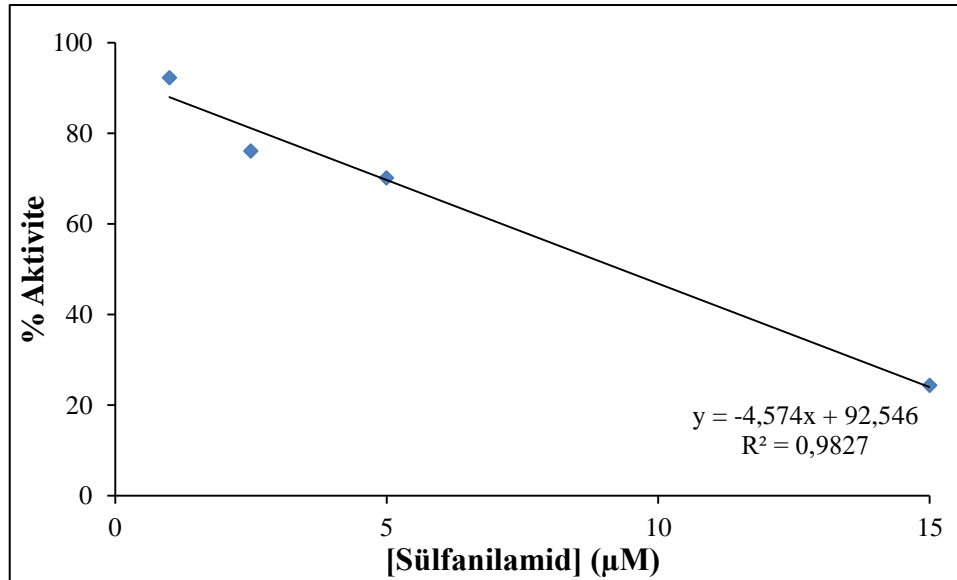
Şekil 122. Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

Tablo 18. Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC₅₀ değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

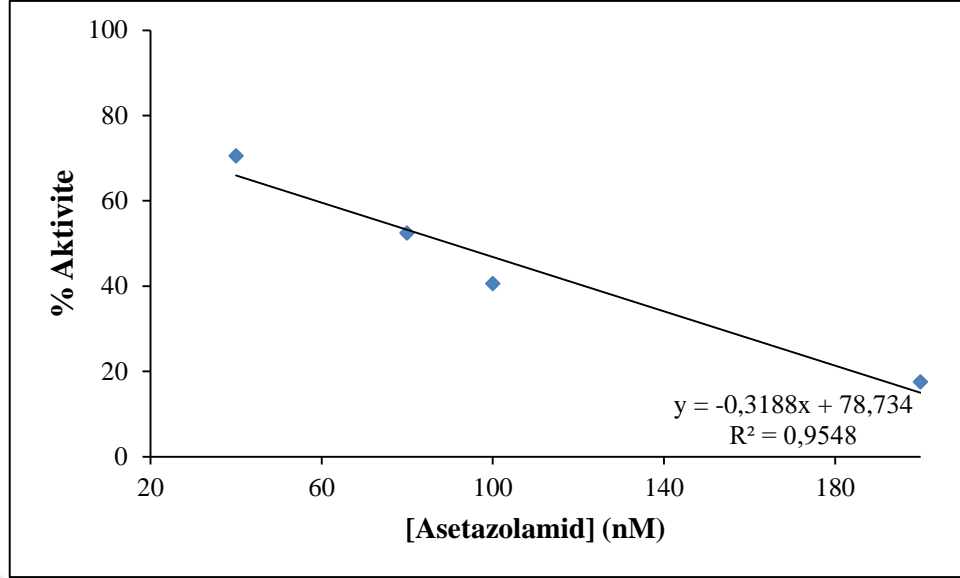
Hidrataz	Asetazolamid (IC ₅₀)(nM)	Sülfanilamid (IC ₅₀)(μM)
Su	23,3	2,7
Metanol	29,2	3,6
Etanol	30,1	3,4
Aseton	26,2	2,7
Asetonitril	28,6	3,4
DMSO	22,8	2,6

3.3.5. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin Belirlenmesi

Doygun substrat konsantrasyonunda sığır eritrosit BCA enzimi için CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ölçümler esteraz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilip, bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplanmıştır. Sülfanilamid için IC₅₀ değeri 9,3 μM ve asetazolamid için bu değer 90 nM olarak bulunmuştur (Şekil 123-124).



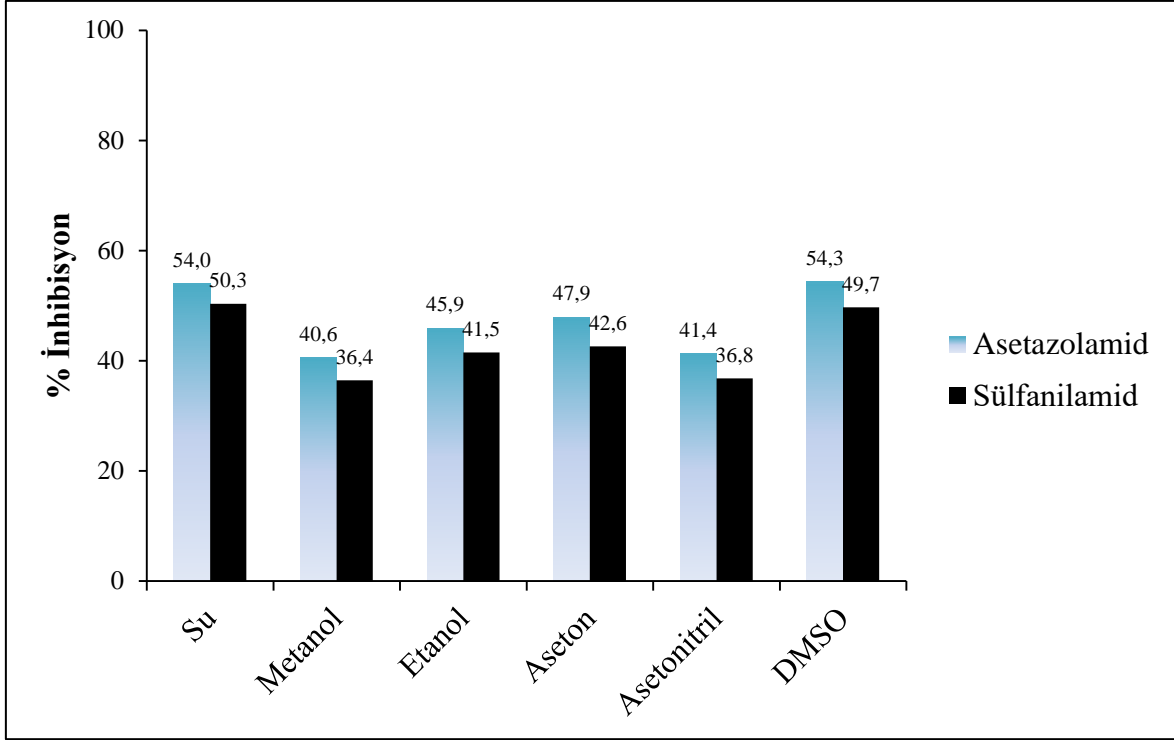
Şekil 123. BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı sülfanilamid konsantrasyonunda IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği



Şekil 124. BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı asetazolamid konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Asetazolamid] grafiği

3.3.6. Esteraz Aktivite Tayin Metoduyla IC_{50} Değeri Belirlenen Asetazolamid ve Sülfanilamid Varlığında Organik Çözücülerin BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Esteraz aktivite tayin metoduyla IC_{50} değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamidin %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonunda organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) tek konsantrasyonda (%10) sıgır CA (BCA) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamid IC_{50} konsantrasyonunda enzimi %50 inhibe ederken %10 konsantrasyonda organik çözücünün BCA aktivitesini nasıl etkilediğinin sonuçları Şekil 125, Tablo 19'da gösterilmiştir.



Şekil 125. Esteraz aktivite tayin metoduyla IC_{50} değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi

Tablo 19. Esteraz aktivite tayin metoduyla IC_{50} değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamid varlığında organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

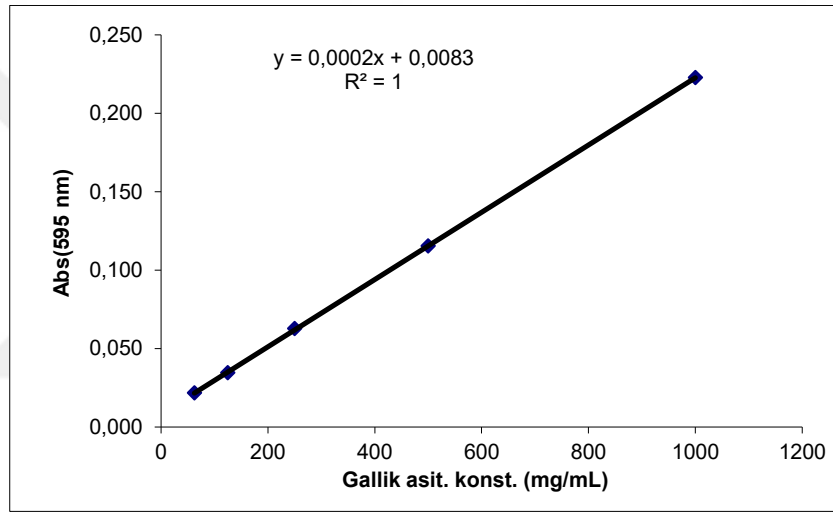
Esteraz	Asetazolamid (IC_{50})(nM)	Sülfanilamid (IC_{50})(μ M)
Su	83,4	9,2
Metanol	111,1	12,8
Etanol	98,1	11,2
Aseton	94,0	10,9
Asetonitril	109,0	12,6
DMSO	83,0	9,4

3.4. Bitki Ekstraktlarında Spektrofotometrik Toplam Fenolik Madde Tayini Bulguları

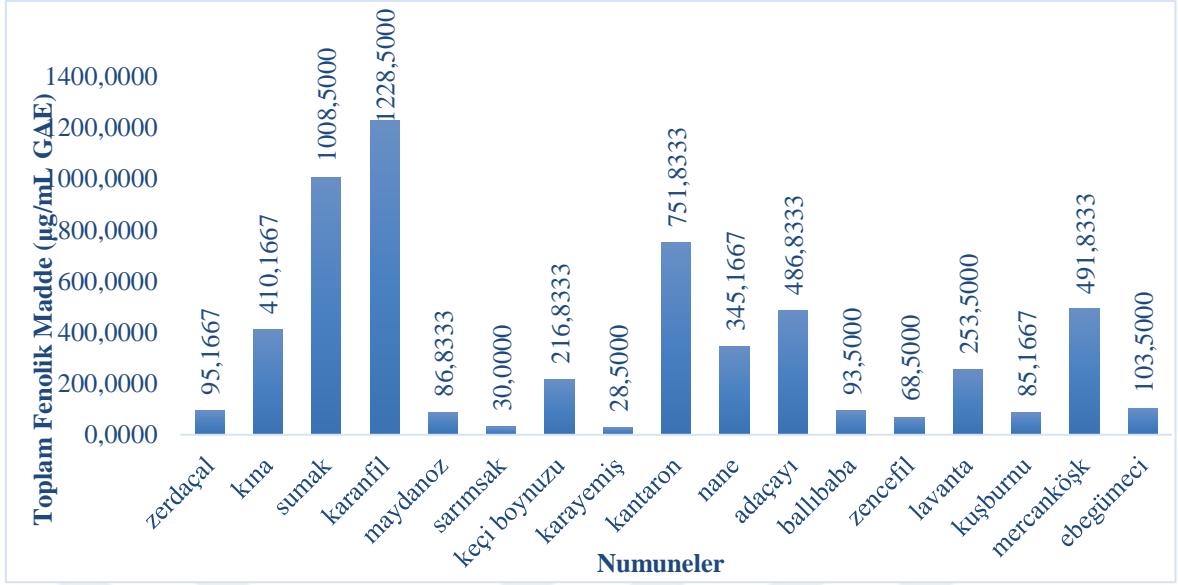
Sulu ekstraktları hazırlanan bitki numunelerinin toplam fenolik içeriği, literatürde sıklıkla tercih edilen antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden biri olan Folin-Ciocalteu ile belirlenmiştir. Gallik asit (GA) ve kateşin (CA) standartlarının farklı konsantrasyonları ile oluşturulan kalibrasyon eğrileri toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde

kullanılmıştır (Şekil 126, Şekil 128) Numunelerin fenolik madde içerikleri, standartların grafiklerinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak, 765 nm’de, mL numune başına eşdeğer miktarda mikrogram (μg) gallik asit veya kateşinin artan konsantrasyonlarına karşılık gelen değerler grafiğe geçirilerek belirlenmiştir (Şekil 127, Şekil 129).

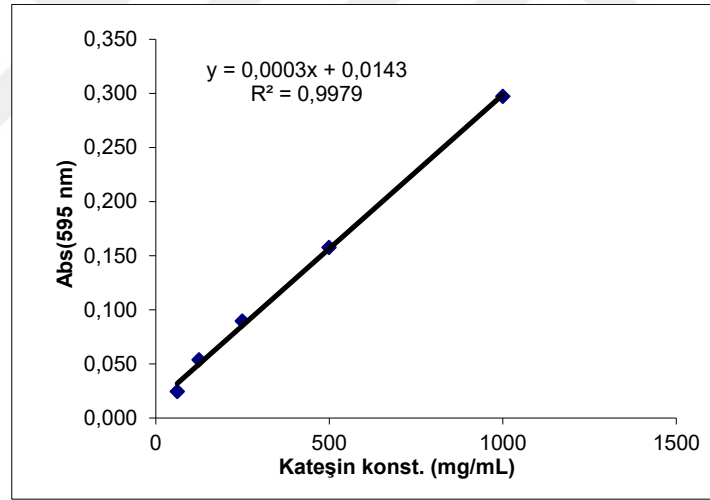
Sulu ekstraktları çalışılan bitki numunelerinin toplam fenolik madde içeriğine bakıldığı zaman karanfil, sumak ve kantaronun hem GAE hem de CE cinsinden en yüksek fenolik bileşene sahip olduğu görülmüştür (Şekil 127, Şekil 129). Fenolik içeriği en düşük numunenin ise sarımsak olduğu belirlenmiştir.



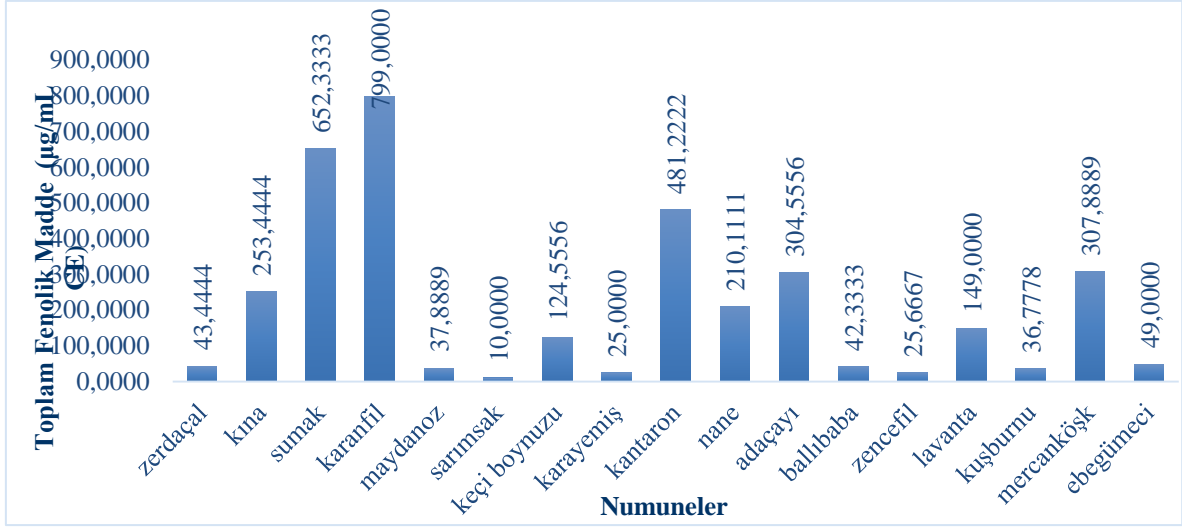
Şekil 126. Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak kullanılan gallik asitin farklı konsantrasyonlarına karşı 765 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiği



Şekil 127. 17 bitki ekstraktına ait toplam fenolik madde miktarları (mL numunede eşdeğer miktarda µg gallik asit)



Şekil 128. Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak kullanılan kateşinin farklı konsantrasyonlarına karşı 765 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiği

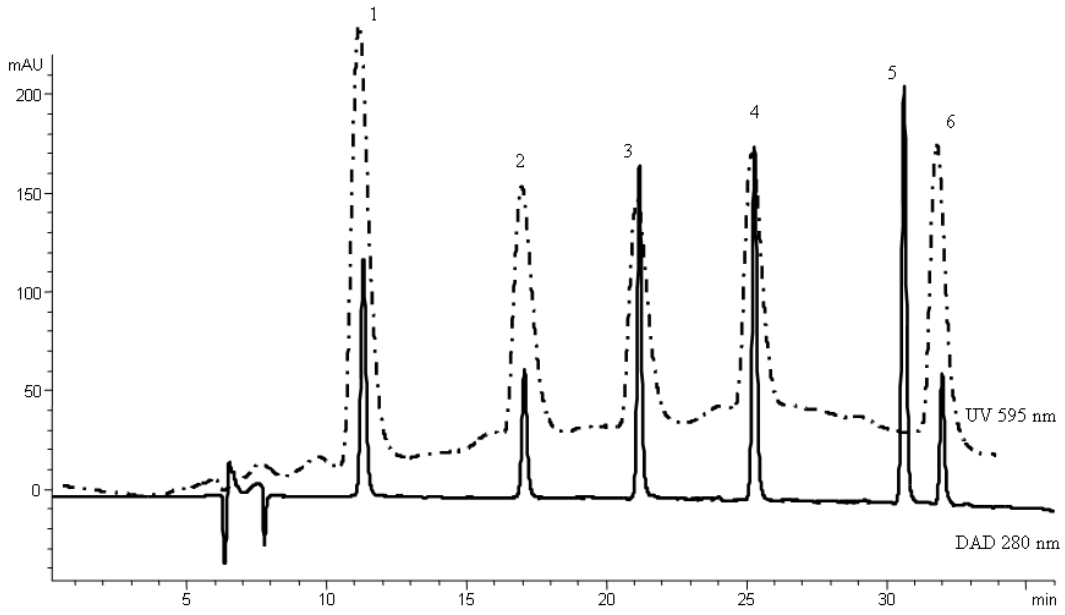


Şekil 129. 17 bitki ekstraktına ait toplam fenolik madde miktarları (mL numunede eşdeğer miktarda µg kateşin)

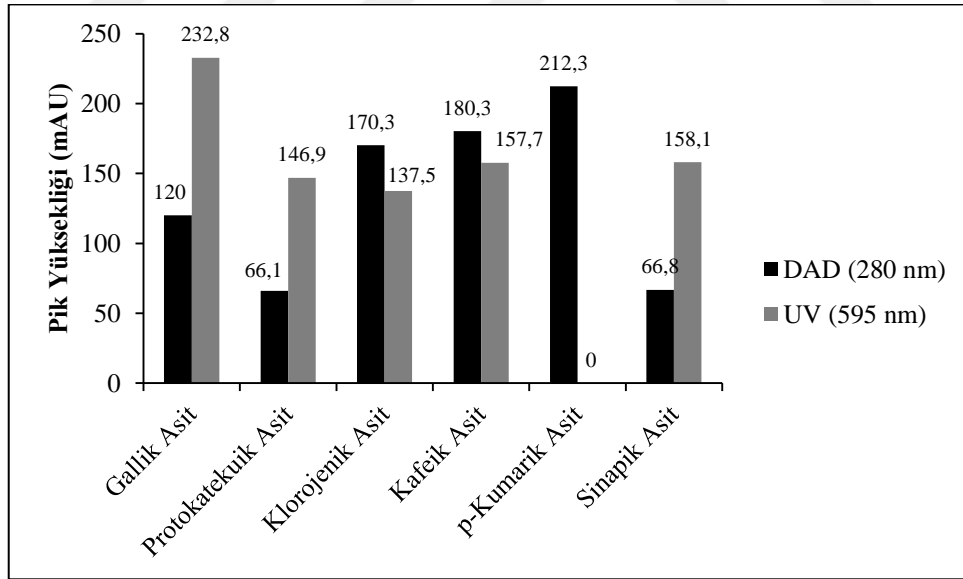
3.5. On-line HPLC-Biyoaktivite Çalışma Bulguları

3.5.1. On-line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Bulguları

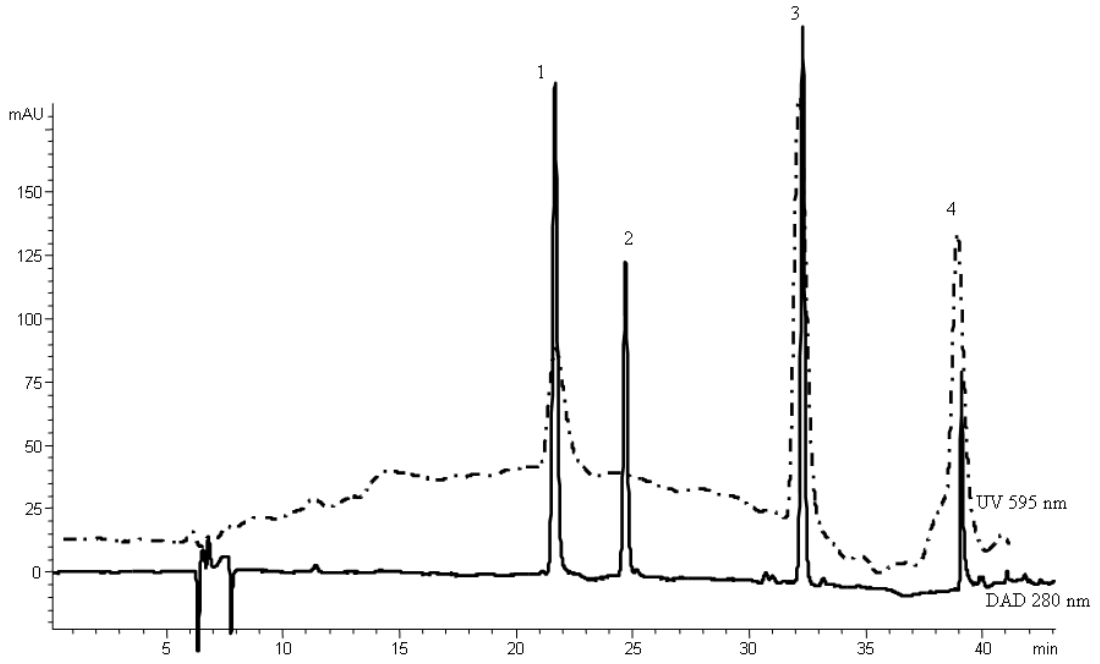
Her bir standart konsantrasyonunun 500 µM olduğu gallik asit, protokatekuik asit, klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, sinapik asit, protokatekualdehit, vanilik asit, ferulik asit, kuersetin, *p*-hidroksibenzoik asit, siringik asit, siringaldehit, benzoik asitin 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları elde edilmiştir (Şekil 130, 132, 134). Standartlardan *p*-kumarik asit, vanilik asit, *p*-hidroksibenzoik asitin FRAP aktivitesi açısından inaktif olduğu görülmüştür (Şekil 131, 133, 135). Daha sonra 10 mg/mL konsantrasyondaki adaçayı, sarı kantaron, karanfil ve sumak numuellerinin asetonitrilli ekstraktları aynı şartlar altında yürütülmüştür. Elde edilen kromatogramlar Şekil 136-139’da verilmiştir.



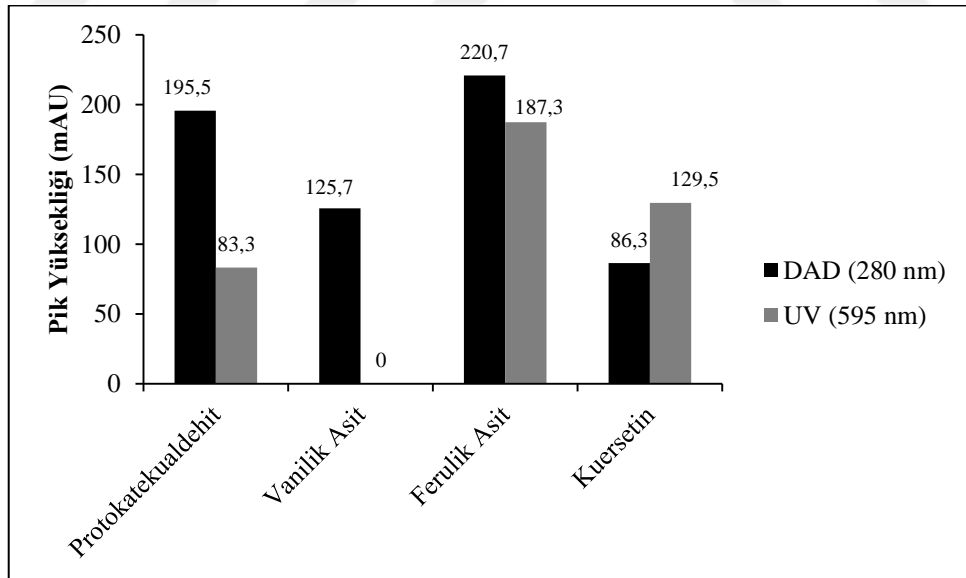
Şekil 130. Standartların 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları (1) gallik asit, (2) protokatekuiik asit, (3) klorojenik asit, (4) kafeik asit, (5) p-kumarik asit, (6) sinapik asit (her bir standart konsantrasyonu 500 μ M)



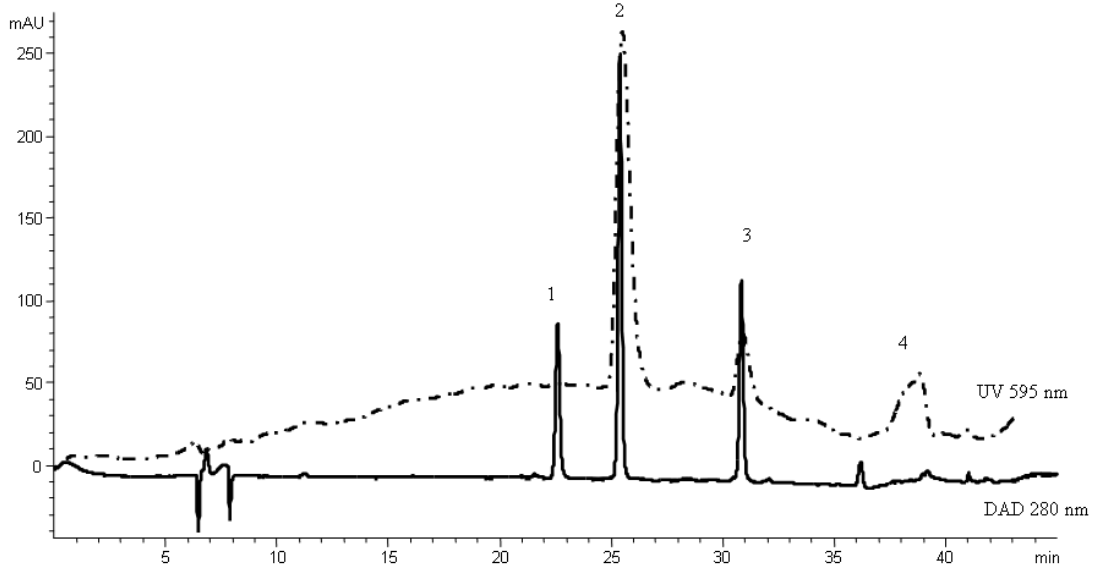
Şekil 131. Standartların 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm’deki pik yükseklikleri (mAU)



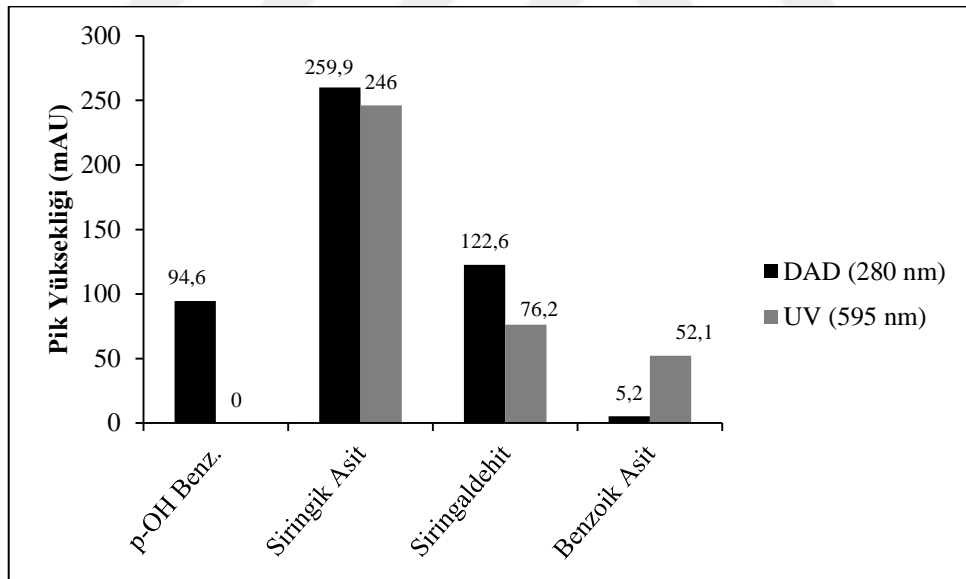
Şekil 132. Standartların 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları (1) protokatekualdehit, (2) vanilik asit, (3) ferulik asit, (4) kuersetin (her bir standart konsantrasyonu 500 μ M)



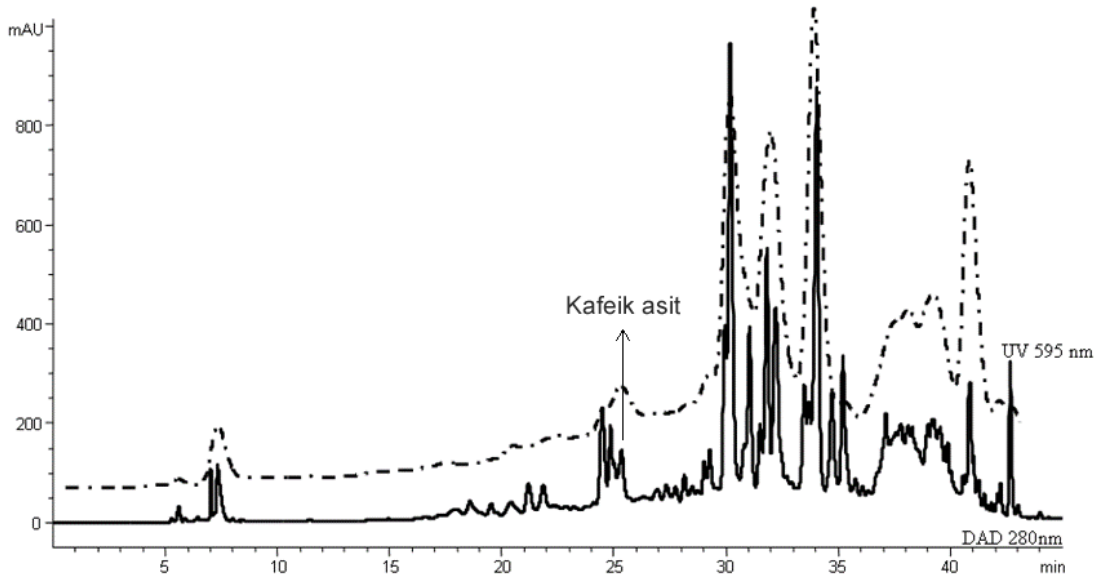
Şekil 133. Standartların 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm’deki pik yükseklikleri (mAU)



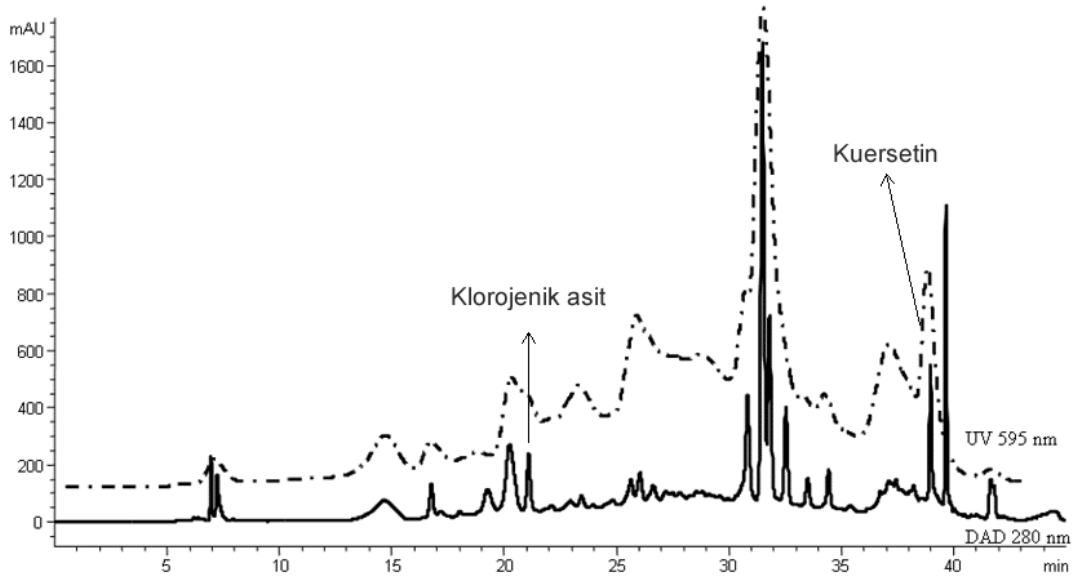
Şekil 134. Standartların 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası kromatogramları (1) p-hidroksibenzoik asit, (2) sirngik asit, (3) sirngaldehit, (4) benzoik asit (her bir standart konsantrasyonu 500 µM)



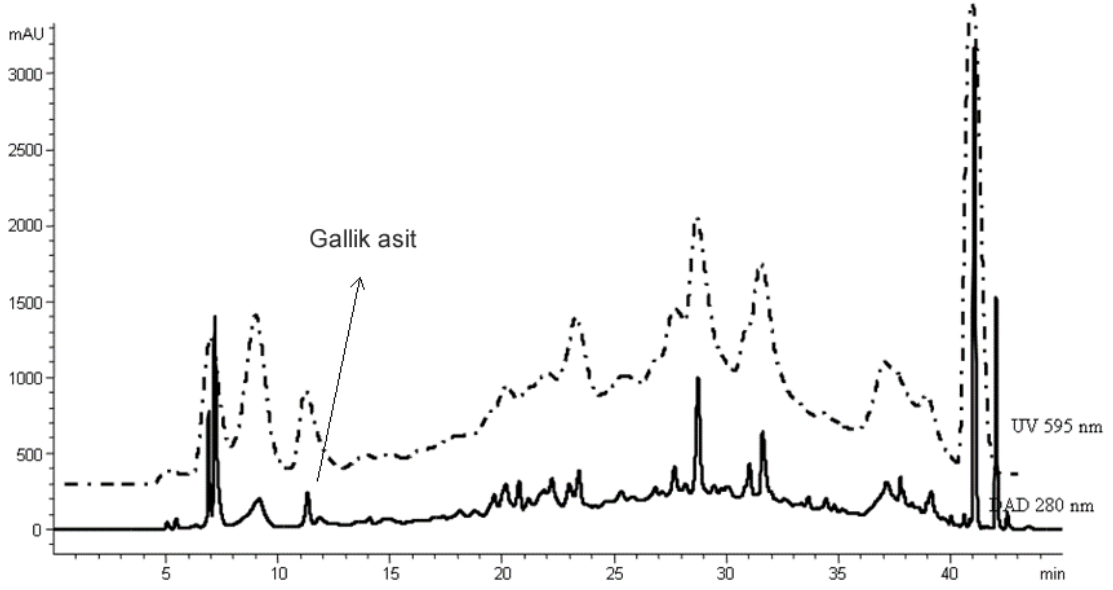
Şekil 135. Standartların 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm’deki pik yükseklikleri (mAU)



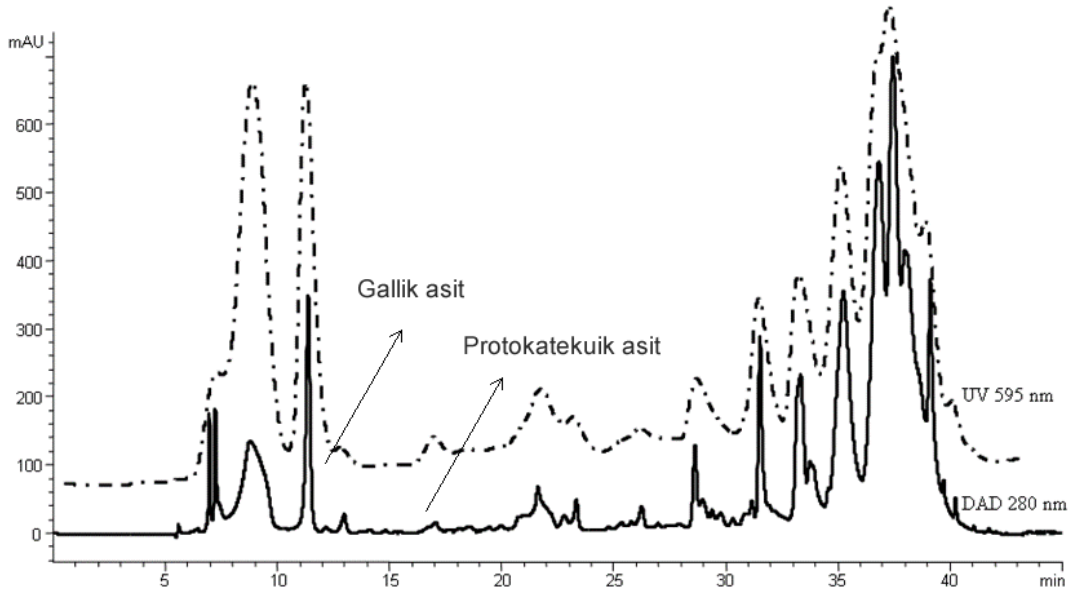
Şekil 136. Adaçayının (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları



Şekil 137. Sarı kantaronun (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm’de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları



Şekil 138. Karanfilin (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları

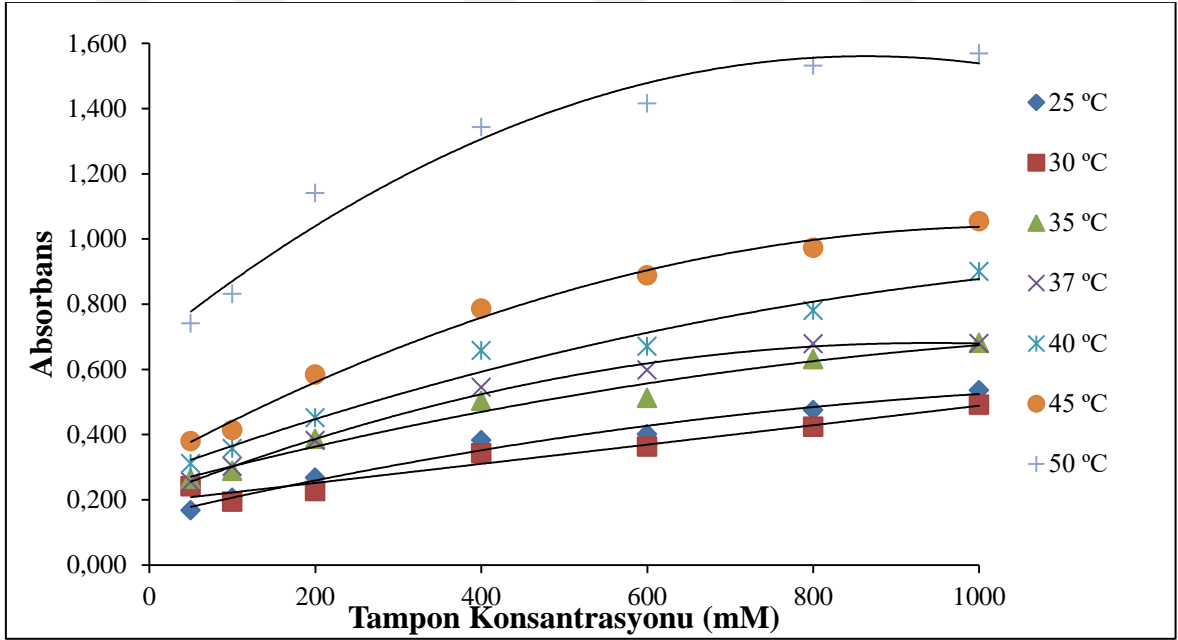


Şekil 139. Sumağın (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları

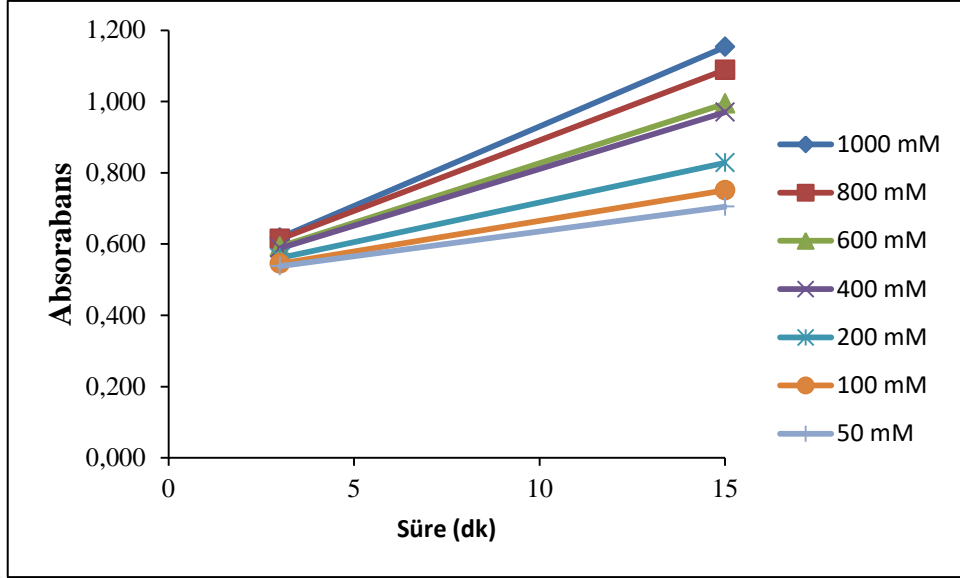
3.5.2. On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yöntem Bulguları

3.5.2.1. BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

pH' sı 7,4 olan 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM) Tris-SO₄ tamponunun enzim aktivitesi üzerine etkisine esteraz aktivite tayin yöntemiyle bakılmıştır. Aynı zamanda her bir tampon konsantrasyonunun 7 farklı sıcaklık değerinde (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 °C) enzim aktivitesine bakılarak enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tampon konsantrasyonu arttıkça enzimin aktivitesinin arttığı görülmüştür (Şekil 140, 141).



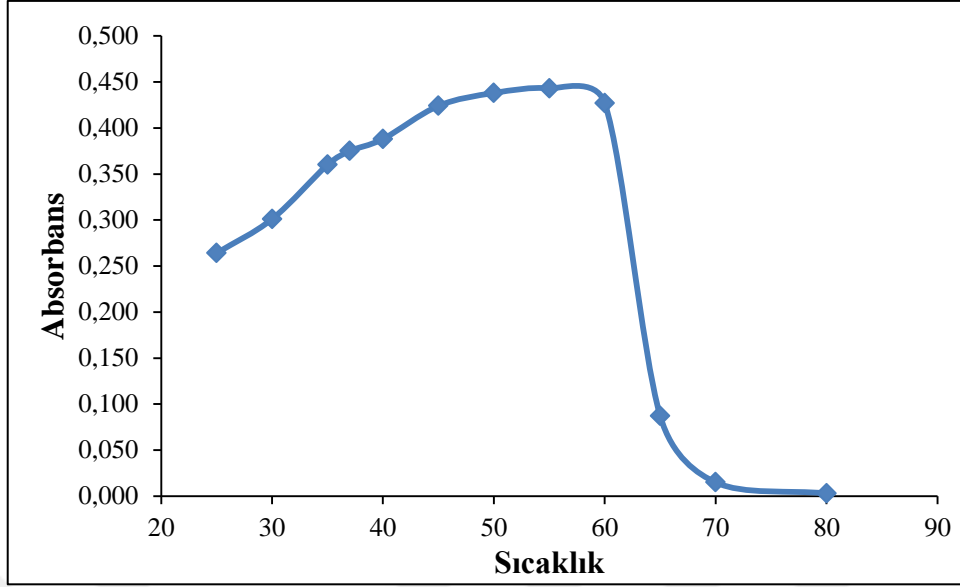
Şekil 140. BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi



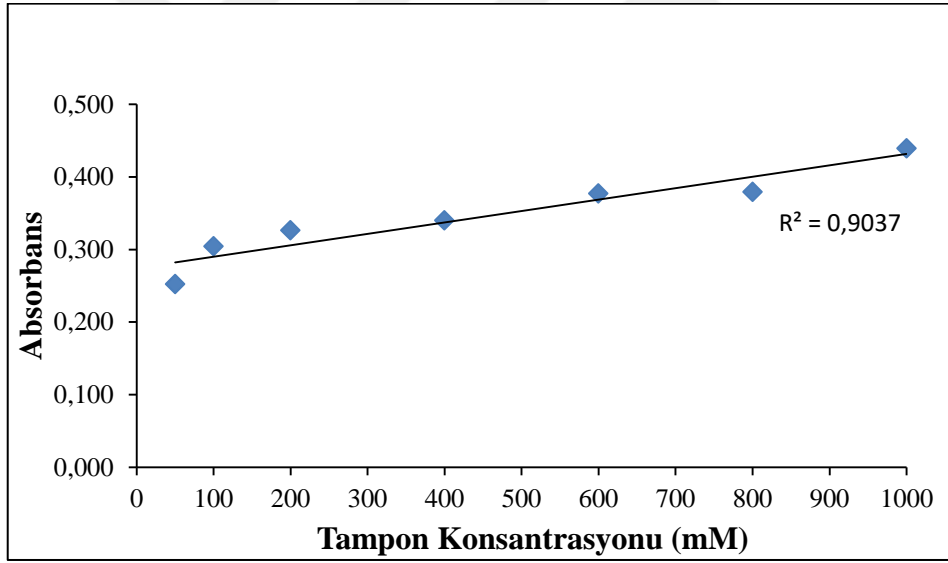
Şekil 141. 25°C sıcaklık değerinde BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi

3.5.2.2. BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

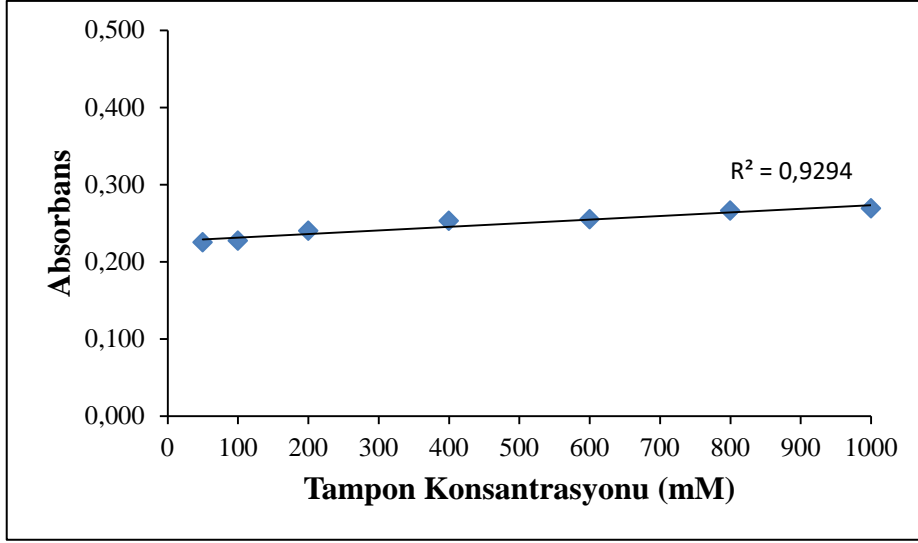
7 farklı sıcaklık değerinde (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 °C) enzim aktivitesinin etkilenmediği görülmüştür. Sıcaklık aralığı değiştirilerek pH' sı 7,4 olan tek tampon konsantrasyonunda (100 mM) 12 farklı sıcaklık değerinde (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80 °C) çalışılıp, enzimin optimum sıcaklık değeri 50 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 131). Enzimin optimum sıcaklık değeri belirlendikten sonra hem optimum sıcaklık değerinde hem de 37 °C' de (vücut sıcaklığında) 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan (50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM) Tris-SO₄ tamponunun enzim aktivitesi üzerine etkisine bakılmıştır (Şekil 142-144).



Şekil 142. BCA enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



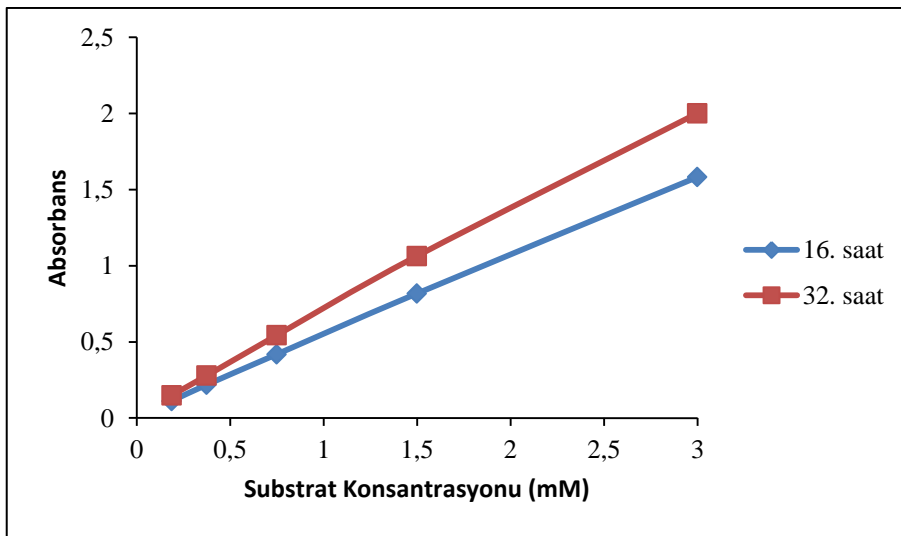
Şekil 143. 37°C sıcaklık değerinde (vücut sıcaklığında) BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi



Şekil 144. 50°C sıcaklık değerinde BCA enziminin aktivitesi üzerine tampon konsantrasyonunun etkisi

3.5.2.3. Substrat Çözeltisinin Bozunmasına Bağlı Absorbans Değişimi

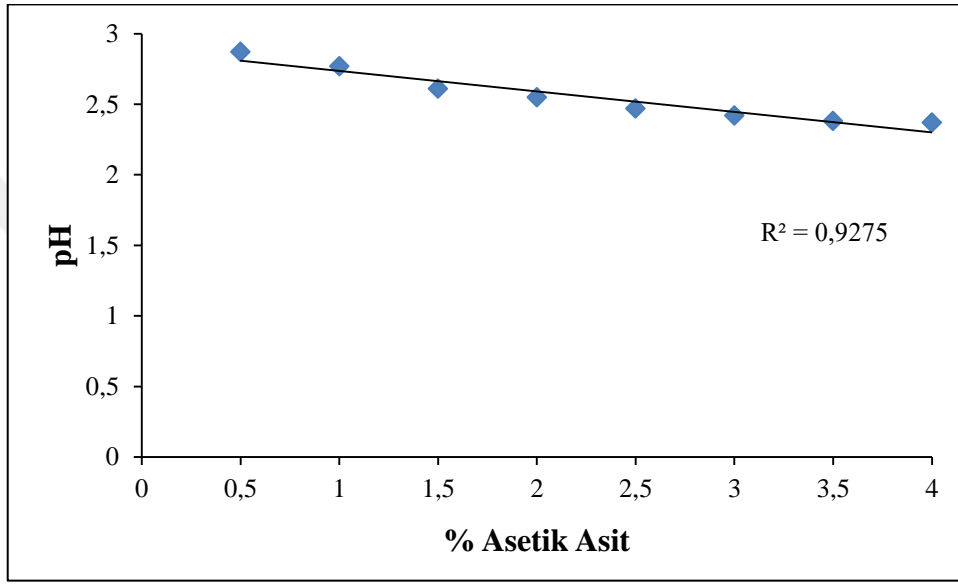
Karbonik anhidrazın esteraz aktivite tayin yönteminde kullanılan substratı olan *p*-nitrofenil asetat zamanla bozunduğundan absorbans değişimine bakılmıştır. Hazırlanan substrat 16 ve 32 saat sonrasında 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 seyreltilerek absorbansları spektrofotometrede okunmuştur (Şekil 145).



Şekil 145. Hazırlanan substrat 16 ve 32 saat sonrasında 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 seyreltilerek spektrofotometrede okunmasıyla elde edilen absorbans değerleri

3.5.2.4. Farklı Yüzdelerde Hazırlanan Asetik Asitin pH Değerleri

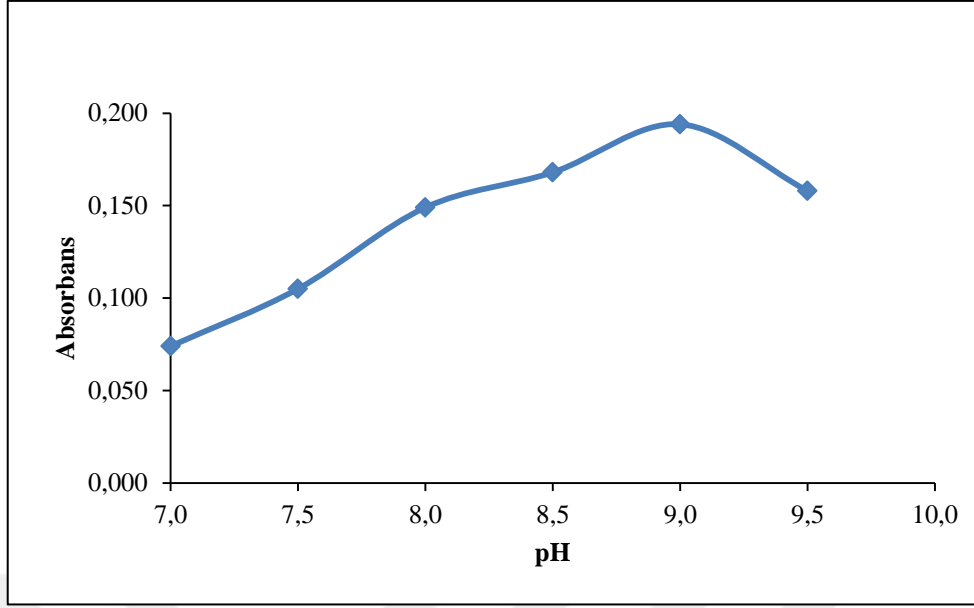
HPLC sisteminde yöntem geliştirirken, hareketli fazın bileşiminin aşamalı olarak değiştiği gradient elusyon kullanılmıştır. Çözücü sistemleri oluşturulmadan ve içeriğindeki asetik asit oranını belirlemeden önce farklı yüzdelerde asetik asit hazırlanarak (%0,5; %1; %1,5; %2; %2,5; %3; %3,5; %4) pH metrede pH' ları ölçülmüştür (Şekil 146).



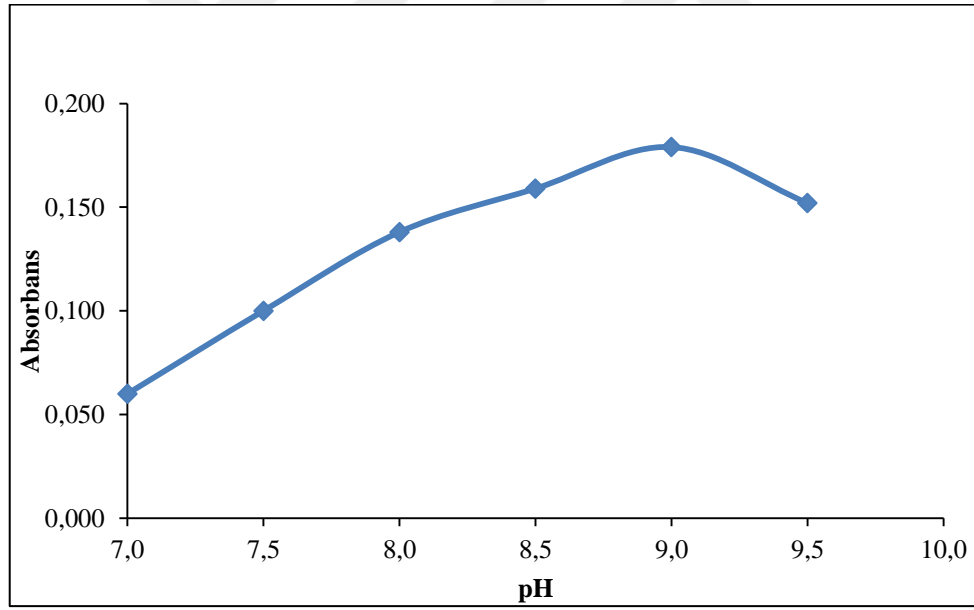
Şekil 146. Farklı yüzdelerde hazırlanan asetik asitin (%0,5; %1; %1,5; %2; %2,5; %3; %3,5; %4) pH değerleri

3.5.2.5. BCA Enziminin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

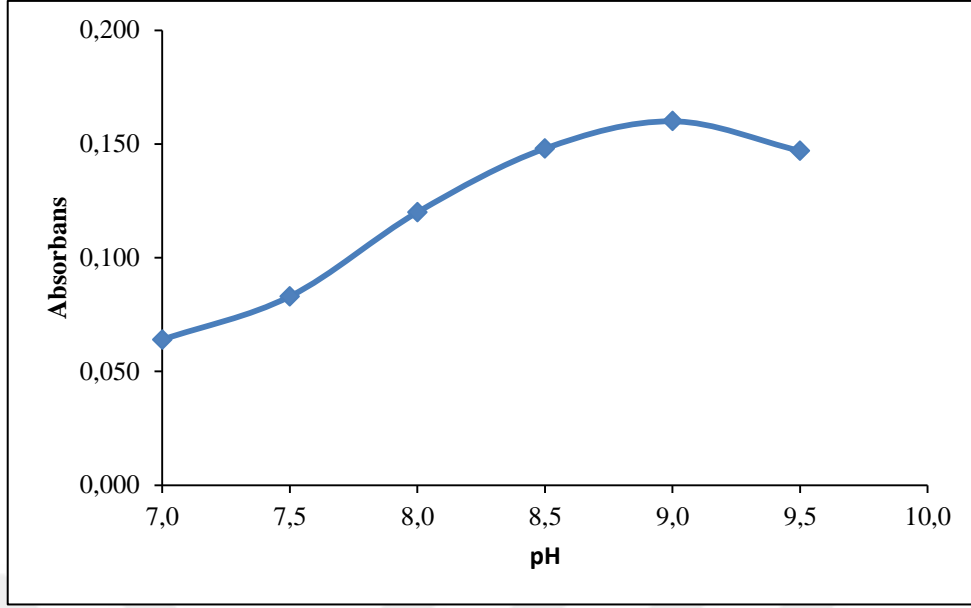
Enzimin optimum pH değerini belirlemek için HPLC gradient programındaki çözücü oranları (%100 su, %90A-%10B, %70A-%30B) ve akış sistemleri esteraz aktivitesine uyarlanarak optimum pH değeri belirlenmiştir. Her üç gradiyent program içinde optimum pH 9 olarak bulunmuştur (Şekil 147-149).



Şekil 147. %100 su ile enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi



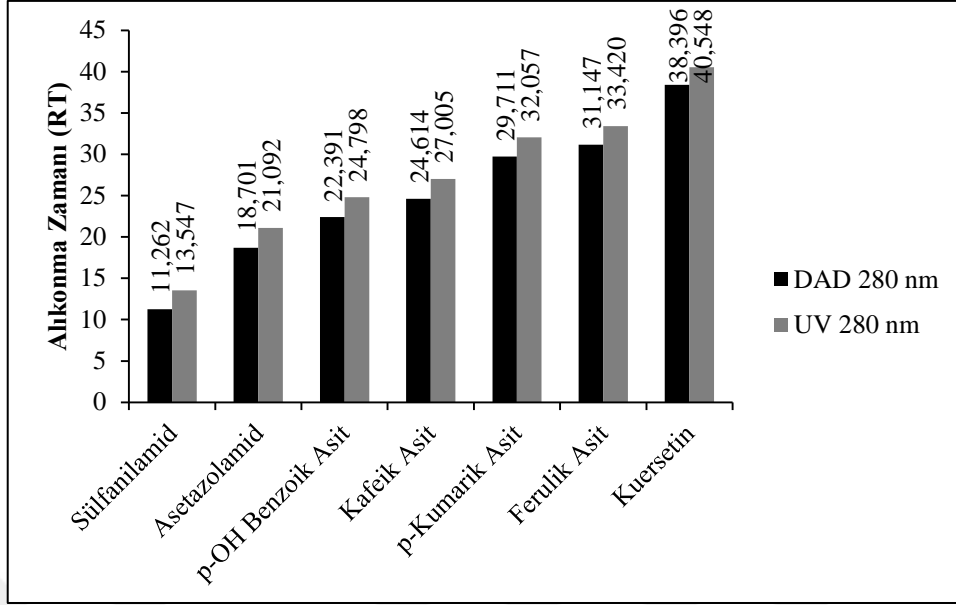
Şekil 148. %90A-%10B gradiyetinde enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi



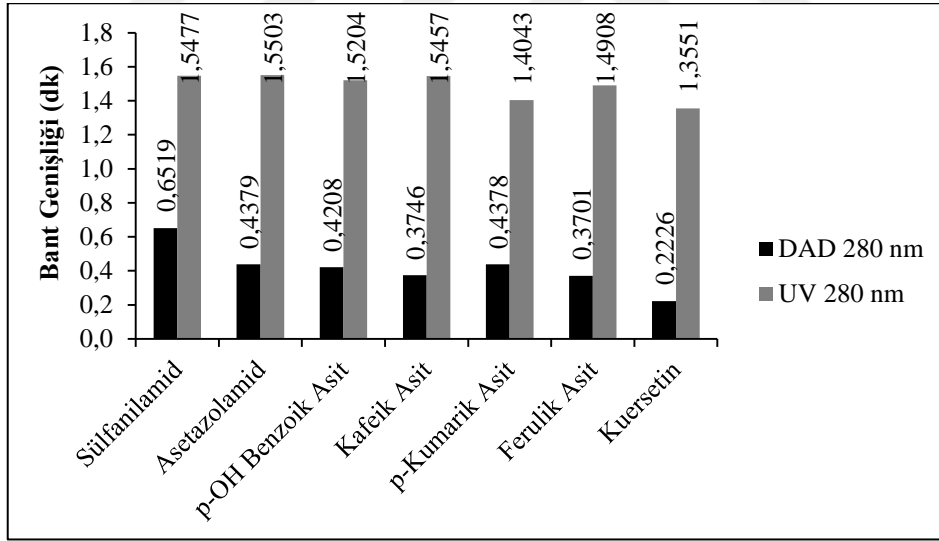
Şekil 149. %70A-%30B gradiyetinde enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi

3.5.2.6. Kromatografik Ayırma Üzerine Mobil Faz İçeriğinin ve Akış Hızının Etkisi

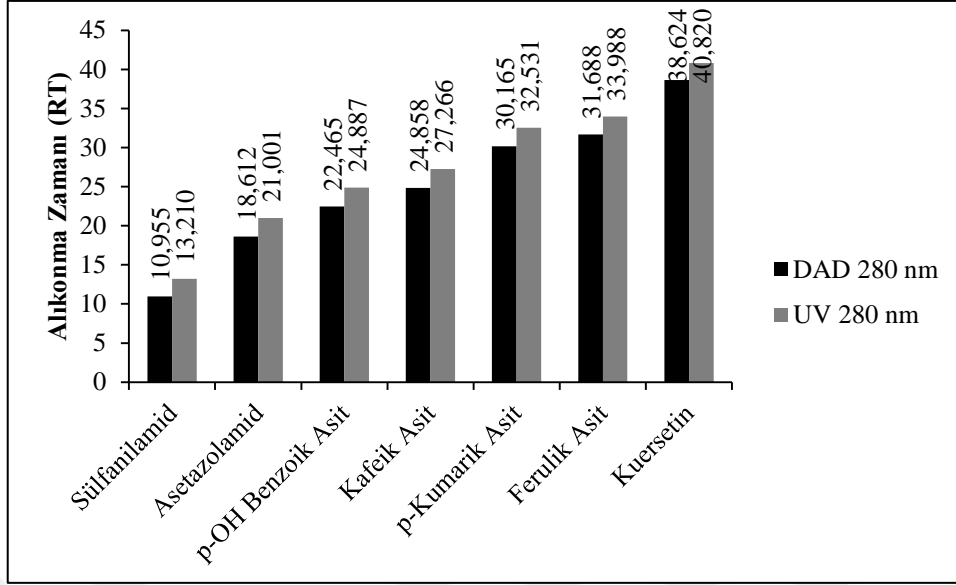
Kromatografik ayırma üzerine mobil faz içeriğinin ve akış hızının etkisini görebilmek için, HPLC ile on-line CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesinde kullanılan standartların (asetazolamid, sülfanilamid, *p*-OH benzoik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kuersetin) her birinin 1mM olduğu standart karışımlar mobil faz 0,5 mL/dk akış hızındayken mobil faz içeriğindeki % asetik asit oranı değiştirilerek (%0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5) yürütülmüştür. DAD 280 nm' de ve UV 280 nm' deki alıkonma zamanları ve bant genişliği grafiğe geçirilmiştir. Aynı akış hızında % asetik asit oranları değişikçe alıkonma zamanlarında göze çarpan bir farklılık görülmezken, %asetik asit oranı azaldıkça her bir standartın spektrumunda bozulmalar ortaya çıkmıştır (Şekil 150-159). Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm' deki ve UV 280 nm' deki kromatogramları da verilmiştir (Şekil 160-161).



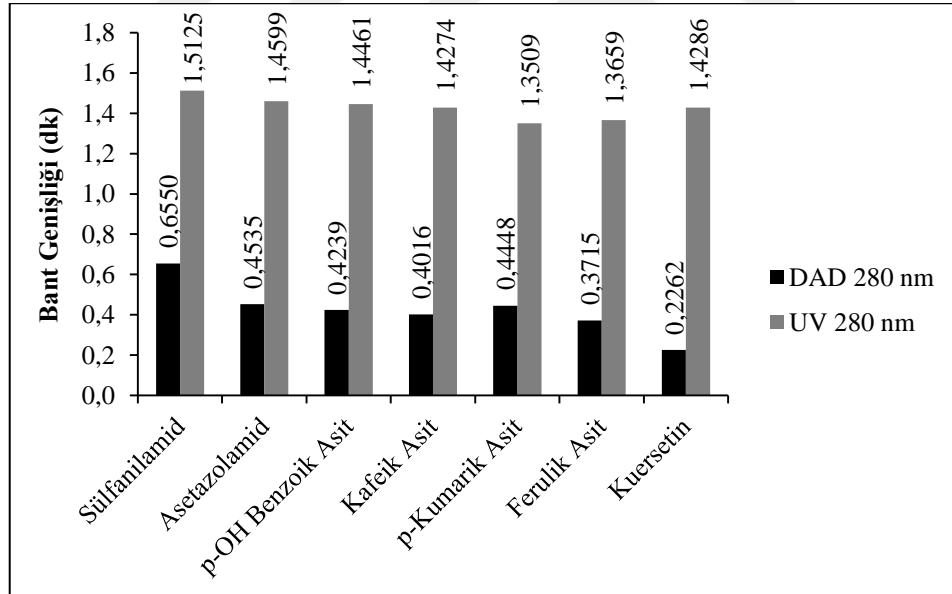
Şekil 150. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alınma zamanları (RT)



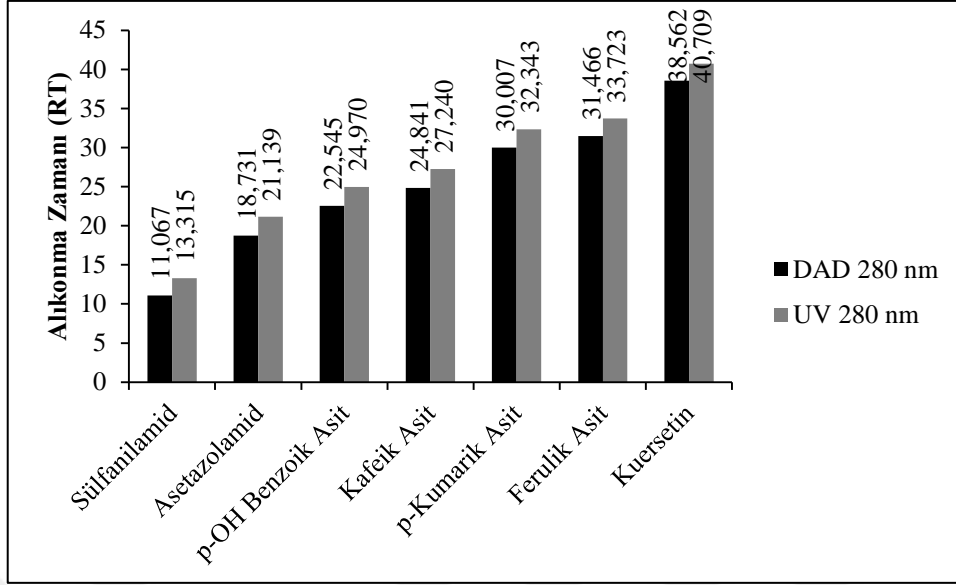
Şekil 151. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)



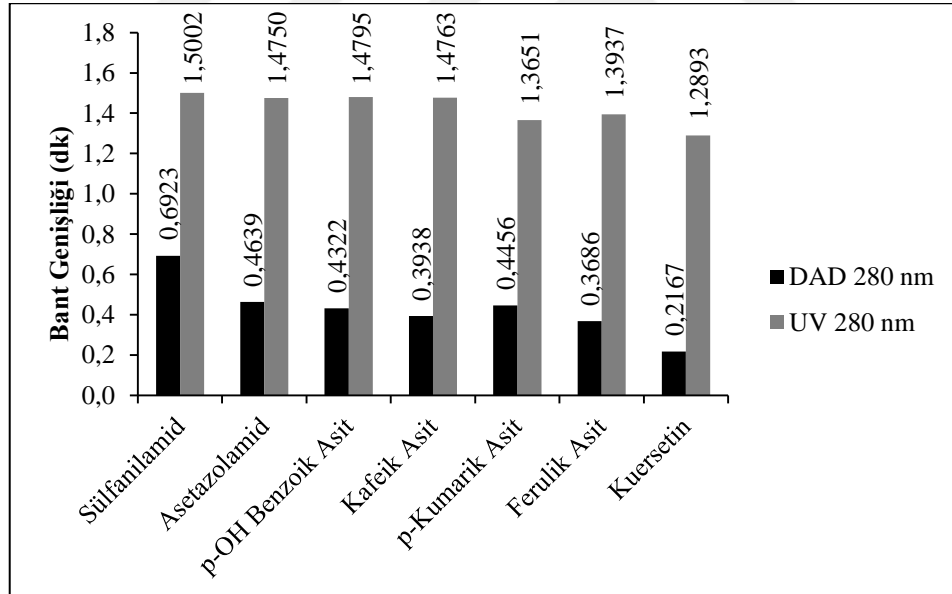
Şekil 152. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,2 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)



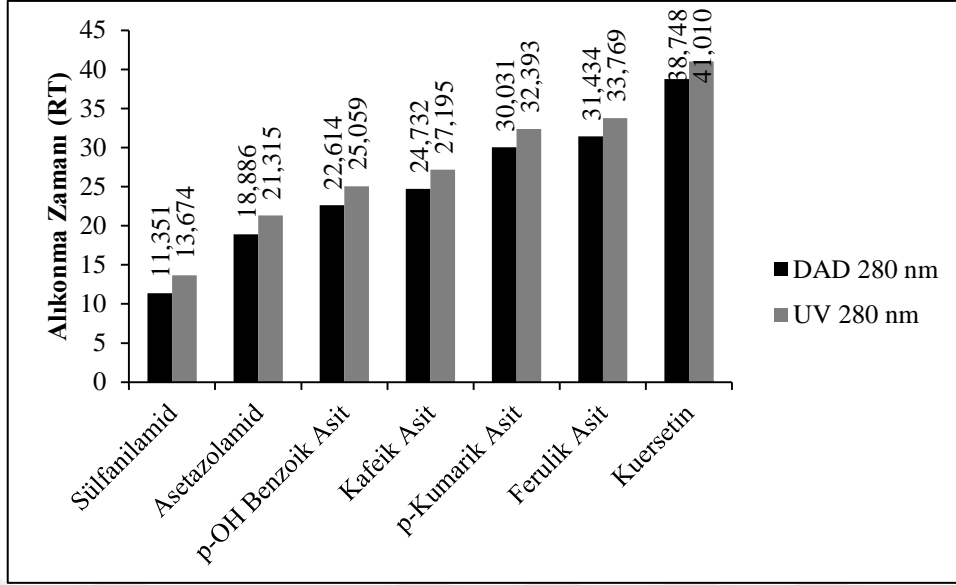
Şekil 153. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,2 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)



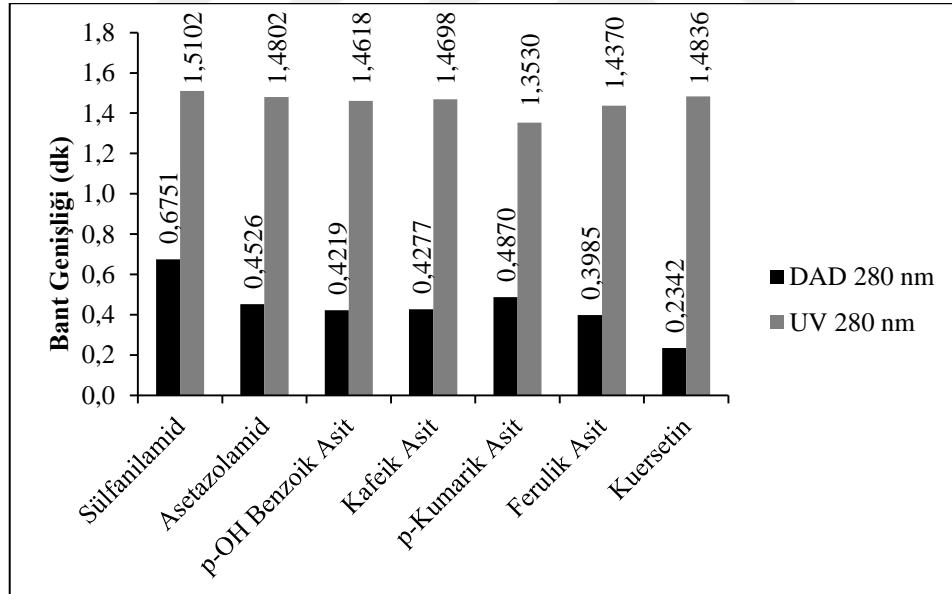
Şekil 154. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,3 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonna zamanları (RT)



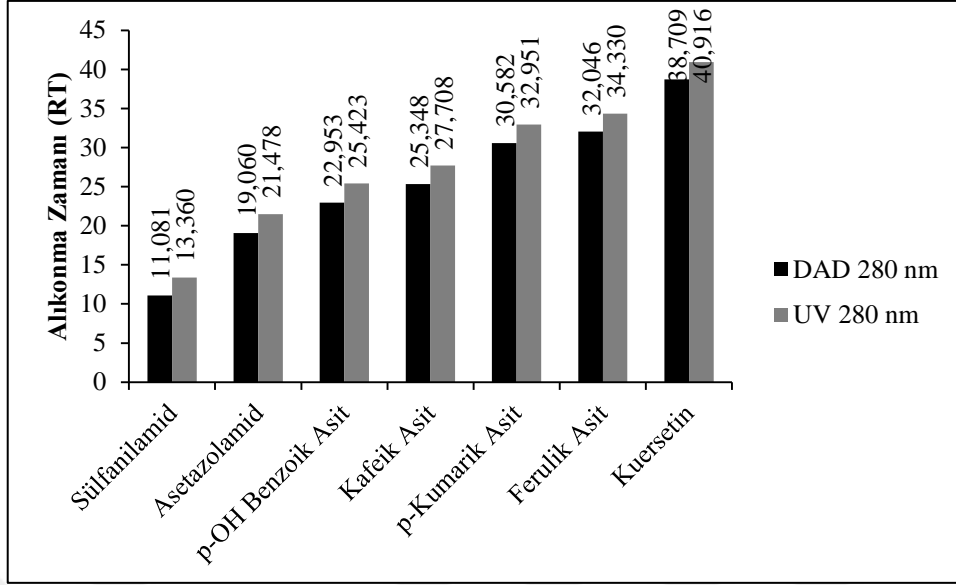
Şekil 155. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,3 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)



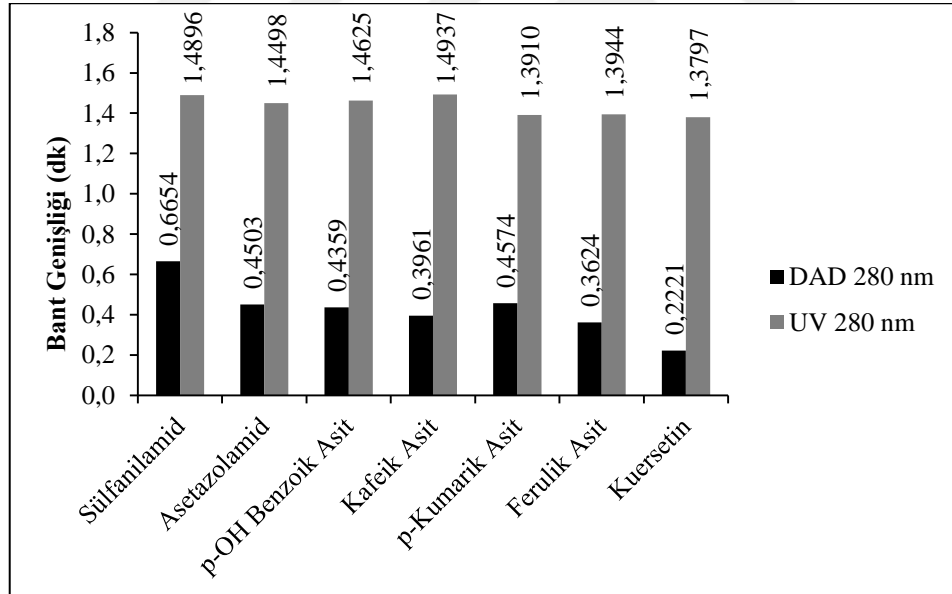
Şekil 156. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,4 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonna zamanları (RT)



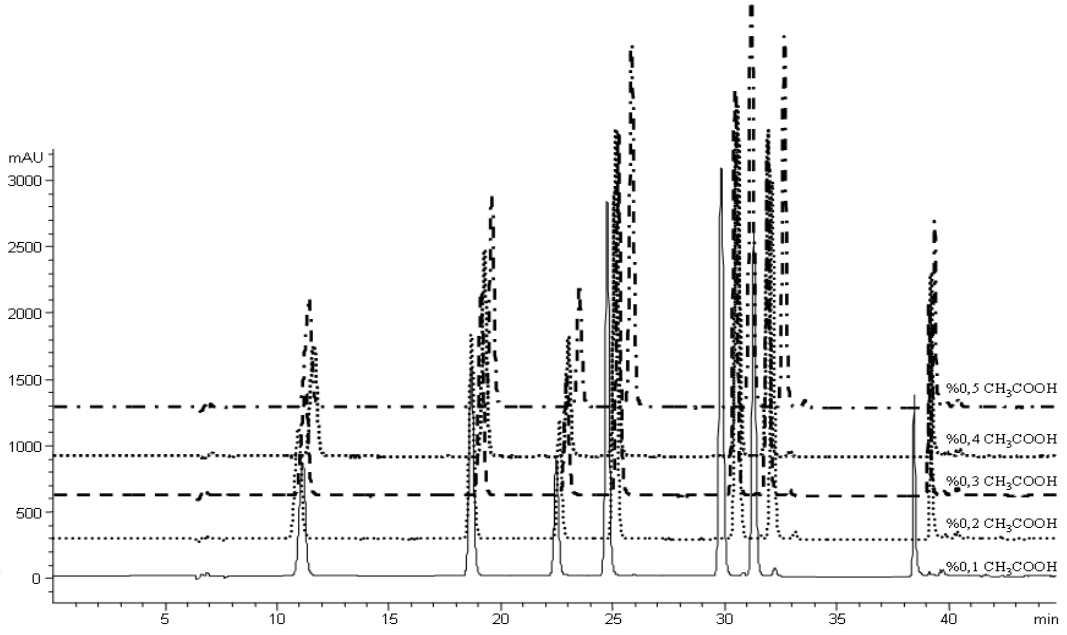
Şekil 157. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,4 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)



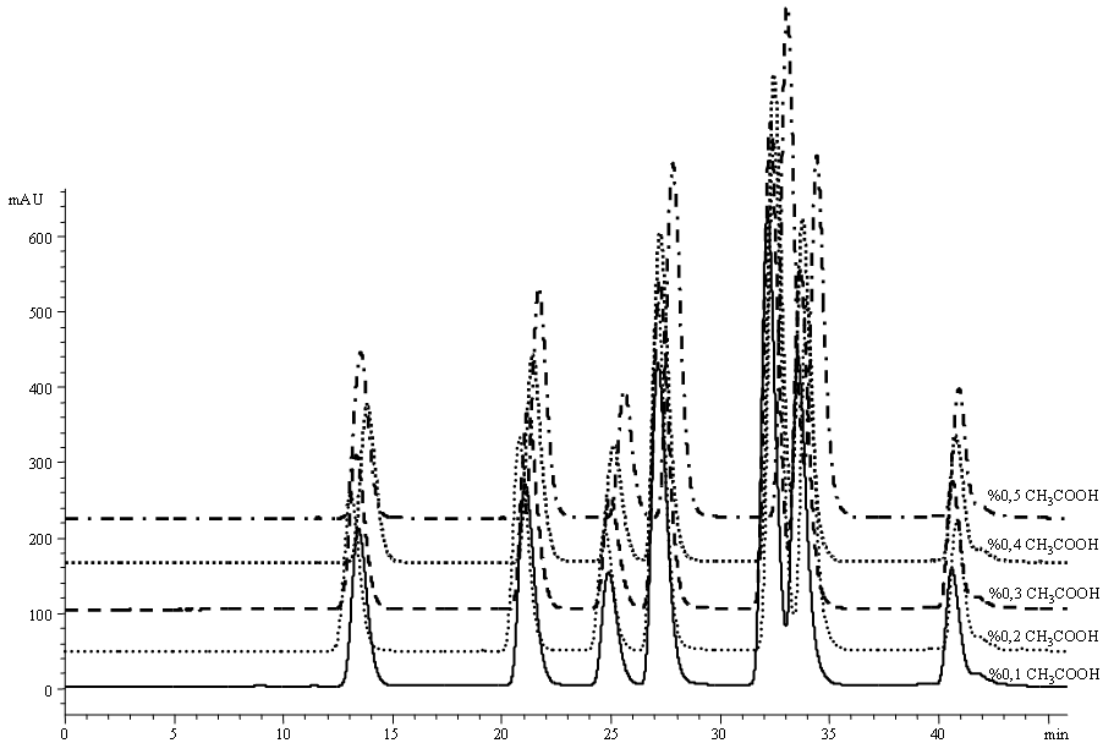
Şekil 158. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)



Şekil 159. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm ve UV 280 nm'deki bant genişlikleri (dk)



Şekil 160. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5 asetik asit olduğunda standartların DAD 280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)

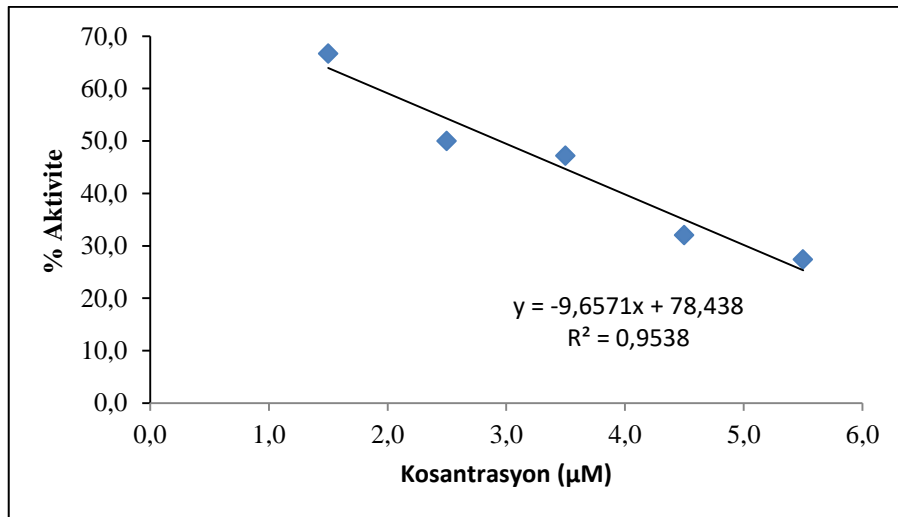


Şekil 161. Mobil fazın akış hızı 0,5 mL/dk iken, mobil faz içeriği %0,1-%0,2-%0,3-%0,4-%0,5 asetik asit olduğunda standartların UV280 nm'deki alıkonma zamanları (RT)

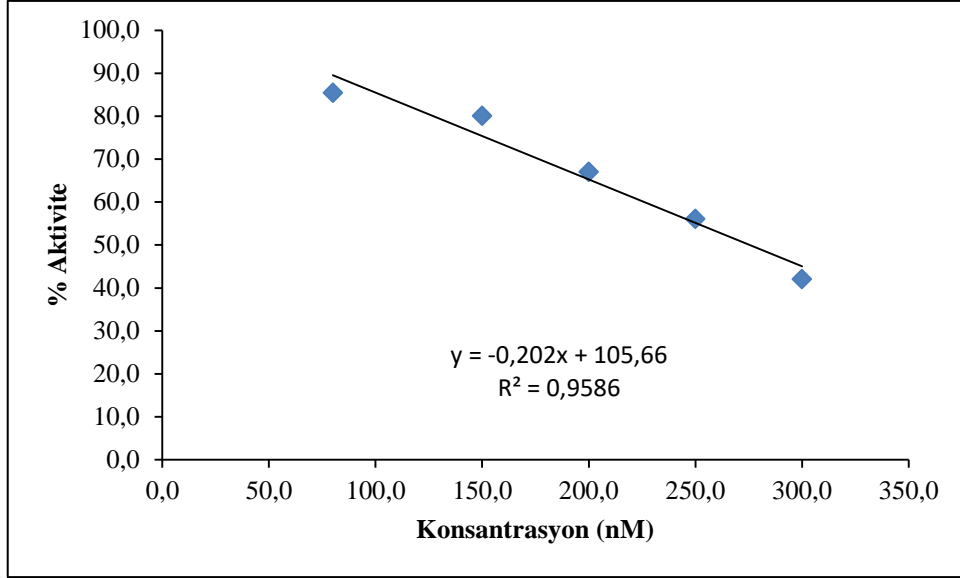
3.5.2.7. On-line HPLC-DAD-CAI ve Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI Yöntem Bulguları

Geliştirilen On-line HPLC-DAD-CAI yönteminde belirlenen HPLC koşullarında (mobil faz akış hızı 0,5 mL/dakika, substrat 0,4 mL/dakika, enzim+tampon 0,1 mL/dakika) standart karışımlar ve numuneler yürütülerek DAD sayesinde 8 farklı dalga boyunda (280, 254, 260, 274, 240, 266, 324, 348) fenolik bileşiklere ait pikleri içeren kromatogramlar ve 3D spektrumları elde edilmiştir. UV dedektör ile de 348 nm’de bu bileşiklere ait CA inhibisyon piklerini veren kromatogramlar elde edilmiştir.

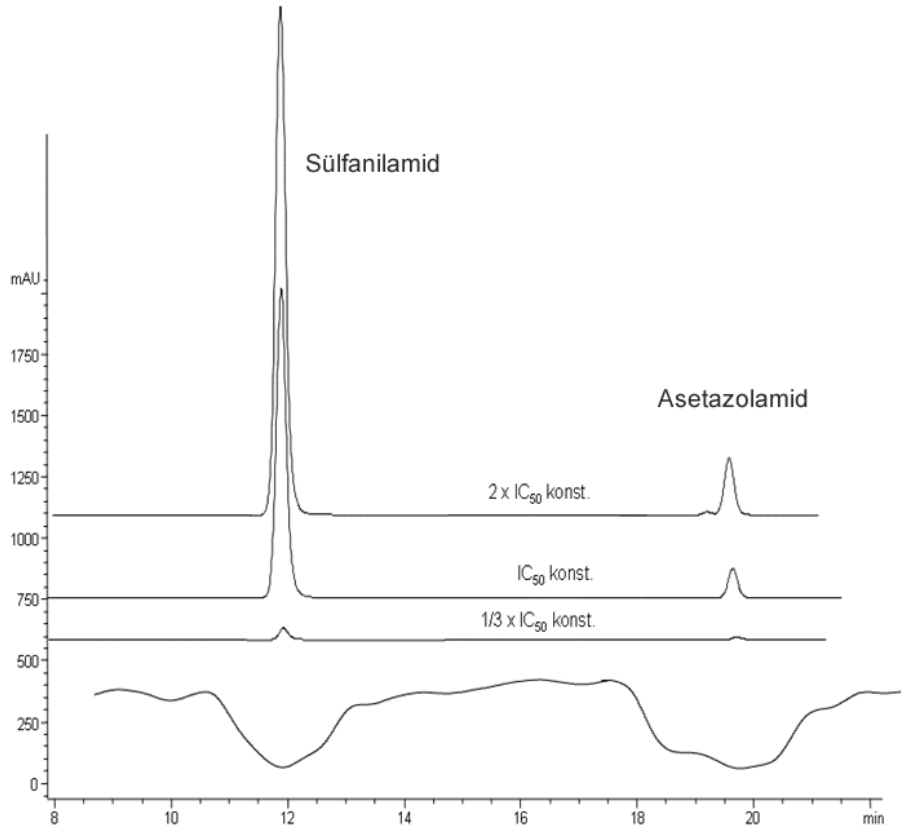
CA’ nın standart inhibitörleri olan sülfanilamid ve asetazolamid için HPLC şartlarında (mobil faz akış hızı 0,5 mL/dakika, substrat 0,4 mL/dakika, enzim+tampon 0,1 mL/dakika) spektrofotometrede esteraz aktivite tayini yapılarak IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Sülfanilamidin IC₅₀ değeri 2,5 µM, asetazolamidin IC₅₀ değeri 275 nM olarak bulunmuştur (Şekil 162-163). Standartların HPLC şartlarında IC₅₀ değerleri belirlendikten sonra, yine HPLC şartlarında son IC₅₀ konsantrasyonları, 2x(IC₅₀), IC₅₀ ve 1/3x(IC₅₀) olacak şekilde her bir standartın enjeksiyon konsantrasyonu hesaplanıp enjeksiyonu yapıldıktan sonra gradiyent şartlarda yürütmeleri yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar IC₅₀ değerinin iki katı konsantrasyon için 348 nm kromatogramıyla birlikte Şekil 164’ te verilmiştir.



Şekil 162. Sülfanilamidin HPLC şartlarında spektrofotometrik esteraz aktivite tayin yöntemiyle IC₅₀ değerinin belirlenmesi

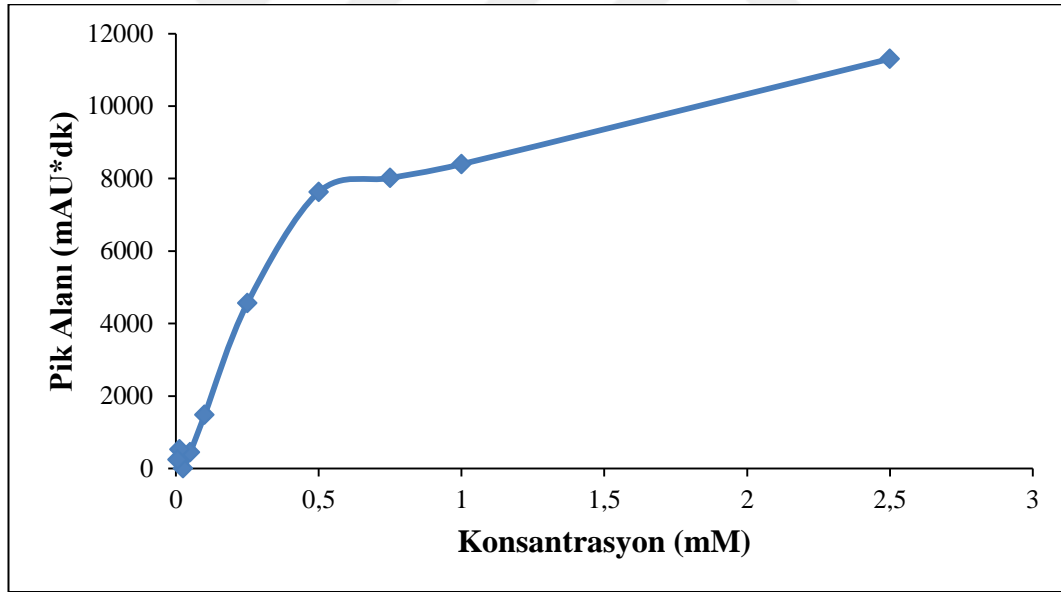


Şekil 163. Asetazolamidin HPLC şartlarında spektrofotometrik esteraz aktivite tayin yöntemiyle IC_{50} değerinin belirlenmesi

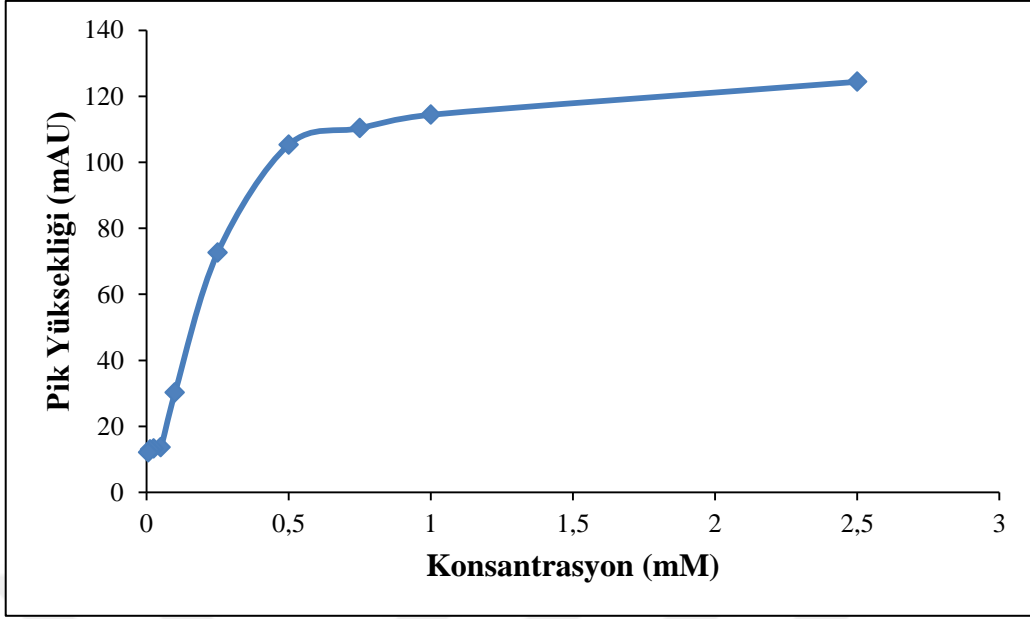


Şekil 164. On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle elde edilen sülfanilamid ve asetazolamidin esteraz aktivite sonuçları

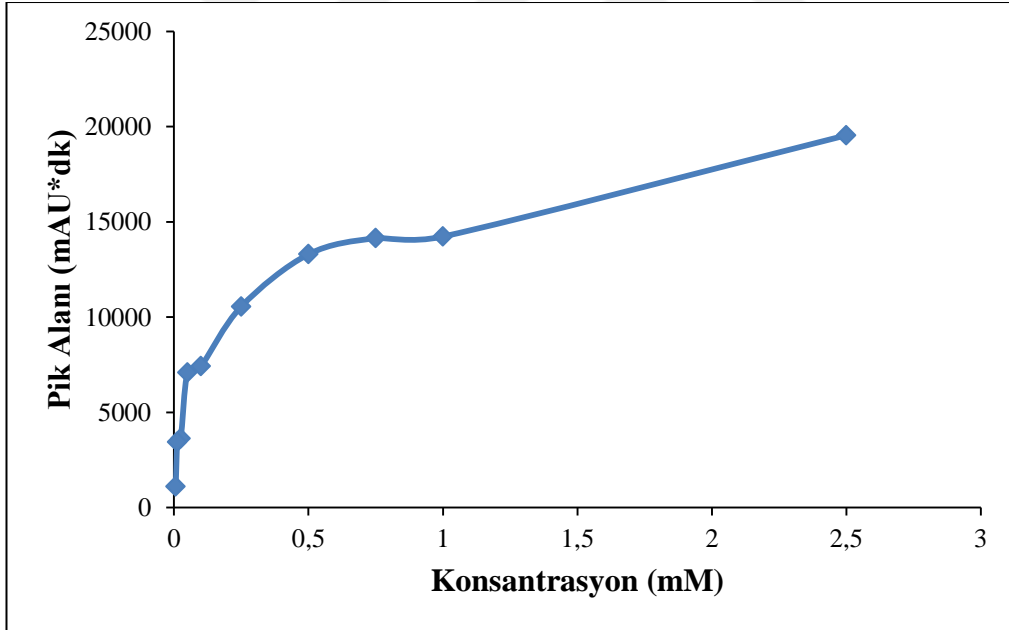
Daha sonra On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle sülfanilamid ve asetazolamidin IC_{50} değerini belirlemek için her bir standart on farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır ve geliştirilen on-line HPLC-CA inhibitör belirleme sisteminde (RP-HPLC-DAD-UV) (Şekil 55), gradient programda (Tablo 17) yürütülmüştür. Standartların her bir konsantrasyondaki pik alanları ve pik yükseklikleri Chem Station (Agilent) programıyla hesaplanmıştır ve konsantrasyona karşı hem pik alanları hem de pik yükseklikleri grafiğe geçirilerek IC_{50} değerleri belirlenmiştir (Şekil 165, 166, 167, 168). Konsantrasyon arttıkça pik yüksekliği belli bir değerden sonra sabit kalmasına rağmen, pik yayvanlaşarak pik alanı artmıştır (Şekil 169). Bu anlamda IC_{50} değerinin konsantrasyona karşı pik yüksekliğinden hesaplanması daha güvenilir bulunmuştur. Sülfanilamid ve asetazolamidin IC_{50} değeri konsantrasyona karşı pik alanı grafiğinden sırayla 0,23 mM ve 0,15 mM olarak bulunmuştur. Sülfanilamid ve asetazolamidin IC_{50} değeri konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafiğinden sırayla 0,11 mM ve 0,01 mM olarak bulunmuştur.



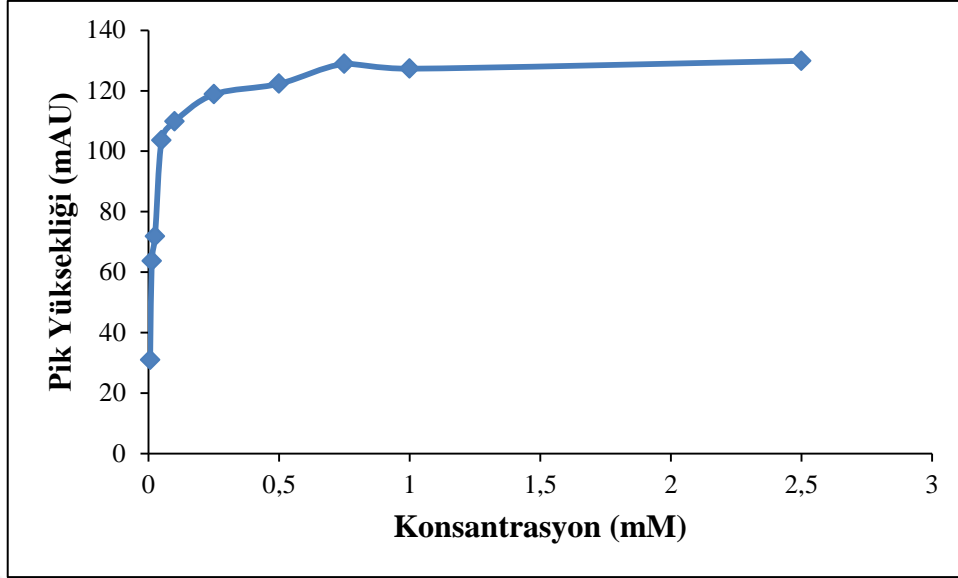
Şekil 165. On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle sülfanilamidin konsantrasyona karşı pik alanı grafiği



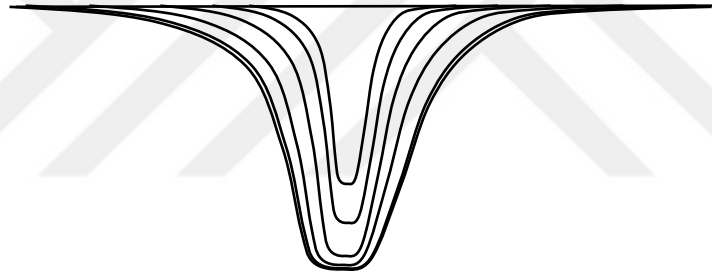
Şekil 166. On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle sülfanilamidin konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafiği



Şekil 167. On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle asetazolamidin konsantrasyona karşı pik alanı grafiği



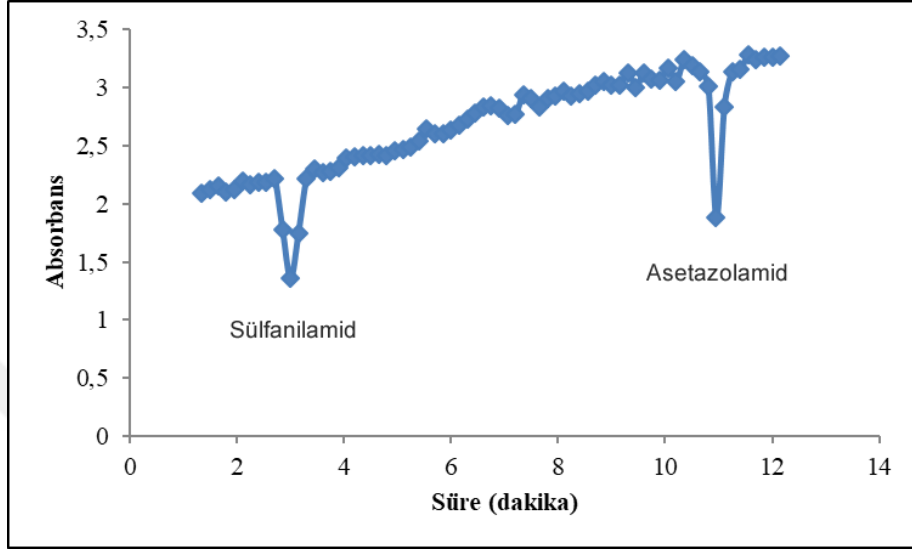
Şekil 168. On-line HPLC-DAD-CAI yöntemiyle asetazolamidin konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafiği



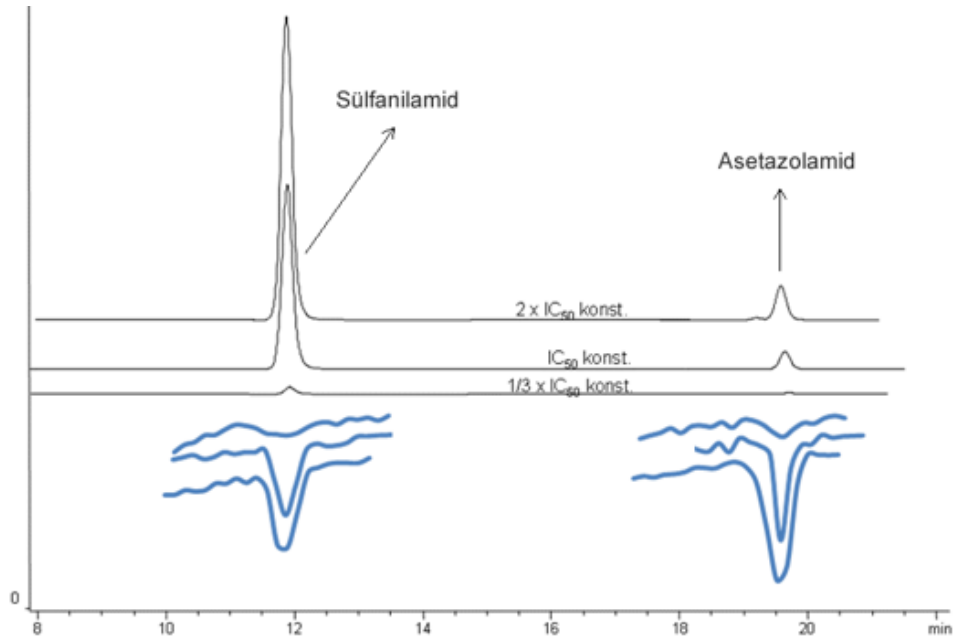
Şekil 169. İnhibitör konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak pik yüksekliği ve pik alanının değişimi

Daha sonra kombine HPLC-DAD spektrofotometrik CAI belirleme yönteminde DAD dedektör çıkışındaki tübingin ucu fraksiyon toplayıcıya bağlanarak toplanan sülfanilamid ve asetazolamid eluatlarında yine HPLC şartlarında spektrofotometrik yöntemle esteraz aktivite tayini yapılmıştır (Şekil 170-171). Spektrofotometrik esteraz aktivite tayininde pipetlenen inhibitör hacmini verecek şekilde HPLC'de DAD dedektörün çıkışındaki tübingten damla sayımı yöntemiyle aynı hacmi veren damla sayısı ile birlikte eluatın bir tüpte toplanması için geçen süre belirlenmiştir. İnhibitörlerin DAD 280 nm' deki kromatogramlarından pikin alanı bir tüpte toplanan eluatın dakikasına bağlı olarak alanlara bölünmüştür (Şekil 172). İnhibitörün enjeksiyon konsantrasyonundan toplam alanın konsantrasyonu bulunmuş, bölünen alanlar toplam alana oranlanarak da her bir alanın konsantrasyonu bulunmuştur. Tüplerde toplanan eluatlara spektrofotometrik esteraz

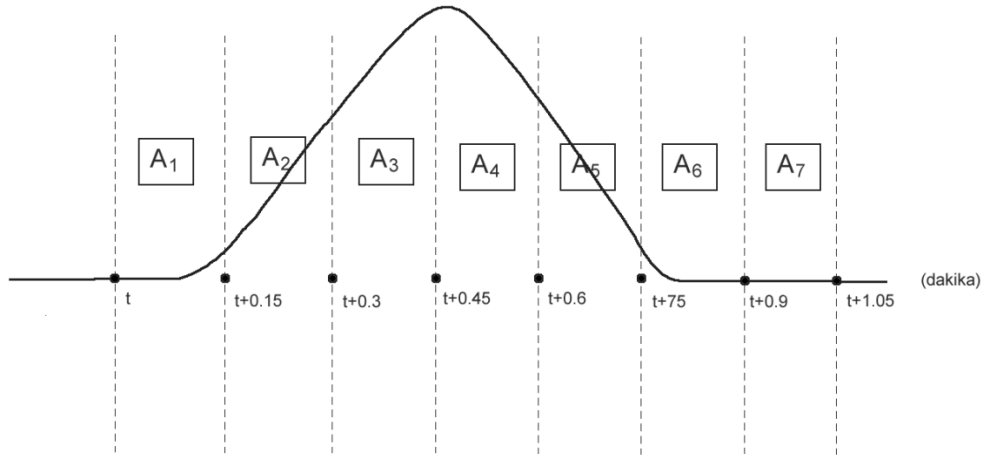
aktivite yöntemi uygulanmıştır. Dakikaya karşı absorbanş grafiği çizilerek bu grafikten her bir alanın absorbanşı bulunmuş (Şekil 173) ve her bir alanın konsantrasyonuna karşı absorbanş grafiği çizilmiş ve bu grafikten IC_{50} değeri bulunmuştur (Şekil 174-175).



Şekil 170. Kombine HPLC-DAD spektrofotometrik CAI belirleme yönteminde fraksiyon toplayıcıda toplanan sülfanilamid ve asetazolamid spektrofotometrik yöntemle esteraz aktivite sonuçları



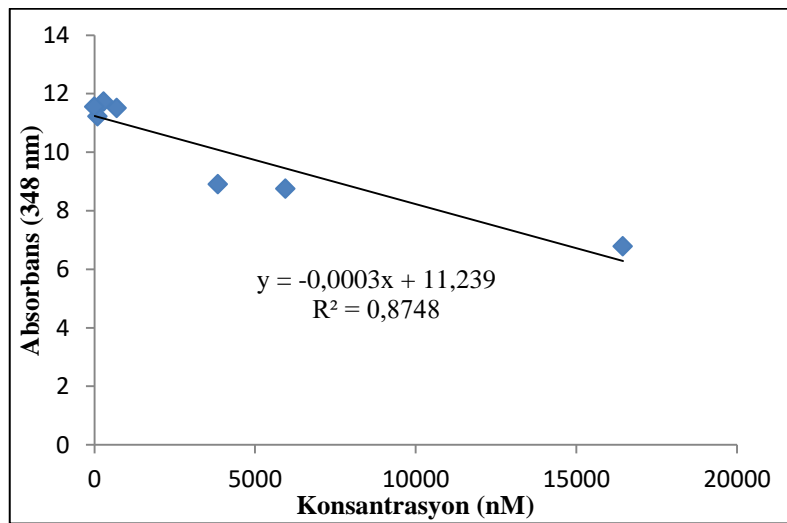
Şekil 171. Kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemiyle elde edilen kromatogramlar ve asetazolamid ve sülfanilamid esteraz aktivite sonuçları



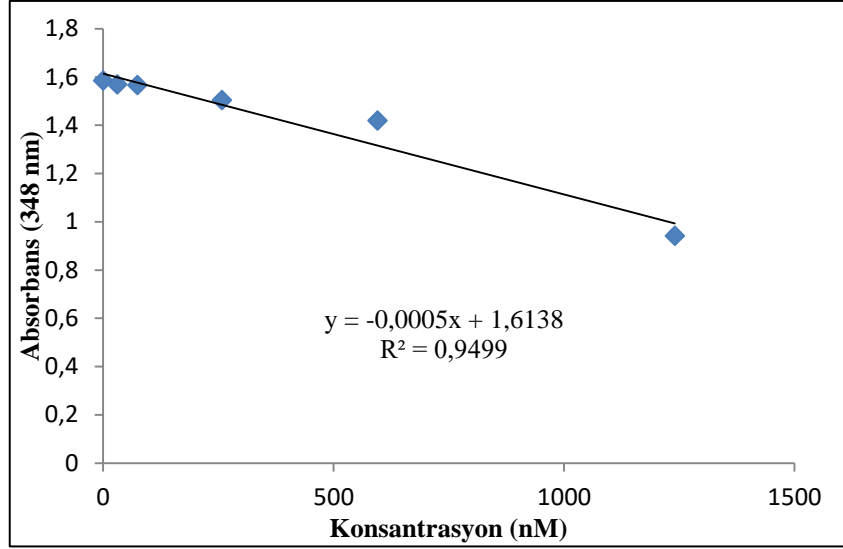
Şekil 172. İnhibitörlerin DAD 280 nm' deki kromatogramlarından toplam pik alanının bir tüpte toplanan eluatın dakikasına bağlı olarak alanlara bölünmesinin gösterimi



Şekil 173. Dakikaya karşı absorbanst grafiği çizilerek bu grafikten her bir fraksiyonun absorbanstının bulunmasının gösterimi (Şekil 173)

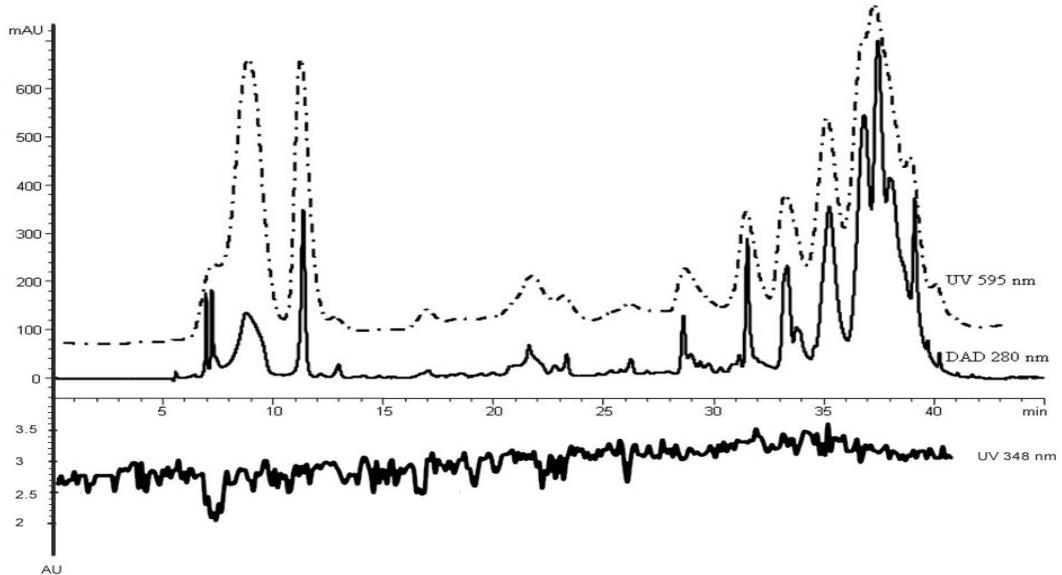


Şekil 174. Toplanan fraksiyonlarda sülfanilamid IC₅₀ değerinin belirlenmesi için yapılan spektrofotometrik esteraz aktivite ölçüm sonuçları

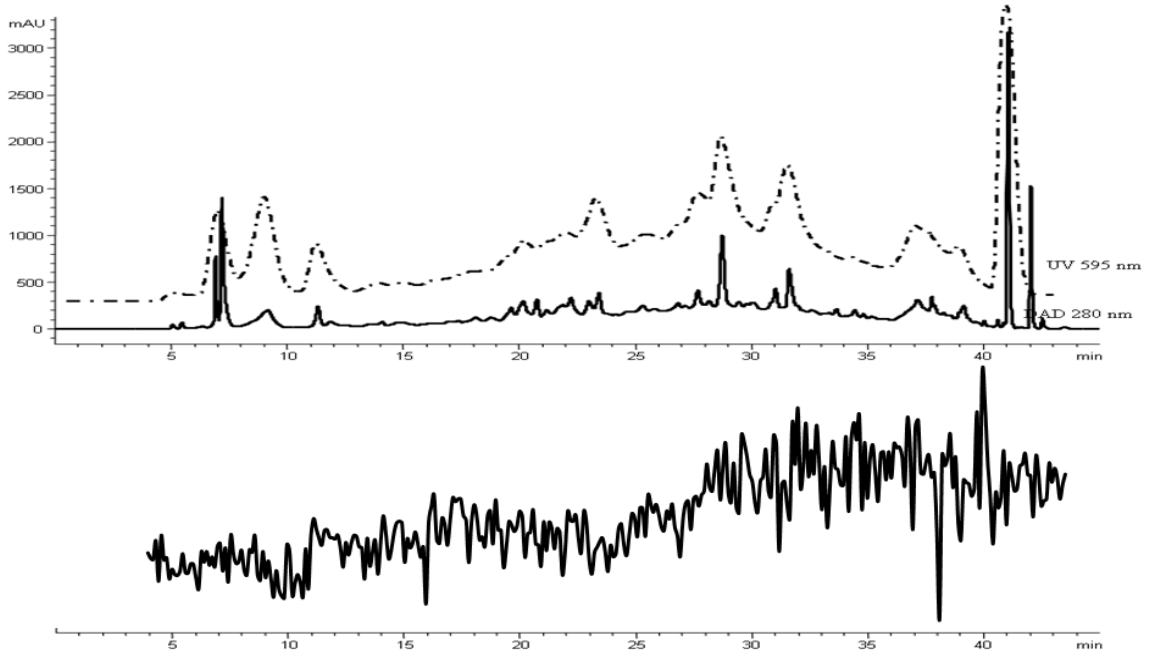


Şekil 175. Toplanan fraksiyonlarda asetazolamid IC₅₀ değerinin belirlenmesi için yapılan spektrofotometrik esteraz aktivite ölçüm sonuçları

Daha önce geliştirilmiş olan on-line HPLC-FRAP antioksidan yöntemi CAI yöntemiyle birlikte kullanılarak kombine HPLC-DAD-FRAP-Spektrofotometrik CAI yöntemi sumak bitkisinin asetonitrilli ekstraktına (Şekil 176) ve karanfil bitkisinin asetonitrilli ekstraktına (Şekil 177) uygulanmıştır.



Şekil 176. Sumağın (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları ve kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemiyle elde edilen esteraz aktivite sonuçları



Şekil 177. Karanfilin (10 mg/mL) asetonitrilli ekstraktının 595 nm'de 0,5 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası DAD 280 nm ve UV 595 nm kromatogramları ve kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemiyle elde edilen esteraz aktivite sonuçları

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1) CO₂'in hidrasyonunu veya HCO₃⁻'ın dehidrasyonunu dönüşümlü olarak katalizleyen ve eritrosit içeren çoğu dokuda iyi karakterize edilmiş pH düzenleyici metaloenzim sınıfı bir enzimdir (Supuran, 2008; 2010). Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur (Gülçin ve Beydemir, 2013). Karbonik anhidraz bu reaksiyonun hızını artırarak saniyede 10⁴-10⁶ reaksiyon hızına ulaştırır (Çoban vd., 2007). Memelilerde hücre içi yerleşimleri, kinetik özellikleri ve inhibitörlere karşı duyarlılıkları birbirinden farklı 16 ayrı (CAI-XIV) karbonik anhidraz belirlenmiştir (Supuran 2008). Çoğu CA izoenzimlerinin modülatörleri; ödem, glokom hastalığı, obezite, kanser, epilepsi ve osteoporoz gibi rahatsızlıkların tedavisinde potansiyel inhibisyon ya da aktivasyon etkileri ile tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Sly ve Hu, 1995; Supuran ve Scozzafava, 2002).

hCA-I, insan eritrositlerinde bol miktarda bulunan bir proteindir. Ayrıca lenste, ter bezlerinde, kornea epitelyumunda, kalın bağırsağın epitelyumunda, adipoz dokuda bulunur. hCA-II, insanda hemen hemen her doku veya organda, bazı hücre tiplerinin sitozolünde bulunur ve dönüşümsüz körlüğe sebep olan glokomda aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (Supuran, 2008; 2010).

Bu çalışmada insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCAII) ve sığır karbonik anhidraz enzimi (BCA) eritrositlerden afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırılmıştır. Sepharose-4B üzerinden üç farklı reaksiyon sonucu sentezlenerek hazırlanan afinite jeli kullanılmıştır. Sepharose-4B matrisi olarak seçilmiştir. Önce CNBr ile aktifleştirilmiş sonra enzimin ligandla daha iyi etkileşmesini sağlamak için *L*- tirozin uzantı kolu olarak takılmıştır. Karbonik anhidrazın aktif bölgesi enzimin globüler yapısının 12-15 Å derinliğinde olduğu X ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (Cuatrecasas, 1970). Afinite jelinde belirtilen derinliğe erişebilmek için yeteri kadar uzunlukta bir uzantı kolu olarak tirozin kullanılmıştır. Daha sonra sülfanilamid, enzimin spesifik bir inhibitörü olduğu için ve enzimi kolonda tutmak için afinite jelinde ligand olarak kullanılmıştır ve diazolanarak tirozine kenetlenmesi sağlanmıştır.

Eluatların tampon bileşenlerinden uzaklaştırılması amacıyla diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işlemi bittikten sonra daha derişik protein çözeltileri elde etmek için numuneler liyofilize (dondurup kurutma yöntemi) edilmiştir. Sonrasında saflaştırılan

izoenzimlerin saflıklarının kontrolü için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmıştır. hCA-I, hCA-II ve BCA enzimlerinin her biri için tek bant gözlenmiştir.

Karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein miktarları iki farklı yöntemle belirlenmiştir. İlk önce 280 nm de absorbansları ölçülerek yarı kantitatif olarak protein miktarları belirlenmiştir. Bu tayin, proteinin yapısındaki aromatik tirozin ve triptofan amino asitlerinin bu dalga boyunda absorbans vermesine dayanmaktadır (Segel, 1968). Kantitatif protein tayinleri ise Coomassie-Blue yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemin çok kısa sürede uygulanabiliyor olması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalması gibi diğer protein tayinlerine göre üstünlükleri vardır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Karbonik anhidraz enzim aktivite tayinlerinde iki yöntem kullanılmıştır. Birincisi hidrataz aktivitesidir, bu aktivite aynı zamanda enzimin fizyolojik aktivitesidir. Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri bu yöntem Wilbur-Anderson yöntemi olarakta bilinir (1960). Enzimin aktivitesi, 0 °C'de pH düşüşünün takibiyle potansiyometrik metotla ölçülmüştür. Metodun prensibi, ortamda substrat olarak bulunan karbondioksitin hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺'nin ortamın pH' sını 8,8'den 7,0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır.

İkinci aktivite yöntemi ise esteraz aktivitesidir. Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntemin esası, karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır (Armstrong vd., 1966). Karbonik anhidraz enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte, oluşan üründe 348 nm'de absorpsiyon göstermektedir. Bu yöntem Wilbur-Anderson metoduna göre daha hassastır. Ancak hidrataz aktivite ölçümü fizyolojik olarak daha fazla değer taşır. p-Nitrofenil asetat, suda çözünmediği için önce az miktarda asetonla çözülerek, bu çözeltinin manyetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılan saf suya yavaşça damla damla ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasından dolayı substratın çözünmesi işleminde aseton kullanılmıştır (Armstrong vd., 1966; Verportee vd., 1967).

Karbonik anhidraz inhibitörleri (CAI), son zamanlarda üzerinde çokça çalışma yapılan, oldukça dinamik bir araştırma alanıdır. CA enzimi, birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. CA aktivitesine müdahale eden ilaçlar, çoğu sülfonamid sınıfına ait olmakla birlikte yaklaşık 60 yıldır klinikte kullanılmaktadır (Supuran, 2008b; Alterio vd., 2012; Carta vd., 2012; Fabrizi vd., 2012; Supuran, 2012).

Bitkisel doğal ürünler uzun yıllardan beri geleneksel tıbbın temelini oluşturmaktadır ve yeni ilaç buluşlarına katkı sağlamaya devam etmektedir (Lachance vd., 2012). İlaç keşfinde doğal ürünlerin öneminin en açık kanıtını anti-kanser (Mann, 2002) antibiyotik (Butler ve Cooper, 2011) ve terapötik alanlarda görmekteyiz (Butler ve Buss, 2006).

İlaç hammaddelerinin yapısını genellikle organik maddeler teşkil eder. Kanser çağımızın öldürücü hastalığıdır. Kanser türlerinin tedavisinde kullanılan klasik tıbbi ilaçlarla kalıcı ve iyileştirici bir sonuç almak neredeyse imkansızdır. Bu sebeple son yıllarda tıbbi bitkilere olan rağbet çok hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu hızlı artışın temelinde bu bitkilerden elde edilen ilaç etken maddelerinin, sentetik yolla elde edilen etken maddelerine göre çok yönlü etkiye sahip olmaları ve yan etkilerinin daha az olması veya bulunmaması gibi özellikler yatmaktadır (Lachance vd., 2012).

Doğal CAI araştırmaları giderek artan oranda ilgi görmektedir. Bizde çalışmamızda doğal CA inhibitörlerini araştırmaya yöneldik. Çalışmada, 17 farklı bitkinin, 3 farklı çözücüde (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) hazırlanan ekstraktlarının BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Aktivite ölçümü pH'nın 8,8'den 7,0'a düşmesi için geçen süre ölçülerek yapılmıştır. Standart inhibitör olarak asetazolamid ve sülfanilamid kullanılmıştır. Bu inhibitörlerin çalışılan konsantrasyonda hidrataz aktivitesindeki % inhibisyonları sırayla %24 ve %84 olarak bulunmuştur. Her üç çözücüde de en yüksek inhibisyon sumak ekstraktında gözlemlenmiştir. Asetonitrilli ekstraktlarda sarı kantaronda %83, karanfilde %74, kınada %68 ve keçiboynuzunda %50 inhibisyon gözlemlenmiştir. Sulu ekstraktlarda sumaktan sonra (%96) en yüksek inhibisyon sırayla karanfil (%61), adaçayı (%44) ve kantaronda(%31) gözlemlenmiştir. Metanollü ekstraktlarda da sumaktan sonra (%97) en yüksek inhibisyon karanfil (%70), sarı kantaron (%66) ve kınada (%36) gözlemlenmiştir.

17 farklı bitkinin, 3 farklı çözücüde (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) hazırlanan ekstraktlarının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri de *in vitro* olarak incelenmiştir. Aktivite ölçüm pH'sı 7,4' tür. Standart inhibitör olarak asetazolamid ve sülfanilamid kullanılmıştır. Bu inhibitörlerin çalışılan konsantrasyonda esteraz aktivitesi üzerine % inhibisyonları sırayla %37 ve %65 olarak bulunmuştur. Hidrataz aktivitesinde olduğu gibi esteraz aktivitesinde de üç farklı çözücüde de en yüksek inhibisyon sumakta gözlemlenmiştir. Asetonitrilli ekstraktlarda sarı kantaronda %80, karanfilde %76, kınada %69 ve keçiboynuzunda %51 inhibisyon gözlemlenmiştir. Sulu ekstraktlarda sumaktan sonra (%96) en yüksek inhibisyon sırayla karanfil (%67), adaçayı

(%61) ve kantaronda(%26) gözlemlenmiştir. Metanollü ekstraktlarda da sumaktan sonra (%96) en yüksek inhibisyon karanfil (%85), sarı kantaron (%59), keçi boynuzunda (%36) ve adaçayında (%32) gözlemlenmiştir.

17 farklı bitki ekstraktının 3 farklı çözücüdeki (%100 su, %40 asetonitril, %40 metanol) % inhibisyon değerleri hidrataz aktivite yöntemi ve esteraz aktivite yöntemi arasında paralellik göstermiştir. Hidrataz ve esteraz aktiviteleri için üç farklı çözücü ekstraktları ile elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek korelasyon grafikleri çizilmiş ve %100 su, %40 asetonitril, %40 metanol için sırayla R^2 değerleri 0,963; 0,992; 0,968 olarak bulunmuştur. On-line HPLC-CA inhibisyon yöntemi geliştirmek üzere bu çalışmalar yapılmıştır. Bitkilerde hidrataz ve esteraz aktivitesi açısından yüksek korelasyonun olması enzimle ilgili çalışmalarda önemlidir. Hidrataz aktivitesi fizyolojik aktivite iken, esteraz aktivitesi değildir. Bu ekstraktlarda her iki aktivite de çalışılırsa da inhibisyonla ilgili değerli bilgi elde edileceği ve her iki yönteminde on-line sisteme uyarlanabileceği gösterilmiştir.

Bitki ekstraktlarının CA enzimlerinin esteraz ve hidrataz aktivitelerini önemli ölçüde baskılandığı belirlenmiştir. Ayrıca bu ekstraktların toplam fenolik madde miktarları da belirlenmiş, bu iki ölçüm arasında korelasyon olduğu görülmüştür.

Enzimlerin organik çözücü ortamında denatürasyona uğradığı ve katalitik aktivitelerinin sulu ortamla kıyaslandığında önemli ölçüde baskılandığı bilinmektedir (Plou vd., 1998). Ancak bu zamana kadar yapılan birçok çalışmada enzimlerin organik ortamda da katalitik aktivite gösterebildiği bildirilmiştir (Carrea ve Riva, 2008).

Çalışmamızda, 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) 12 farklı konsantrasyonda (% 0, % 1, % 2, % 4, % 6, % 8, % 10, % 14, % 18, % 22, % 26, % 32) sığır CA (BCA) aktivitesi üzerine etkisine CA'nın hidrataz aktivite yöntemiyle bakılmıştır. Enzimin aktivitesinde %50 inhibisyona sebep olan % çözücü oranları sırayla metanol için %10,2; etanol için %18,4; aseton için %31,6; asetonitril için %31,7 ve DMSO için % 27,0' dır.

Çalışmanın devamında BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren asetazolamid ve sülfanilamidin IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Doygun substrat konsantrasyonunda sığır eritrosit BCA enzimi için CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ölçümler hidrataz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör

konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmıştır. Sülfanilamid için IC_{50} değeri 2,6 μM ve asetazolamid için bu değer 24 nM olarak bulunmuştur.

Hidrataz aktivite tayin metoduyla IC_{50} değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamidin %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonunda organik çözücülerin BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) tek konsantrasyonda (%10) sığır CA (BCA) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamid IC_{50} konsantrasyonunda enzimi %50 inhibe ederken %10 konsantrasyonda organik çözücünün BCA aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Organik çözücü olarak metanol kullanıldığında asetazolamidin IC_{50} değeri 29,2 nM, sülfanilamidin IC_{50} değeri 3,6 μM olmuştur. Etanolde asetazolamidin IC_{50} değeri 30,1 nM, sülfanilamidin IC_{50} değeri 3,4 μM olmuştur. Asetonda asetazolamidin IC_{50} değeri 26,2 nM, sülfanilamidin IC_{50} değeri 2,7 μM olmuştur. Asetonitrilde asetazolamidin IC_{50} değeri 28,6 nM, sülfanilamidin IC_{50} değeri 3,4 μM olmuştur ve DMSO da asetazolamidin IC_{50} değeri 22,8 nM, sülfanilamidin IC_{50} değeri 2,6 μM olmuştur.

5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) 12 farklı konsantrasyonda (% 0, %1, %2, %4, %6, %8, %10, %14, %18, %22, %26, %32) sığır CA (BCA) aktivitesi üzerine etkisine CA'nın esteraz aktivite yöntemiyle de bakılmıştır. Enzimin aktivitesinde %50 inhibisyona sebep olan % çözücü oranları sırayla metanol için %7,3; etanol için %13; aseton için %16,9; asetonitril için %11,9 ve DMSO için % 27 dir. DMSO ile %25 konsantrasyona kadar önemli bir inhibisyon gözlemlenmemiştir.

Çalışmanın devamında BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren asetazolamid ve sülfanilamidin IC_{50} değerleri belirlenmiştir. 3 mM substrat konsantrasyonunda sığır eritrosit BCA enzimi için CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Ölçümler esteraz aktivite tayin metoduyla yapılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite(%)-[I] grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) hesaplanmıştır. Sülfanilamid için IC_{50} değeri 9,3 μM ve asetazolamid için bu değer 90 nM olarak bulunmuştur.

Esteraz aktivite tayin metoduyla IC_{50} değeri belirlenen asetazolamid ve sülfanilamidin %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonunda organik çözücülerin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. 5 organik çözücünün (asetonitril, aseton, metanol, etanol, DMSO) tek

konsantrasyonda (%10) sığır CA (BCA) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamid IC₅₀ konsantrasyonunda enzimi %50 inhibe ederken %10 konsantrasyonda organik çözücünün BCA aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Organik çözücü olarak metanol kullanıldığında asetazolamidin IC₅₀ değeri 111,1 nM, sülfanilamidin IC₅₀ değeri 12,8 µM olmuştur. Etanolde asetazolamidin IC₅₀ değeri 98,1 nM, sülfanilamidin IC₅₀ değeri 11,2 µM olmuştur. Asetonda asetazolamidin IC₅₀ değeri 94,0 nM, sülfanilamidin IC₅₀ değeri 10,9 µM olmuştur. Asetonitrilde asetazolamidin IC₅₀ değeri 109,0 nM, sülfanilamidin IC₅₀ değeri 12,6 µM olmuştur ve DMSO da asetazolamidin IC₅₀ değeri 83,0 nM, sülfanilamidin IC₅₀ değeri 9,4 µM olmuştur.

Beş çözücünün CA enzimlerinin esteraz ve hidrataz aktivitelerini azalttığı gözlemlenmiştir. %10-15 çözücü konsantrasyonlarına kadar aktivitenin değerlendirilebileceği tespit edilmiştir.

Literatürde, fenol sınıfına ait yeni kemotiplerin araştırılmasında off-line CA aktivite yöntemleriyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, gallik asit, siringik asit, kuersetin ve elajik asit gibi bir dizi fenolik asit ve fenolik doğal ürünlerin karbonik anhidraza karşı inhibitör etkileri stop flow hidrataz aktivite yöntemiyle araştırılmıştır. İnsan ya da fare kökenli hCAI-hCAXII, mCAXIII ve hCAXIV olan bütün memeli izoenzimler, bu polifenoller tarafından düşük mikromolar ya da submikromolar aralıkta (K_i; 0,87-7,79 µM) inhibe olmuştur. Her bir izoenzim bu inhibitörlerle çok çeşitli inhibisyon profili göstermiştir. Burada araştırılan fenoller, klinik olarak kullanılan sülfonamid, sülfamat ya da kumarinlerden farklı bir CA inhibisyon mekanizmasına sahiptir. Katalitik çinko iyonuna bağlanan sülfonamidlerin aksine fenoller Zn²⁺ ile koordinasyon yapan su molekülüne bağlanır ve bu bölge çeşitli amino asitlerle temas eden aktif bölge kavitesinden daha dış kısımdadır. Bu bölge memeli CA izoenzimleri arasında en değişkenliğe sahip bölge olduğundan, bu bileşik sınıfı, tıbbi açıdan ilgili CA' ların yalnızca birisini veya birkaçını hedef alan izoform seçici inhibitörlerin keşfine aracılık edebilir (Innocenti vd., 2010b).

Yapılan başka bir çalışmada fenol, katekol, resorsinol, hidrokinon, pirogallol, salisilik asit, 3-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, 3,5-dihidroksibenzoik asit, gallik asit ve tannik asit gibi bazı fenolik bileşiklerin, üç insan CA izoenzimine (hCAI, hCAII ve hCAVI) ve teleost balığı *Dicentrarchus labrax*'ın (Avrupa levrekinin) solungaç karbonik anhidrazına (dCA) karşı inhibitör kapasitelerine esteraz aktivite yöntemiyle bakılmıştır. İzoenzimler, bu bileşiklerle oldukça farklı inhibisyon

profilleri göstermiştir. Bu bulgular substite fenolik bileşiklerin potansiyel karbonik anhidraz inhibitörleri üretmek için öncü bileşikler olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Öztürk-Sarıkaya vd., 2011).

Başka bir çalışmada, resveratrol, kateşin, silimarinin, dobutamin ve kurkumin'in hCAI ve hCAII izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerine esteraz aktivite yöntemiyle bakılmıştır. Bu doğal fenol türevlerinin aromatik iskele içinde bulunan farklı fonksiyonel grupların (OH, CH₂OH, OCH₃ ve CH₃) varlığı nedeniyle CA izoenzimlerinin aktivitesini etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Resveratrol, kateşin, silimarinin, dobutamin ve kurkumin, sırasıyla hCAI için 4.47-9.47 mM ve hCA II'ye karşı 2.86-7.44 µM aralığında K_i değerlerini göstermiştir. Burada araştırılan bazı doğal fenoller, klinik olarak kullanılan sülfanilamid ve asetazolamid ile aynı aralıkta etkin hCAII inhibitör etkisi göstermiştir ve muhtemelen bu ajanlar ile olan etkileşimleri henüz denenmemiş olan diğer CA izoformlarını hedef alan enzim inhibitörleri üretmek için öncü olarak kullanılabilir (Şentürk vd., 2011).

Çeşitli off-line yöntemler enzim-inhibitör aktivitesinin değerlendirilmesi için geliştirilmiştir. Nispeten basit, hızlı ve kolay olan bazı testlerin biyokimyasal dedeksiyon sisteminde uygulanması mümkündür. On-line sisteme uyarlanabilen yöntemler, kullanılan dedektör tipine göre kolorimetrik test, florometrik test, kütle spektrofotometrisi olmak üzere 3 sınıfa ayrılabilir (Shi vd., 2009). Kompleks karışımlardan asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerini on-line, post-column kolorimetrik test ile belirlemek için Ellman's reaktifi kullanılmıştır. Yakın zamanlarda kullanılan florometrik metodlar enzim-inhibitör aktivitesinin belirlenmesi için çoğu durumda daha duyarlı ve daha spesifiktir. On-line florometrik metodun enzim inhibitörlerinin belirlenmesinde duyarlı olmasına rağmen, testin gelişim hızını sık sık engelleyen, önemli bir enzim afinitesini alıkoyan floresan bir substratın hazırlanmasına gerek vardır. Bütün bu problemlerden dolayı MS dedektörlerini kullanarak uygulanan on-line HPLC yöntemi daha avantajlıdır. Üstelik, MS enzim inhibisyonu ve bağlı enzim aktivitesini belirlemek ve izlemek için substrat, ürün kofaktörleri, koenzimleri ve iç standartlar gibi bir dizi bileşiği aynı anda belirleyebilir (Shi vd., 2009).

Son zamanlarda, tıbbi bitkilerden ve tıbbi bitki kütüphanelerinden elde edilen ekstraktların biyoaktivitelerini belirlemek için geliştirilmiş hücreye dayalı lusiferaz reporter sistem, fenotipik hücreye dayalı tarama ve enzime dayalı tarama gibi çeşitli tarama metodları mevcuttur (Macarron vd., 2011). Bu tarama metodları numune karışımlarının

biyolojik aktivitelerini doğrudan belirleyebilir. Fakat zahmetli ayırma ve saflaştırma prosedürlerine, saf aktif bileşenlerin kimliğinin belirlenmesine ve izole edilmesine sık sık gerek duyulur (Shi vd., 2009). Yakın zamanda geliştirilen teknikler olan on-line HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) yöntemleri, kolon sonrası (post-column) biyokimyasal yöntemler ve paralel kimyasal analizler külfetli saflaştırmalara gerek duyulmaksızın kompleks karışımlardan biyoaktif bileşikleri belirlerler (Shi vd., 2009).

Bu sistemde, HPLC kompleks karışımları ayırır ve kolon sonrası (post-column) biyokimyasal yöntem, karışımlarda bulunan bileşiklerin aktivitelerini ayrı ayrı belirler. Eş zamanlı biyokimyasal dedeksiyon analizlerinde (örneğin diyot-array dedeksiyon, kütle spektrometrisi ve nükleer manyetik rezonans) ise aynı anda aktif bileşiklerin hem miktarı hem de kimliği belirlenir. Son zamanlarda henüz yaygınlaşmamış enzimler ve reseptörlere dayalı testleri içeren kombine sistemler de (hyphenated systems) mevcuttur (Shi vd., 2009).

Biyoaktif bileşenlerin doğal ürünlerden belirlenmesinde on-line HPLC uygulamaları önemli avantajlar sunmaktadır. Son zamanlarda on-line kolon sonrası antioksidan belirleme yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Enzimlere ve reseptörlere dayalı yöntemleri içeren kombine (hyphenated techniques) teknikler daha az yaygındır (Shu-Yun vd., 2009).

Çalışma grubumuzca yapılan çalışmalarda 50' den fazla bitkiden elde edilen ekstraktların insan CA' sını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bunun gibi literatürde daha birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar toplam inhibisyonu göstermektedir. İnhibisyona neden olan etken bileşenlerin belirlenmesi için yapılacak olan çalışmalar değerlidir.

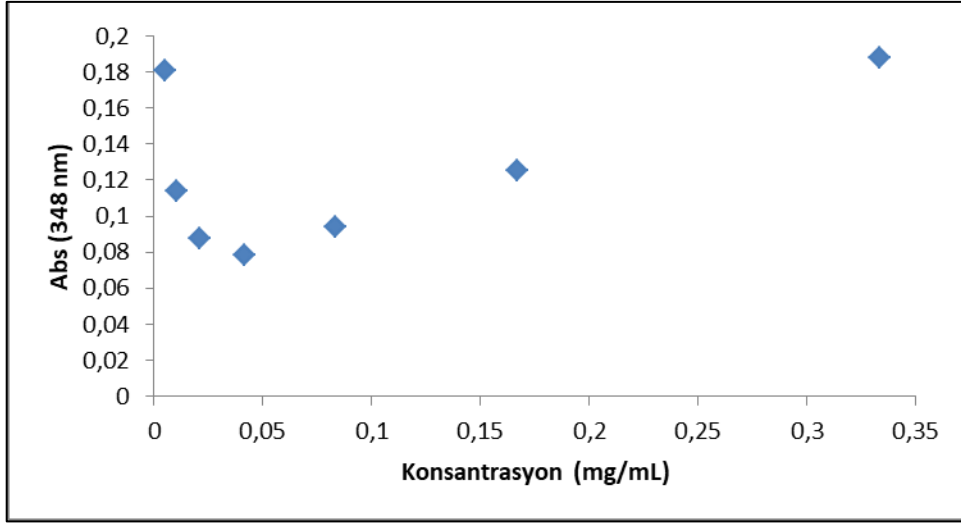
Yeni bir on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yöntemi geliştirilmeden önce on-line HPLC sisteminde etkili olabilecek sıcaklık, pH, tampon konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle esteraz aktivitesi için araştırılmış ve uygun şartlar belirlenmiştir. Optimum sıcaklık 50 °C, optimum pH 9 olarak bulunmuştur. Yöntemin geliştirilmesi için CA'nın iyi bilinen iki inhibitörü olan sülfanilamid ve asetazolamid standart olarak kullanılarak on-line HPLC-DAD-CAI yöntemi geliştirilmiş, CA inhibitörlerinin ve bitki ekstraktlarının en iyi şekilde ayrılması için kromatografik şartlar belirlenip, optimize edilmiştir. Bitki ekstraktları HPLC ile bileşenlerine ayrılıp DAD dedektörü ile kromatogramları belirli bir dalga boyunda belirlendikten sonra tüm bu şartlar kullanılarak karbonik anhidraz sisteme sürekli enjekte edilip eluatla karışması sağlanarak ve bir sonraki enjeksiyon noktasından sisteme substrat eklenerek enzim aktivitesi ve eluattaki bileşenlerin bunlara etkisi bir UV

dedektör aracılığı ile takip edilmiştir. Gerekli düzenlemeler yapılarak optimize edilen yöntem yüksek CA inhibisyon etkisi gösteren farklı bitki ekstraktlarına uygulanmıştır.

Yeni yöntem CA'ın standart inhibitörleri olan sülfanilamid ve asetazolamid kullanılarak geliştirilmiştir. Ayrıca yöntem geliştirme aşamasında mM seviyede IC_{50} değerleri olan fenolik bileşikler de kullanılmıştır. Bu yöntemle konsantrasyonu bilinen bileşiğin tek konsantrasyonda uygulamayla IC_{50} değerinin nasıl belirlenebileceği gösterilmiştir. Aynı sistem kullanılarak fraksiyon toplama ve sonrası klasik esteraz inhibisyon çalışması yapılarak kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik yöntem de uygulanmıştır. Bu yöntemin temel avantajı on-line yöntemdeki reaksiyon sarmalındaki süre kısıtlamasının (2-3 dk) ortadan kalkmasıdır. Toplanan fraksiyonlar için istenen herhangi bir reaksiyon süresi belirlenebilir. Bu noktada toplanan fraksiyonlarda nisbeten uçucu çözücünün bulunabilmesi göz önünde bulundurularak çalışma ya da okuma yapılabileceği kadar tüplerin ağzı parafilm ile kapatılmalıdır.

Daha önce geliştirilmiş olan on-line HPLC-FRAP antioksidan yöntemi CAI yöntemiyle birlikte kullanılarak kombine HPLC-DAD-FRAP-Spektrofotometrik CAI çalışması yapılmış, yöntemin getirdiği avantajlar ortaya konmuştur. Seçilen bitki ekstraktları geliştirilen yöntemle değerlendirilmiştir.

IC_{50} değeri mM seviyelerde olan fenolik bileşikler yöntemde analiz edildiklerinde aktif olarak gözükmemektedirler. Bu bileşiklerin prozon etkiye sahip olabileceği düşünülebilir. Prozon veya kanca etkisi, numunede çok yüksek miktarda bir analit bulunduğu gözlemlenir. Bu etkinin ortadan kaldırılması için analit konsantrasyonunun analitik ölçüm aralığı dahilinde kalması için 1:10, 1:100 veya hatta 1:1000 seyreltilmesi gerekebilir. Laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada da gilaburu meyvesinin metanollü ekstraktının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine etkisine bakılmış ve 0,05 mg/mL'nin üstündeki konsantrasyonlarda prozon etkiye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 178) (Koz vd., 2008).



Şekil 178. Gilaburu meyvesinin metanollü ekstraktının BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine etkisi

Geliştirilen yeni yöntemlerin yüksek aktiviteye sahip, IC_{50} değeri $50 \mu M$ 'ın altında olan klinik değeri yüksek bileşiklerin tespitinde kullanılabileceği ortaya konmuştur. Dolayısıyla geliştirilen on-line ve kombine yöntemler klinik uygulama potansiyeli olan yüksek aktiviteli bileşiklerin araştırılması çalışmalarında önemli bir araç olarak kullanılabilecektir.

5. ÖNERİLER

Geliştirilen ve uygulanan on-line HPLC-DAD-CAI ve kombine HPLC-DAD-Spektrofotometrik CAI yöntemleri doğal kaynaklardan ve karışım (kütüphane) sentezi çalışmalarından elde edilen karışımlardaki yüksek CAI etkisine sahip bileşiklerin belirlenmesinde önemli bir boşluğu dolduracaktır. Bu yöntemler diğer on-line HPLC-biyoaktivite yöntemleriyle birlikte kullanılarak biyoaktivite değeri yüksek olan çeşitli sektörlerde ve özellikle sağlıkta kullanılacak bileşiklerin tespiti yapılabilecektir.

Geliştirilen yöntemlerin daha ileri derecede optimizasyonu ve daha düşük aktiviteli bileşiklerin de tespitini sağlayacak hale getirilmesiyle ilgili iyileştirmeler yapılabilir. Bu amaçla çalışma grubumuzda farklı pompa sistemlerinin kullanılması planlanmaktadır. Ayrıca bu çalışmada sadece enzimin esteraz aktivitesinin on-line uygulanması çalışılmıştır. Enzimin hidrataz aktivitesinin de on-line HPLC uygulamaları yapılabilir ve grubumuzca planlanması yapılmaktadır.

Bu alanda daha ileri bir çok çalışma yapılabilecektir. Bunlardan bir diğeri enzim olarak CA'nın inhibisyonu klinik önemli olan insan CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin kullanılmasıyla yöntemin uygulanmasıdır. Her bir izoenzim için ayrı optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Bir diğer önemli gelişme benzer yöntemin CA aktivatörlerinin belirlenmesi için geliştirilmesidir. Mevcut yöntem bu haliyle bu amaçla da kullanılabilir, ancak yöntemin hassasiyetiyle ilgili çalışmalar yapılmalıdır. Bu saydığımız çalışmalar, grubuzun en önemli araştırma konusunu teşkil eden on-line HPLC uygulamaları arasında yapılmasını planladığı araştırmalar arasındadır.

Kuşkusuz önümüzdeki yıllarda on-line HPLC uygulamalarına önemli bir katkı yeni imkanlar sağlayan sistemlerin geliştirilmesi olacaktır. Bu anlamda kromatografik gürültüyü azaltacak sürekli ilaveye imkan veren pompa sistemleri, iyi karışmayı sağlayacak reaksiyon sarmalları ve karıştırıcılar, HPLC ile birlikte kullanılabilen sıcaklık (-10 °C - +90 °C) inkübatörleri önemli katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Abu-Reidah, I.M., Jamous, R.M. ve Ali-Shtayeh, M.S., 2014. Phytochemistry, Pharmacological Properties and Industrial Applications of *Rhus coriaria* L. (Sumac). Jordan Journal of Biological Sciences, 7, 4, 233 - 244.
- Adefegha, S.A., Oboh, G., 2012. In Vitro İnhibition Activity Of Polyphenol-Rich Extracts From *Syzygium Aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Clove) Buds Against Carbohydrate Hydrolyzing Enzymes Linked To Type 2 Diabetes And Fe²⁺-Induced Lipid Peroxidation İn Rat Pancreas. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 774-781.
- Aggarwal, B. B., 2008. The Past, Present And Future Of Multi-Targeted Cancer Treatment “Naturally”: Food For Thought. Cancer Lett., 269, 2, 187-188.
- Akbaba, Y., Akıncıoğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ. ve Supuran, C.T., 2013b. Carbonic Anhydrase İnhibitory Properties of Novel Sulfonamide Derivatives of Aminoindanes and Aminotetralins. J. Enzyme İnhib. Med. Chem., 29, 35-42.
- Akbaba, Y., Balaydın, H.T., Menzek, A., Göksu, S., Őahin, E. ve Ekinci, D., 2013a. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Bromophenol Derivatives as Carbonic Anhydrase İnhibitors, Arch. Pharm., 346, 447-454.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2013a. Novel Sulfamides as Potential Carbonic Anhydrase Isoenzymes İnhibitors, Bioorg. Med. Chem., 21, 379- 385.
- Akıncıoğlu, A., Topal, M., Gülçin, İ. ve Göksu, S., 2013b. Novel Sulfamides and Sulfonamides Incorporating Tetralin Scaffold as Carbonic Anhydrase and Acetylcholine esterase İnhibitors, Arch. Pharm., 347, 68-76.
- Aksu, K., Nar, M., Tan, M., Vullo, D., Gülçin, İ., Göksu, S., Tumer, F. ve Supuran, C. T., 2013. The Synthesis of Sulfamide Analogues of Dopamine Related Compounds and Their Carbonic Anhydrase İnhibitory Properties, Bioorg. Med. Chem., 21, 2925-2931.
- Akyüz, E., 2011. *Digitalis ferruginea ssp. schischkinii* ve Bazı Endemik *Digitalis* Türlerinin Ekstraktlarında Mevcut Kardiyak Glikozitleri Ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi, Doktora Tezi, K.T..., Fen Bilimleri Enstitusu, Trabzon.
- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C. and Shahidi, F., 2001. Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties, J. Agric. Food Chem., 49, 1410-1416.

- Alber, B. E. and Ferry, J. G., 1994. A Carbonic Anhydrase From the Archaeon *Methanosarcina thermophila*, P. Natl. Acad. Sci., 91, 6909-6913.
- Alp, C., Özsoy, S. ve Alp, N. A., 2012. Sulfapyridine Like Benzene Sulfonamide Derivatives As Inhibitors of Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II and VI. J Enzyme Inhib. Med. Chem., 27, 818-824.
- Alterio, V., Di Fiore, A. ve D'Ambrosio, K., 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?, Chem. Rev., 112, 4421-4468.
- Amoroso, G., Morell-Avrahov , L. ve Müller, D., 2005. The Gene *NCE103 (YNL036w)* from *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Functional Carbonic Anhydrase and Its Transcription is Regulated by the Concentration of Inorganic Carbon in the Medium, Mol. Microbiol., 56, 549-558.
- Andersson, B., Nyman, P. O. and Strid, L., 1972. Amino Acid Sequence of Human Erythrocyte CA B., Biochem. Bioph. Res. Co., 48, 670-677.
- Annie, F. ve Jean-Jacques, M., 2003. Phenolic Acids in Fruits and Vegetables. Flavonoids in Health and Disease, 2nd edn. New York, USA: CRC Press.
- Arabaci, B., Gülçin, İ. ve Alwasel, S., 2014. Capsaicin: a Potent Inhibitör of Carbonic Anhydrase Isoenzymes, Molecules, 19, 10103-10114
- ArasHisar, Ş., Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. ve Yanık, T., 2004. Effect of Vitamin E on Carbonic Anhydrase Enzyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Erythrocytes in vitro and in vivo. Acta Vet. Hung. 52, 413-422.
- Armstrong, J., Mc, D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification And Properties Of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase. J.Biol. Chem., 214, 5137.
- Arslan Burnaz, N., Küçük, M. ve Akar, Z., 2017. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1052, 66-72.
- Arslan, M., 2014. Meme Kanserli Kadın Hastalarda Kemoterapiye Bağlı Gelişen Bulantı, Kusma Ve Öğürme Üzerine Zencefil Kullanımının Etkisi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A New Method For The Purification Of Carbonic Anhydrase Isozymes By Affinity Chromatography, Turkish Journal of Medical Sciences, 26, 163-166.

- Arts I.C., Van de Putte, B. ve Hollman, P.C., 2000. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods, J Agric Food Chem., 48, 1746-1751.
- Aydemir, S., 2012. Kuşburnu Bitkisinin Biyoaktif Kompozisyonu. Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Aydın, S., 2011. Keçiboynuzu Meyvesinden Sürülebilir Bir Ürün Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Aysel, M. B., 2008. Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.) Ve Mercanköşk (*Origanum Onites* L.) Bitkilerindeki Antioksidan Aktivite Potansiyellerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Badger, M. R. and Price, G. D., 1994. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 45, 369-392.
- Baki, E., 2009. Türkiye’de Adaçayı Olarak Satılan Bitkiler Üzerinde Fitoterapi Yönünden Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., 2006. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence and Potential Uses, Food Chemistry, 99, 191- 203.
- Balaydın, H. T., Durdağı, S., Ekinci, D., Şentürk, M., Göksu, S. ve Menzek, A., 2012a. Inhibition of Human Carbonic Anhydrase Isozymes I, II and VI with a Series of Bisphenol, Methoxy and Bromophenol Compounds, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 27, 467-475.
- Balaydın, H. T., Şentürk, M., Göksu, S. ve Menzek, A., 2012b. Synthesis and Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Novel Bromophenols and Their Derivatives Including Natural Products: Vidalol B., Eur. J. Med. Chem., 54, 423-428.
- Banerjee S.K., Mukherjee P.K. ve Maulic, S.K., 2003. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. Phytother Res., 17, 97 -106.
- Barros, L., Carvalho, A. M. ve Ferreira, I.C.F., 2010. Leaves, Flowers, Immature Fruits And Leafy Flowered Stems Of Malva Sylvestris: A Comparative Study Of The Nutraceutical Potential And Composition. Food and Chemical Toxicology, 48, 1466-1472.
- Bavaresco, L., 2003. Role of Viticultural Factors on Stilbene Concentrations of Grapes and Wine. Drugs under Experimental and Clinical Research, 29, 181-187.

- Berenji, F., Rakhshandeh, H. ve Ebrahimipour, H., 2010. In vitro study of the effects of henna extracts (*Lawsonia inermis*) on *Malassezia* species. Jundishapur J Microbiol, 3, 3, 125-128.
- Beydemir, Ş. ve Gülçin, İ., 2004. Effect of Melatonin on Carbonic Anhydrase from Human Erythrocyte in vitro and From Rat Erythrocyte in vivo. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 19, 193-197.
- Biswas, S., Aggarwal, M., Güzel O., et al. 2011. Conformational Variability of Different Sulfonamide Inhibitors with Thienyl-Acetamido Moieties Attributes to Differential Binding in the Active Site of Cytosolic Human Carbonic Anhydrase Isoforms, Bioorg Med Chem., 19, 3732-3738.
- Bombardelli, E. ve Morazzoni, P., 1995. *Hypericum perforatum*, Fitoterapia, 66, 43-68.
- Bonneau, A., Maresca, A., Winum, J. Y. ve Supuran, C. T., 2013. Metronidazolecoumarin Conjugates and 3-Cyano-7-Hydroxy-Coumarin Act as Isoform-Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 28, 397-401.
- Boone, C. D., Pinard, M., McKenna, R. ve Silverman, D., 2014. Catalytic Mechanism of α -Class Carbonic Anhydrases: CO₂ Hydration and Proton Transfer-Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications, Frost, S. C., McKenna, R. (ed.), Subcell. Biochem. 31-52.
- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutr. Rev., 56, 317-333.
- Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., vd., 1997. Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations Form the Interaction of Isozymes I and II with Histamine. Biochemistry, 36, 10384-10392.
- Butler, M. S. ve Buss, A. D., 2006. Biochem. Pharmacol., 71, 919.
- Butler, M. S. ve Cooper, M. A. J., 2011. Antibiot., 64, 413.
- Butler, M.S., 2004. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. J. Nat. Prod., 67, 2141-2153.
- Capasso, C. ve Supuran, C. T. 2014. Sulfa and Trimethoprim-Like Drugs -Antimetabolites Acting As Carbonic Anhydrase, Dihydropteroate Synthase and Dihydrofolate Reductase Inhibitors, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 29, 379-87.

- Carrea, G. ve Riva, S., 2008. Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media, Wiley.com.
- Carta, F., Garaj, V., Maresca, A., et al. 2011. Sulfonamides Incorporating 1,3,5-Triazine Moieties Selectively and Potently Inhibit Carbonic Anhydrase Transmembrane Isoforms IX, XII and XIV over Cytosolic Isoforms I and II: Solution and X-ray Crystallographic Studies, Bioorg. Med. Chem., 19, 3105-3119.
- Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A., et al. 2012. 5- and 6-Membered (thio)Lactones are Prodrug Type Carbonic Anhydrase Inhibitors, Bioorg Med. Chem. Lett., 22, 267-270.
- Carta, F., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., 2012. Sulfonamides (RSO₂NH₂): a Patent Review 2008-2012. Expert Opin Ther Patents, 22, 747-758.
- Carta, F., Temperini, C., Innocenti, A., et al. 2010. Polyamines Inhibit Carbonic Anhydrases by Anchoring to the Zinc-Coordinated Water Molecule, J Med Chem., 53, 5511-22.
- Cazes, J., 2005. Ewing's Analytical Instrumentation Handbook (3.bs.). New York, U.S.A: Marcel Dekker.
- Cerrahoğlu, E., Eflatun Çiçekli Ballıbababa (*Lamium Purpureum*) Bitkisinden Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyon Ve İmmobilizasyonunun İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Sakarya, 2014.
- Clifford, M.N. 2000. Anthocyanins-Nature, Occurrence and Dietary Burden, J. Food Sci. Agric., 80, 1063-1072.
- Coward, L., Smith, M., Kirk, M. ve Barnes, S., 1998. Chemical Modification of Isoflavones in Soyfoods During Cooking and Processing, Am. J. Clin. Nutr., 68, 1486-1491.
- Cox, E. H., McLendon, G. L., Morel, F. M. vd., 2000. The Active Site Structure of *Thalassiosira weissflogii* Carbonic Anhydrase 1., Biochemistry, 39, 12128-12130.
- Cuatracases, P., 1970. Protein Purification By Affinity Chromatography. Derivatizations Of Agarose And Polyacrylamide Beads. J. Biol. Chem., 245, 3059.
- Çapanoğlu, E., Boyacıoğlu, D., Ric, C.H., Hall, R.D. ve Beekwilder, J., 2011. Procyanidins İn Fruit From Sour Cherry (*Prunus Cerasus*) Differ Strongly İn Chainlength From Those İn Laurel Cherry (*Prunus Lauracerasus*) And Cornelian Cherry (*Cornus Mas*). Journal of Berry Research, 1, 137-146.

- Çayır, E., 2014. Yaş ve Kuru Nane Bitkilerinde Antioksidan Aktivite Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çelikkol, D., 2015. *Hypericum Perforatum L.* Bitkisinden Elde Edilen Kantaron Yağının Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Çetinkaya, Y., Göçer, H., Göksu, S. ve Gülçin, İ., 2013. Synthesis and Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitory Effects of Novel Benzylamine Derivatives, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 29, 168-174.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. ve Ekinçi, D., 2007. Morphine Inhibits Erythrocyte Carbonic Anhydrase in vitro and in vivo. Biol. Pharm. Bull. 30, 2257-2261.
- D'Ambrosio, K., Carradori, S., Monti, S. M., et al. 2015. Out of the Active Site Binding Pocket for Carbonic Anhydrase Inhibitors, Chem. Commun., 51, 302-305.
- Davis, R. A., Innocenti, A., Poulsen, S. A. ve Supuran, C. T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Identification of Selective Inhibitors of the Human Mitochondrial Isozymes VA and VB over the Cytosolic Isozymes I and II from a Natural Product-Based Phenolic Library, Bioorg Med Chem., 18, 14-18.
- De Simone, G., Di Fiore, A., Capasso, C. ve Supuran, C. T., 2015. The zinc Coordination Pattern in the η -Carbonic Anhydrase from *Plasmodium falciparum* is Different From All Other Carbonic Anhydrase Genetic Families, Bioorg. Med. Chem. Lett. 25, 1385-1389.
- Del Prete, S., Vullo, D., De Luca, V., vd., 2014. Biochemical Characterization of the δ -Carbonic Anhydrase from the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii*, TweCA, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 29, 906-911.
- Del Prete, S., Vullo, D., Fisher, G. M., vd., 2014. Discovery of a New Family of Carbonic Anhydrases in the Malaria Pathogen *Plasmodium falciparum* - The η -Carbonic Anhydrases, Bioorg. Med. Chem. Lett., 24, 4389-4396.
- Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B. ve Latruffe, N., 2006. Resveratrol as a Chemopreventive Agent: A Promising Molecule for Fighting Cancer, Current Drug Targets, 7, 423-442.
- Ding, M., Leach, M.J. ve Bradley, H., 2013. A Systematic Review Of The Evidence For Topical Use Of Ginger. Explore (NY), 9, 6, 361-364.
- Doğan, H., 2015. Yeni Bir On-line HPLC İndikatör Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Mor Lahana Ekstraktına Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Doğu, İ., 2014. Tip 2 Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda *Prunus Laurocerasus* (Karayemiş)' Un Oksidan-Antioksidan Sistemler Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Domsic, J. F., Avvaru, B. S., Kim, C.U., vd., 2008. Entrapment of Carbon Dioxide in the Active Site of Carbonic Anhydrase II, J. Biol. Chem. 283, 30766-30771.
- Duman-Özler, M., 2017. Piyasadan Temin Edilen Lavanta Örneklerinin Uçucu Yağ Bileşimi. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Elleuche, S. and Pöggeler, S., 2010. Carbonic Anhydrases in Fungi, Microbiology 156, 23-29.
- Es-Safi, N.E, Cheynier, V. ve Moutounet, M., 2002. Interactions Between Cyanidin 3-O-Glucoside and Furfural Derivatives and Their Impact on Food Color Changes, J. Agric. Food Chem., 50, 5586-5595.
- Ettre, L. S., 2003. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography, LCGC, 21, 458-467.
- Eyupoğlu, O. E., 2017. HPLC ile Proteinlerin Ayrılmasında Deteksiyon Amaçlı Yeni On-Line Yöntemin Geliştirilmesi ve Gıda ve İlaç Analizinde Uygulanması. Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Fabrizi, F., Mincione, F., Somma, T., vd., 2012. A New Approach to Antiglaucoma Drugs: Carbonic Anhydrase Inhibitors with or without NO Donating Moieties. Mechanism of Action and Preliminary Pharmacology, J Enzyme Inhib Med Chem, 27, 138-147.
- Feng, Y., McDonald, C.E. ve Vick, B.A., 1988. C-Glycosylflavones From Hard Red Spring Wheat Bran, Cereal Chem., 65, 452-456.
- Ferry, J. G., 2010. The gamma Class of Carbonic Anhydrases, Biochim. Biophys. Acta 1804, 374-381.
- Fukuzawa, H., Suzuki, E., Komukai, Y. and Miyachi, S., 1992. A Gene Homologous to Chloroplast Carbonic Anhydrase is Essential to Photosynthetic Carbon dioxide Fixation by *Synechococcus* PCC 7942, P. Natl. Acad. Sci., 89, 4437- 4441.
- Gasparettoa, J. C., Martinsa, C. A. F., Hayashia, S. S., Otuky, M. F. ve Pontaroloa, R., 2011. Ethnobotanical And Scientific Aspects Of *Malva Sylvestris* L.: A Millennial Herbal Medicine. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 64,172-189.
- Giordano, M., Beardall, J. and Raven, J. A., 2005. CO₂ Concentrating Mechanism in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation and Evolution, Annu. Rev. Plant. Biol., 56, 99-131.

- Goyal, S., Lambert, C., Cluzet, S., Me´ rillon, J. M. ve Ramawat, K.G., 2012. Secondary Metabolites and Plant Defence. In: Plant Defence: Biological Control (edited by J.M.M. Me´ rillon & K.G.G. Ramawat). 109-138. Berlin: Springer.
- Göçer, H., Çetinkaya, Y., Göksu, S., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2014. Carbonic Anhydrase and Acetylcholine esterase Inhibitory Effects of Carbamates and Sulfamoylcarbamates. J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 30, 316-320.
- Göçer, H. ve Gülçin, İ., 2013. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): a Potent Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitor. Int. J. Acad. Res. 5, 150-155.
- Göksu, S., Naderi, A., Akbaba, Y., Kalın, P., Akıncıoğlu, A., Gülçin, İ., Durdağı, S. ve Salmas, R. E., 2014. Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Novel Benzylsulfamides Using Molecular Modeling and Experimental Studies. Bioorg. Chem., 56, 75-82.
- Gözüböyük, S.G., 2013. Erzurum ve Çevresindeki Hastalardan İzole Edilen Dermatofitler Üzerine Kınanın (*Lawsonia Inermis*) Antifungal Aktivitesinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.
- Gülçin, İ. ve Beydemir, Ş., 2013. Phenolic Compounds as Antioxidants: Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitors, Mini Rev. Med. Chem., 13, 408-430.
- Güney, M., Coşkun, A., Topal, F., Daştan, A., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2014. Oxidation of Cyanobenzocycloheptatrienes: Synthesis, Photooxygenation Reaction and Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibition Properties of Some New Benzotropone Derivatives, Bioorg. Med. Chem., 22, 3537-3543.
- Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., Plata-Oviedo, M.S.V. ve Peralta, R.M., 2012. International Journal of Food Science and Technology, 47, 2023-2044.
- Harborne, J. B. and Williams, C. A., 2000. Advances in Flavonoid Research since 1992, Phytochemistry, 55, 481-504.
- Henderson, L. E., Henriksson, D. and Nyman, P. O., 1973. Amino Acid Sequence of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase C., Biochem. Bioph. Res. Co. 52, 1388-1394.
- Henry, R. P., 1996. Multiple Roles of Carbonic Anhydrase in Cellular Transport and Metabolism, Annu. Rev. Physiol., 58, 523-538.
- Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E., 1996. Functional Diversity, Conservation and Convergence in the Evolution of the α , β and γ -Carbonic Anhydrase Gene Families, Mol. Phylogenet. Evol., 5, 1, 50-77.

- Hostettmann, K., Wolfender, J.L. ve Terreaux, C., 2001. Modern Screening Techniques for Plant Extracts, Pharm. Biol., 39, 18-32.
- Ignat, I., Volf, I. ve Popa, V.I., 2011. A critical Review of Methods for Characterisation of Polyphenolic Compounds in Fruits and Vegetables, Food Chemistry, 126, 1821-1835.
- Ingkaninan, K., de Best, C.M., Van der Heijden, R., Hofte, A.J.P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U.R., Van der Greef, J. ve Verpoorte, R., 2000a. High-Performance Liquid Chromatography With On-Line Coupled UV, Mass Spectrometric And Biochemical Detection For Identification Of Acetylcholinesterase Inhibitors From Natural Products. J. Chromatogr. A, 872, 61-73.
- Ingkaninan, K., Hazekamp, A., de Best, C.M., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Heijden, R., van der Greef, J. ve Verpoorte, R., 2000b. The Application Of HPLC With On-Line Coupled UV/MS-Biochemical Detection For Isolation Of An Acetylcholinesterase Inhibitor From *Narcissus* —Sir Winston Churchill. J. Nat. Prod., 63, 803-806.
- Innocenti, A., Durdagi, S., Doostdar, N., et al. 2010. Nanoscale Enzyme Inhibitors: Fullerenes Inhibit Carbonic Anhydrase by Occluding the Active Site Entrance, Bioorg Med Chem., 18, 2822-2828.
- Innocenti, A., Gülçin, İ., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., 2010a. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Antioxidant Polyphenol Natural Products Effectively Inhibit Mammalian Isoforms I-XV. Bioorg. Med. Chem. Lett., 20, 5050-5053.
- Innocenti, A., Öztürk-Sarıkaya, S. B., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2010b. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Mammalian Isoforms I-XIV with a Series of Natural Product Polyphenols and Phenolic Acids, Bioorg. Med. Chem. 18, 2159-2164.
- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., 2008. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Mammalian Isoforms I-XIV with a Series of Substituted Phenols Including Paracetamol and Salicylic Acid, Bioorg Med Chem., 16, 7424-7428.
- Iverson, T. M., Alber, B. E., Kisker, C., vd., 2000. A Closer Look at the Active Site of γ -Carbonic Anhydrases: High Resolution Crystallographic Studies of the Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila*, Biochemistry, 39, 9222-9231.
- Kafalı, H., 2008. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kolon Sonrası Türevlendirme ile 7 Adet Sulfonamid Tespitinin Metot Validasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I. and Heinonen, M., 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4076-4082.
- Kandel, M., Gonall, A.G., Wong, S. and Kondel, S.I., 1970. Some Characteristics Of Human, Bovine And Horse Carbonic Anhydrase As Revealed By Inactivation Studies. J. Biol. Chem., 245, 2444.
- Karkacier, M. ve Artık, N., 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia Siliqua L.*) Fiziksel Özellikleri, Kimyasal Bileşimi ve Ekstraksiyon Koşulları, Gıda, 20, 3, 131-136.
- Karrasch, M., Bott, M. ve Thauer, R. K., 1989. Carbonic Anhydrase Activity in Acetat Grown *Methanosarcina barkeri.*, Arch. Microbiol. 151, 137-142.
- Kato, Y., Nakamura, K., Kitamura, T., Tsuda, T., Hasegawa, M. ve Sasaki, H., 2004. Effect of Chromatographic Conditions on Resolution in High-Performance Ion-Exchange Chromatography of Proteins on Macroporous Anionexchange Resin, Journal of Chromatography A, 1031, 101-105.
- Keilin, D. and Mann, T., 1944. Activity of Purified Carbonic Anhydrase, Nature, 153, 107-108.
- Kenkel, J., 1994. Analytical Chemistry for Technicians (2.bs.). Washington, D.C: Lewis Publishers.
- King, H.G.C., 1962. Phenolic Compounds of Commercial Wheat Germ. J. Food Sci., 27, 446-454.
- Klenkar, J., and Molnar, M., 2015. Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents, J. Chem. Pharmaceu. Res., 7, 1223-1238.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M. vd., 2010. Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from *Arabidopsis thaliana*, Plant Cell, 22, 797-810.
- Kohn, J. and Wilchek, M.A., 1978. Colorimetric Method For Monitoring Activation Of Sepharose By Cyanogen Bromide, Biochem. Biophys. Res. Com., 7, 14.
- Kool, J., van Liempd, S.M., Ramautar, R., Schenk, T., Meerman, J.H.N., Irth, H., Commandeur, J.N.M. ve Vermeulen, N.P.E., 2005. Development Of A Novel Cytochrome P450 Bioaffinity Detection System Coupled Online To Gradient Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. J. Biomol. Screen., 10, 427-436.
- Koz, M., Demir, A. ve Şen, İ. U., 2008. Karayemiş ve Gilaburu Meyve Özütlerinin Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkisi. Lisans Bitirme Tezi, K.T.Ü., Fen-Edebiyat Fakültesi, Trabzon.

- Kumar, R. S. and Ferry, J. G., 2014. Prokaryotic Carbonic Anhydrases of Earth's Environment. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. - In: Frost, S. C., McKenna, R. (ed.), Subcell. Biochem., 77-87.
- Kunnumakkara, A. B., Anand, P. ve Aggarwal, B. B., 2008. Curcumin Inhibits Proliferation, Invasion, Angiogenesis And Metastasis Of Different Cancers Through Interaction With Multiple Cell Signaling Proteins, Cancer Lett., 269, 2, 199-225.
- Kupiec, T., 2004. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography, International Journal of Pharmaceutical Compounding, 8, 223-227.
- Kupriyanova, E. V., Sinetova, M. A. ve Cho, S.M., 2013. CO₂- Concentrating Mechanism in Cyanobacterial Photosynthesis: Organization, Physiological Role and Evolutionary Origin, Photosynth. Res., 117, 133-146.
- Kupriyanova, E., Pronina, N. and Los, D., 2017. Carbonic Anhydrase-a Universal Enzyme of the Carbon-Based Life, Photosynthetica, 55, 1, 3-19.
- Kutlu, Z., 2013. Meyan Kökü (*Glycyrrhiza Glabra*) ve Karanfil (*Syzygium Aromaticum*) Baharatlarından Elde Edilen Ekstraktların In vitro Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Lachance, H., Wetzel, S., Kumar, K. ve Waldmann, H. J., 2012. Med. Chem.55, 5989.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During In Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. Nature, 227, 680.
- Lake, B., 1999. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment, Food and Chemical Toxicology, 37, 423-453.
- Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B. ve Engelhardt, U. H., 2000. Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and Other Caffeinated Beverages. J. Agric. Food Chem., 48, 2848-2852.
- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1997. Development and Pharmacological Characterization Of A Modified Procedure For The Measurement Of Carbonic Anhydrase Activity. J. Pharmacol. Toxicol. Methods, 38, 169-172.
- Lane, T. W. and Morel, F. M., 2000. A Biological Function for Cadmium in Marine Diatoms, P. Natl. Acad. Sci., 97, 4627-4631.
- Lane, T. W., Saito, M. A., George, G. N., vd., 2005. A Cadmium Enzyme from a Marine Diatom, Nature 435, 42.

- Li, D. Q., Qian, Z.M. ve Li, S.P., 2010. Inhibition Of Three Selected Beverage Extracts On A-Glucosidase And Rapid Identification Of Their Active Compounds Using HPLC-DAD-MS/MS And Biochemical Detection. J. Agric. Food Chem., 58, 6608-6613.
- Liljas, A. and Laurberg, M., 2000. A Wheel Invented Three Times. The Molecular Structures of the Three Carbonic Anhydrases, EMBO Reports, 1, 1, 16-17.
- Liljas, A., Kannan, K. K., Bergstén, P. C., vd., 1972. Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase C., Nature, 235, 131-137.
- Lin, K. and Deutsch, H. F., 1973. Human Carbonic Anhydrase XI. The Complete Primary Structure of Carbonic Anhydrase B., J. Biol. Chem., 248, 1885-1893.
- Lin, K. and Deutsch, H. F., 1974. Human carbonic anhydrase XII. The Complete Primary Structure of Carbonic Anhydrase C., J. Biol. Chem., 249, 2329-2337.
- Long, B. M., Rae, B. D., Rolland, V., *et al.*, 2016. Cyanobacterial CO₂- Concentrating Mechanism Components: Function and Prospects for Plant Metabolic Engineering., Curr. Opin. Plant. Biol., 31, 1-8.
- Macarron, R., Banks, M.N., Bojanic, D., Burns, D.J, Cirovic, D.A ve Garyantes, T., 2011. Impact Of High-Throughput Screening In Biomedical Research. Nature Reviews. Drug Discovery., 10, 188-195.
- Malherbe, C. J., Beer, D. ve Joubert, E., 2012. Development of On-Line High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Biochemical Detection Methods as Tools in the Identification of Bioactives. Int. J. Mol. Sci., 13, 3101-3133.
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P. and Sharma, P.K., 2010. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review, Journal of Global Pharma Technology, 2, 22-26.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L., 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, Am. J. Clin. Nutr., 79, 727-747.
- Mann, J., 2002. Nat. Rev. Cancer, 2, 143.
- Mann, T. ve Keilin, D., 1940. Sulphanilamide as a Specific Carbonic Anhydrase Inhibitor, Nature, 146, 164-165.
- Maren, C.H., 1960. A Simplified Micromethod For The Determination Of Carbonic Anhydrase and Its Inhibitors, J. Pharmac. Exp. Ther., 26, 130.
- Maren, T. H., 1967. Carbonic Anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. Physiol. Rev., 47, 595-781.

- Maresca, A. ve Supuran, C. T. 2010. Coumarins Incorporating Hydroxy- and Chloro-Moieties Selectively Inhibit the Transmembrane, Tumor associated Carbonic Anhydrase Isoforms IX and XII over the Cytosolic Ones I and II., Bioorg. Med. Chem. Lett., 20, 4511-4514.
- Maresca, A., Temperini, C., Pochet, L., et al. 2010. Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins, J. Med. Chem., 53, 335-344.
- Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., et al. 2009. Non-zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins are a New Class of Suicide Inhibitors, J. Am. Chem. Soc., 131, 3057-3062.
- Martin, D. P. ve Cohen, S. M., 2012. Nucleophile Recognition as an Alternative Inhibition Mode for Benzoic Acid Based Carbonic Anhydrase Inhibitors, Chem. Commun., 48, 5259-5261.
- Martins, N., Barros, L., Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreirara I., 2015. Evaluation Of Bioactive Properties And Phenolic Compounds In Different Extracts Prepared From *Salvia Officinalis* L., Food Chemistry, 170, 378-385.
- Mavlyanov, S.M., Islambekov, S.Y., Karimdzhanov, A.K. ve Ismailov, A.I., 1997. Anthocyanins and organic acids of fruits of certain kinds of sumac. Khim Prir Soedin, 279-280.
- McKenna, R. and Supuran, C. T., 2014. Carbonic Anhydrase Inhibitors Drug Design. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Frost, S. C., McKenna, R. (ed.), Subcell. Biochem., 291-323.
- Meldrum, N. N. and Roughton, F. J. W., 1933. Carbonic Anhydrase: Its Preparation and Properties, J. Physiol., 80, 113-142.
- Middleton, E., Kandaswami, C. ve Theoharides, T. C., 2000. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer, Pharmacol Rev., 52, 673-751.
- Montazeri, N., Baher, E., Mirzajani, F., Barami, Z. ve Yousefian, S., 2011. Phytochemical Contents And Biological Activities Of *Rosa Canina* Fruit From Iran. J. Med. Plants Res., 5, 4584-4589.
- Moroney, J. V., Ma, Y., Frey, W. D. vd., 2011. The Carbonic Anhydrase Isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: Intracellular Location, Expression, and Physiological Roles. Photosynth. Res., 109, 133-149.
- Naczki, M. and Shahidi, F., 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. J. Chromatogr. A, 1054, 95-111.

- Nair, S. K., Ludwig, P. A ve Christianson, D. W. 1994. Two-Site Binding of Phenol in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II: Structural Implications for Substrate Association, J. Am. Chem. Soc., 116, 3659-3660.
- Nar, M., Çetinkaya, Y., Gülçin, İ. ve Menzek, A., 2013. (3,4-Dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl)Methanone and Its Derivatives as Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitors, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 28, 402-406.
- Neish, A. C., 1939. Studies on Chloroplasts, Their Chemical Composition and the Distribution of Certain Metabolites Between the Chloroplasts and the Remainder of the Leaf. Biochem. J., 33, 300-308.
- Öztürk-Sarıkaya, S. B., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Human Erythrocyte Isozymes I and II with a Series of Phenolic Acids. Chem. Biol. Drug Des., 75, 515-520.
- Öztürk-Sarıkaya, S. B., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T., 2011. In vitro Inhibition of α -Carbonic Anhydrase Isozymes by Some Phenolic Compounds, Bioorg. Med. Chem. Lett., 21, 4259-4262.
- Pacchiano, F., Aggarwal, M., Avvaru, B. S., et al., 2010. Selective Hydrophobic Pocket Binding Observed within the Carbonic Anhydrase II Active Site Accommodate Different 4-Substituted-Ureido-Benzenesulfonamides and Correlate to Inhibitor Potency, Chem Commun., 46, 8371-8373.
- Park, H., Song, B. ve Morel, F.M.M., 2007. Diversity of the Cadmium Containing Carbonic Anhydrase in Marine Diatoms and Natural Waters, Environ. Microbiol., 9, 403-413.
- Parkkila, S., Innocenti, A., Kallio, H., et al. 2009. The Protein Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib and Nilotinib Strongly Inhibit Several Mammalian α -Carbonic Anhydrase Isoforms, Bioorg Med. Chem. Lett., 19, 4102-4106.
- Parkkila, S., Vullo, D., Puccetti, L., Parkkila, A. K., Scozzafava, A. ve Supuran, C. S., 2006. Carbonic Anhydrase Activators: Activation of Isozyme XIII with Amino Acids and Amines. Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 3955-3959.
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J. ve Supuran, C. T., 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 19, 199-229.
- Plou, F.J., Iborra, J. L. ve Halling, P.J., 1998. Stability and stabilization of biocatalysts, Elsevier, 15, 1.
- Potterat, O. ve Hamburger, M., 2006. Natural Products in Drug Discovery—Concepts and Approaches for Tracking Bioactivity. Curr. Org. Chem., 10, 899-920.

- Price, G. D., Badger, M. R., Wodger, F. J. ve Long, B. M., 2008. Advances in Understanding the Cyanobacterial CO₂-Concentrating Mechanism (CCM): Functional Components, C_i Transporters, Diversity, Genetic Regulation and Prospects for Engineering into Plants, J. Exp. Bot. 59, 1441-1461.
- Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M. ve Watson, B. T. 1995. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot Noir Grapes and Wine, Am. J. Enol. Vitic., 46, 187-194.
- Rabinowitch, E. I., 1945. Photosynthesis and Related Processes. Interscience Publishers, New York, 1, 177.
- Reungprapavut, S., Krungkrai, S. R. ve Krungkrai, J., 2004. *Plasmodium falciparum* Carbonic Anhydrase is a Possible Target for Malaria Chemotherapy, J. Enzym. Inhib. Med. Ch., 19, 249-256.
- Rhee, I.K., Appels, N., Luijendijk, T., Irth, H. ve Verpoorte, R., 2003. Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity In Plant Extracts Using A Fluorimetric Flow Assay. Phytochem. Anal., 14, 145-149.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H. ve Edsall, J.T., 1964. Carbonic Anhydrases From Human Erythrocytes. Preparation And Properties Of Two Enzymes. J. Biol. Chem., 239, 1065-1078.
- Robards, K. and Antolovich, M., 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids Review, Analyst, 122, 11-34.
- Robards, K., 2003. Strategies for the Determination of Bioactive Phenols in Plants, Fruit and Vegetables, J. Chromatogr., A, 1000, 657-691.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. and Glover, W., 1999. Phenolic Compounds and Their Roles in Oxidative Process in Fruits, Food Chemistry, 66, 401-436.
- Roberts, S. B., Lane, T. W. ve Morel, F. M., 1997. Carbonic Anhydrase in the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae), J. Phycol., 33, 845-850.
- Rowlett, R. S., 2014. Structure and Catalytic Mechanism of β -carbonic Anhydrases. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. - In: Frost, S. C., McKenna, R. (ed.), Subcell. Biochem. Springer 53-76.
- Sartelet, H., Serghat, S., Lobstein, A., et al., 1996. Flavonoids Extracted From Fonio Millet (*Digitaria exilis*) Reveal Potent Antithyroid Properties, Nutrition, 12, 100-106.

- Schenk, T., Breel, G. J., Koevoets, P., Berg, S. V., Hogenboom, A. C., vd., 2003. Screening of Natural Products Extracts for the Presence of Phosphodiesterase Inhibitors Using Liquid Chromatography Coupled Online to Parallel Biochemical Detection and Chemical Characterization, J. Biomol. Screen., 8, 421-429.
- Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2002a. Carbonic Anhydrase Activators: High Affinity Isozymes I, II, and IV Activators, Incorporating a Beta-alanyl-histidine scaffold, J. Med. Chem., 45, 284-291.
- Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2002b. Carbonic Anhydrase Activators: Human Isozyme II is Strongly Activated by Oligopeptides Incorporating the Carboxyterminal Sequence of the Bicarbonate Anion Exchanger AE1. Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 1177-1180.
- Scozzafava, A., Carta, F. ve Supuran, C. T., 2013. Secondary and Tertiary Sulfonamides: A Patent Review (2008-2012), Expert Opin. Ther. Pat., 23, 203-213.
- Segel, I. H., 1968. Biochemical Calculations: Enzim kinetics. John Wiley and Sons, Inc, New York, 213.
- Sharma, A., Tiwari, M. ve Supuran, C. T., 2014. Novel Coumarins and Benzocoumarins Acting as Isoform-Selective Inhibitors Against the Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX., J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 29, 292-296.
- Shen, D. D., Pan, M. H., Wu, Q. L., Park, C. H., Juliani, H. R., Ho, C. T. ve Simon, J. E., 2011. A Rapid LC/MS/MS Method for the Analysis of Nonvolatile Antiinflammatory Agents from Mentha spp. Journal of Food Science, 76, 6, 900-908.
- Shi, S. Y., Zhang, Y. P., Jiang, X. Y., Chen, NX. P. ve Huang, K. L., 2009. Coupling HPLC To On-Line, Post-Column (Bio)Chemical Assays For High-Resolution Screening Of Bioactive Compounds From Complex Mixtures. Trends in Analytical Chemistry, 28,7
- Shi, S.Y., Zhou, H.H., Zhang, Y.P., Jiang, X.Y., Chen, X.Q. ve Huang, K.L., 2009. Coupling HPLC to on-line, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures. Trends in Analytical Chemistry, 28: 865-877.
- Shu-Yun, S., Hong-Hao, Z., Yu-Ping, Z., Xin-Yu, J., vd., 2009. Coupling HPLC to On-Line, Post-Column (Bio)chemical Assays for High-Resolution Screening of Bioactive Compounds From Complex Mixtures, Trends in Analytical Chemistry, 28, 865-877.
- Silverman, D. N. and McKenna, R., 2007. Solvent-Mediated Proton Transfer in Catalysis by Carbonic Anhydrase, Acc. Chem. Res., 40, 669- 675.

- Silverman, D. N. and Lindskog, S., 1988. The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase: Implications of a Rate-Limiting Proteolysis of Water, Acc. Chem. Res. 21, 30-36.
- Simone, G. D, Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., 2009. Which Carbonic Anhydrases are Targeted by the Antiepileptic Sulfonamides and Sulfamates?, Chem Biol Drug Des., 74, 317-321.
- Simonsson, I., Jonsson, B. H. ve Lindskog, S., 1982. Phenol, a Competitive Inhibitor of CO₂ Hydration Catalyzed by Carbonic Anhydrase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 108, 1406-1412.
- Skoog D.A., Holler F.H. ve Crouch S.R., 2007. Principles of Instrumental Analysis, Thompson Brooks, California, USA, 17-21.
- Skoog, D.A., James-Holler, F. ve Nieman, T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H., Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Sly W.S. ve Hu P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. Annu Rev Biochem, 64, 375-401.
- Smith, K. S. and Ferry, J. G., 2000. Prokaryotic Carbonic Anhydrases, FEMS Microbiol. Rev., 24, 335-366.
- Sosulski, F., Krygier, K. ve Hogge, L. 1982. Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic acids. 3. Composition of Phenolic acids in Cereal and Potato Flours. J. Agric. Food Chem., 30, 337-340.
- Spacil, Z., Novakova, L. ve Solich, P., 2008. Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography. Talanta, 76, 189-199.
- Stadie, W. C. and O'Brien, H., 1933. The Catalysis of the Hydration of Carbonic Dioxide and Dehydration of Carbonic Acid by the Enzyme from Red Blood Cells, J. Biol. Chem., 103, 521-529.
- Suarez Covarrubias, A., Larsson, T. A., Högbom, M., vd., 2005. Structure and Function of Carbonic Anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem., 280, 18782-18789.
- Sun, M. K. and Alkon, D. L., 2001. Pharmacological Enhancement of Synaptic Efficacy, Spatial Learning and Memory Through Carbonic Anhydrase Activation in Rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., 297, 961-967.
- Sun, M. K. and Alkon, D. L., 2002. Carbonic Anhydrase Gating of Attention: Memory Therapy and Enhancement, Trends Pharmacol. Sci., 23, 83-89 .

- Supuran C. T., 2008b. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. Nat Rev Drug Discov., 7, 168-181.
- Supuran, C. T., 2008a. Carbonic Anhydrases-an Overview, Curr. Pharm. Des., 14, 603-614.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A. 1999. Carbonic Anhydrase Activators: Amino Acyl/Dipeptidyl Histamine Derivatives Bind with High Affinity to Isozymes I, II and IV and Act as Efficient Activators. Bioorg. Med. Chem., 7, 2915-2923.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2007. Carbonic Anhydrases as Targets for Medicinal Chemistry, Bioorgan. Med. Chem., 15, 4336-4350.
- Supuran, C. T., 2011. Bacterial Carbonic Anhydrases as Drug Targets: Toward Novel Antibiotics?, Front Pharmacol., 2, 34.
- Supuran, C. T., 2012. Structure-Based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase Inhibitors. J Enzyme Inhib Med Chem, 27, 759-772.
- Supuran, C. T., 2016. How Many Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanisms Exist?, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 31, 345-360.
- Supuran, C. T., 2016. Structure and Function of Carbonic Anhydrases, Biochem. J., 473, 2023-2032.
- Supuran, C. T., Casini, A. ve Scozzafava, A., 2004. Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators. Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 67.
- Supuran, C. T. ve Scozzafava, A., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Therapeutic Potential, Exp. Opin. Ther. Patents, 10, 575-600.
- Supuran, C. T. ve Scozzafava, A., 2002. Applications of Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators in Therapy, Exp. Opin. Ther. Patents, 12, 217-242.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Swartz, M., 2010. Hplc Detectors: A Brief Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33, 9-12, 1130-1150.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Supuran, C. T., 2011. In vitro Inhibition of Human Carbonic Anhydrase I and II Isozymes with Natural Phenolic Compounds, Chem. Biol. Drug Des., 7, 494-499.

- Şentürk, M., Gülçin, i., Daştan, A., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Supuran, C. T., 2009. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Human Erythrocyte Isozymes I and II with a Series of Antioxidant Phenols. Bioorg. Med. Chem., 17, 3207-3211.
- Tarantilis, P.A., Tsoupras, G. ve Polissiou, M., 1995. Determination of Saffron (*Crocus sativus* L.) Components in Crude Plant Extract Using High-Performance Liquid Chromatography-UV-Visible Photodiode-Array Detection-Mass Spectrometry, Journal of Chromatography A, 699, 107-118.
- Tars, K., Vullo, D., Kazaks, A., et al., 2013. Sulfocoumarins (1,2- benzoxathiine-2,2-dioxides): a Class of Potent and Isoform-Selective Inhibitors of Tumor-Associated Carbonic Anhydrases, J. Med. Chem., 56, 293-300.
- Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., et al. 2010. The Coumarin Binding Site in Carbonic Anhydrase Accommodates Structurally Diverse Inhibitors: The Antiepileptic Lacosamide as an Example and Lead Molecule for Novel Classes of Carbonic Anhydrase Inhibitors. J. Med. Chem., 53, 850-854.
- Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. ve Supuran, C. T., 2006a. Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isozymes I, II, IV, VA, VII and XIV with L- and D-Histidine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isoform II: Engineering Proton Transfer Processes within The Active Site of An Enzyme, Chemistry, 12, 7057-7066 .
- Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. ve Supuran, C. T., 2006b. Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isoforms I, II, IV, VA, VII and XIV with L- and D-Phenylalanine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isozyme II: Sterospecific Recognition within the Active Site of an Enzyme and Its Consequences for the Drug Design., J. Med. Chem., 49, 3019-3027.
- Tomas-Barberan, F. A. ve Clifford, M. N., 2000. Dietary Hydroxybenzoic acid Derivatives and Their Possible Role in Health Protection, J. Sci. Food Agric., 80, 1024-1032.
- Tomas-Barberan, F.A. ve Clifford, M.N., 2000. Flavanones, Chalcones and Dihydrochalcones-Nature, Occurence and Dietary Burden, J. Sci. Food Agric., 80, 1073-1080.
- Touisni, N., Maresca, A., McDonald, P. C., et al. 2011. Glycosyl Coumarin Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors Strongly Attenuate the Growth of Primary Breast Tumors, J. Med. Chem., 54, 8271-8277.
- Trathnigg, B., Fradyl, S. ve Veronik, M., 2004. Thermodynamic Study of Retention in Liquid Exclusion- Adsorption Chromatography, J. Chrom. A, 1038, 43-52.
- Tripp, B. C., Smith, K. ve Ferry, J. G., 2001. Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme, J. Biol. Chem. 276, 48615- 48618.

- Tuncer, M., 2008. Protein Saflaştırma 1: Kromatografik Teknikler. Mersin Üniversitesi Yayınları. Yayın No:19.
- Van Elswijk, D.A., Diefenbach, O., van der Berg, S., Irth, H., Tjaden, U.R., van der Greef, J., 2003. Rapid Detection And Identification Of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors By On-Line Liquid Chromatography-Biochemical Detection, Coupled To Electrospray Mass Spectrometry. J. Chromatogr. A, 1020, 45-58.
- Veitch, F. P. and Blankenship, L.C., 1963. Carbonic Anhydrase Activity in Bacteria, Nature, 197, 76-77.
- Verpoorte, J.A., Mehta S. ve Edsall J.T, 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Vullo, D., Del Prete, S., Osman, S. M., vd., 2014. Sulfonamide Inhibition Studies of the δ -Carbonic Anhydrase from the Diatom *Thalassiosira weissflogii*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 24, 275-279.
- Wilbur, K.M. and Anderson, N.G., 1948. Electrometric and Colorimetric Determination Of Carbonic Anhydrase, J. Biol. Chem., 176, 147-154.
- Wilson, I.D. ve Brinkman, U. A. T., 2007. Hype and Hypernation: Multiple Hyphenation of Column Liquid Chromatography and Spectroscopy, Trends in Analytical Chemistry, 26, 847-854.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., vd., 2008. Structure and Metal Exchange in the Cadmium Carbonic Anhydrase of Marine Diatoms, Nature, 452, 56-61.
- Yılmaz, M., 2011. Safran (*Crocus sativus*), Nar Çiçeği (*Punica granatum*), Havaciva otu (*Alkana tinctoria*) ve Zerdeçal (*Curcuma longa*)'ın, Protein Poliakrilamid Elektroforez Jellerinin Boyanmasında Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Zimmerman, S. A., Tomb, J. F. ve Ferry, J. G., 2010. Characterization of CamH from *Methanosarcina thermophila*, Founding Member of a Subclass of the γ - Class of Carbonic Anhydrases, J. Bacteriol., 192, 1353-1360.

7. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Raporu

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL
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

Ek 1'in devamı

**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 <input checked="" type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI		
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
OLGU RAPOR FORMU				Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			


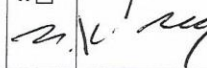

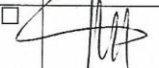
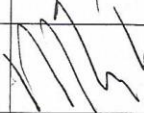

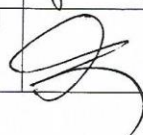
Ek 1'in devamı

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

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

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 <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLİ
Doç.Dr. Evrim Ö. KARAGÜZEL Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Karabük'te doğdu. İlkokul ve ortaokulu Şehit Mehmet Dinçel İlköğretim Okulu'nda, liseyi Cumhuriyet Süper Lisesi'nde tamamlayarak 2003 yılında bu liseden mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi. 2010 yılında bu bölümden mezun oldu. 2011 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda bütünleşik doktora programına başladı. Yabancı dili İngilizce'dir. Evlidir.

