

T.C
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**SİPROFİBRATIN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ II VE GLUKOZ 6-
FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİLER US

TEMMUZ - 2009
TRABZON

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak yaptığım bu çalışmada, değerli katkılarından dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA başta olmak üzere bilgilerinden yararlandığım saygı değer hocalarım Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Ekin ÖNDER, Doç. Dr. S. Caner KARAHAN, Doç. Dr. Yüksel Ali YAZICIOĞLU, Doç. Dr. Birgül Vanızör KURAL ve özellikle, çalışmalarında her an yanımda olan sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Muharrem TOPAL başta olmak üzere, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Biyokimya Anabilim Dalındaki bütün arkadaşlarıma, ayrıca beni bu günlere getiren benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme, varlığını her an yanımda hissettiğim merhum babama ve sözlüme teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz, 2009

Diler US

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Siprofibrat (Ciprofibrate)	3
2.1.1. Fibratların Etki Mekanizması	3
2.1.2. Fibratların Yan Etkileri	4
2.1.3. PPAR	4
2.1.3.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	4
2.2. Eritrositler	5
2.2.1. Eritrosit Metabolizması	6
2.3. Karbonik Anhidraz (CA)	6
2.3.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	6
2.3.2. Karbonik Anhidraz II (CA II)	8
2.3.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları	9
2.3.4. Karbonik Anhidraz Esteraz ve Hidrataz Mekanizmaları	10
2.3.4.1. Karbonik Anhidraz Esteraz Mekanizması	10
2.3.4.2. Karbonik Anhidraz Hidrataz Mekanizması	11
2.3.5. Karbonik Anhidraz Aktivatör ve İnhibitörleri	12
2.3.5.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	12
2.3.5.2. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri	13

2.4. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz	15
2.4.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	15
2.4.2. G6-PD Aktivatör ve İnhibitörleri	17
3. MATERYAL ve METOD	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	20
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	21
3.2. Metodlar	22
3.2.1. CA (Karbonik Anhidraz) Aktivite Tayini	22
3.2.1.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini	22
3.2.1.2. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini	24
3.2.2. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Tayini	26
3.2.2.1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Siprofibratın İn Vitro Etkisinin İncelenmesi	27
4. BULGULAR	
4.1. Siprofibrat'ın CA II Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	29
4.1.1. CA II Hidrataz Aktivitesi Sonuçları	29
4.1.2. CA II Esteraz Aktivitesi Sonuçları	30
4.2. Siprofibrat'ın G6-PD Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	37
6.1. Sonuçlar	37
6.2. Öneriler	37

ÖZET	38
SUMMARY	40
KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	VIII

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa No
Tablo 1.	Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi	8
Tablo 2.	α -CA izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri, sülfonamidlere olan ilgileri ve hücre içi yerleşimleri	14
Tablo 3.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	19
Tablo 4.	Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları	20
Tablo 5.	Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	21
Tablo 6.	Eritrosit CA II Esteraz Aktivite Ölçüm Küvet İçeriği	25
Tablo 7.	Eritrosit CA II Enziminin Esteraz Aktivitesi Tayini İçin Kullanılan Çözelti Miktarları ve Bunlara Karşılık Gelen Siprofibrat Konsantrasyonları	25
Tablo 8.	Eritrosit G6-PD Enziminin Aktivite Ölçüm Küvet İçeriği	26
Tablo 9.	Eritrosit G6-PD Enziminin Aktivite Tayini İçin Siprofibrat İlacı ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Çözelti Miktarları ve Bunlara Karşılık Gelen Siprofibrat Konsantrasyonları	28
Tablo 10.	Siprofibrat'ın CA II hidrataz aktivitesi üzerine etki dereceleri	30

Tablo 11.	Siprofibrat'ın CA II esteraz aktivitesi üzerine etki dereceleri	31
Tablo 12.	Siprofibrat'ın G6-PD aktivitesi üzerine etki dereceleri	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Karbonik Anhidraz II'nin Katalizlediği Esteraz Mekanizması	10
Şekil 2.	Karbonik Anhidrazın Katalizlediği CO ₂ - Hidrasyon Reaksiyonunun Mekanizması	11
Şekil 3.	Aktif Bölgeden Protonun Bir Taşıyıcı Birim (His- 64) Aracılığı ile Uzaklaştırmaya Mekanizması	12
Şekil 4.	Sülfonamid ve anyonik inhibitörlerin karbonik anhidraz inhibisyon mekanizması	13
Şekil 5	Pentoz Fosfat Metabolik Yolu	15
Şekil 6.	Siprofibrat'ın CA II hidrataz aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili sonuçlar	29
Şekil 7.	Siprofibrat'ın CA II esteraz aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili sonuçlar	30
Şekil 8.	Siprofibrat'ın G6-PD aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili sonuçlar	32

KISALTMALAR

CA	: Karbonik Anhidraz
CARP	: Karbonik Anhidraz Benzeri Protein
G6-PD	: Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz
PPAR	: Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptörler
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
PPAR α	: Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptör alfa
PPAR γ	: Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptör gama
PPAR δ	: Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptör delta
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
kDa	: Kilo Dalton
TG	: Triglicerid
GSH	: Redükte Glutasyon
ET-1	: Endotelin-1
NF-kB	: Nüklear Faktör Kappa B
VSMC	: Vasküler Düz Kas Hücresi
KAI	: Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
PAI-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitör -1

TRIS : Trishidroksimetil Amino Metan

O.D : Optik Dansite

NADP⁺ : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Siprofibrat, fibrat grubu bir ilaçtır. Fibratlar amfipatik karboksilik asit sınıfı, geniş spektrumlu lipid düşürücü ilaçlar olup hiperlipidemi başta olmak üzere çeşitli metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılırlar. Plazma trigliserid ve LDL kolesterol düzeyini azaltırken, HDL kolesterol düzeyini artırırılar. Fibratların sürekli kullanımı karın ağrısı, baş ağrısı, baş dönmesi, miyopati (kreatin kinaz yükselmesi nedeniyle kas ağrısı), saç dökülmesi ve az da olsa anemiye sebep olmaktadır.

Fibratların lipid düşürücü etkilerine PPAR α aracılık eder. Fibratların bağlanmasıyla aktif duruma geçen bu reseptörler lipid metabolizmasında rol alan enzimlerin ekspresyonlarını düzenleyerek hipolipidemik etkiye yol açarlar (1). PPAR α (alfa); karaciğer, böbrek, kalp, çizgili kas ve yağ dokusunda bulunan peroksizom proliferatörleri ile aktiveleştirilen reseptörler (PPAR) süper ailesine ait hücre içi transkripsiyon faktörüdür. PPAR'ler fizyolojik ya da farmakolojik ligandlarla aktivasyonları sonucu özel DNA dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler. PPAR'nin üç tipi bilinmektedir. Bunlar PPAR α , PPAR γ ve PPAR δ (veya β)'dır (2).

Bu çalışmada, insan eritrositlerinin iki önemli enzimi karbonik anhidraz II ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktiviteleri üzerine siprofibratın etkisi araştırılmıştır. Karbonik anhidraz (CA, E.C 4.2.1.1, karbonat hidroliyaz) aktif bölgesinde Zn⁺² iyonu ihtiva eden bir metaloprotein olup, mikroorganizmalardan yüksek yapılı hayvanlara kadar geniş dağılımı olan bir enzimdir. Bugüne kadar omurgalıların

farklı organ ve dokularında 16 izoenzimi belirlenmiştir (CA I,CA XVI). Temel olarak CO₂ 'nin katalitik hidrasyonu ve HCO₃⁻ nin dehidrasyonundan sorumludur. Bu yolla metabolik bir artık olan CO₂ 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerçekleştirilirken asit-baz dengesi de sağlanmış olur. CA II, maksimum CO₂ hidrasyonu turnover sayısına sahip olan (1.10^{-6} s^{-1}), en geniş dağılımlı, hemen hemen her doku ve organdaki bazı hücre tiplerinin sitozolünde yer alan bir izoenzimdir. Karbonik anhidraz enziminin membranlarda iyon transportu, beyin omurilik sıvısının sentez ve reabsorpsiyonu, gastrik mukoza hücrelerinden HCl salgılanması, aköz hümör (göz sıvısı) salgılanması, sindirim gibi fizyolojik olaylarda da fonksiyonları vardır (3,4). Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi ise (G6-PD) (D-glukoz-6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir. G6-PD bir sitoplazma enzimi olup, bitkilerde peroksizom ve kloroplastlarda izoformları bulunmaktadır. Pentoz fosfat yolunun RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve biyosentez reaksiyonlarında indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki fonksiyonu vardır (5,6).

Hiperlipidemi tedavisinde kullanılan fibratların peroksizom proliferatörleri ile aktive edilen reseptör alfa'nın ligandları olduğu ve sürekli alımı sonucu muhtelif yan etkiler oluşturduğu yukarıda ifade edilmişti. Eritrositlerin fonksiyonunun vücut için vazgeçilmez önemde olduğu aşikardır. Bundan dolayı, bu hücrelerin oksijen taşıma özelliklerinin, membran bütünlüğünün ve kanın asit-baz dengesine katkılarının devam etmesi gerekir. Karbonik anhidraz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri eritrositlerin bu özellikleri ile ilgili başta gelen iki enzimdir. Fibratların doğrudan enzim aktiviteleri üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır ve literatürde bu iki enzimle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada PPAR α (alfa) ligandı olan siprofibratın, insan eritrosit karbonik anhidraz II ve G6-PD enzimlerinin aktivitelerine in vitro etkilerinin incelemesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Siprofibrat (Ciprofibrate)

Siprofibrat, fibrat grubu bir ilaçtır. Fibratlar, amfipatik karboksilik asit gruplu ilaçlar sınıfındandır. Hiperlipidemi başta olmak üzere çeşitli metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu lipid düşürücü ilaçlardır. Plazma trigliserid ve LDL kolesterol düzeyini azaltırken, HDL kolesterol düzeyini artırır. Yüksek yoğunluklu lipoprotein ana unsurları olan apolipoprotein A1 ve A2 ekspresyonu ile lipoprotein lipaz ekspresyonunu artırır; apoC III, fibrinojen ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ekspresyonlarını ise azaltır. Fibrat etkisiyle lipoliz artar, karaciğerde trigliserit yapımı azalır, HDL yapımı artar. En önemli etkilerinden biri de dolaşımdaki LDL miktarını azaltmalarıdır (7,8).

Antiinflatuvar ve antitrombotik özelliklerinin yanı sıra fibratların "pleotropic" etkileri de vardır (9). Gemfibrozil hariç diğer fibratlar plazma fibrinojen düzeyini azaltır. Gemfibrozil trombosit agregasyonunu artırdığı için protrombotik etkiye sahiptir ve bu nedenle aspirinle birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir. Gemfibrozilin koagülasyon üzerine olumlu etkisi de vardır, plazminojen aktivatör inhibitör-1 düzeyini düşürerek fibrinolizise yardım eder.

2.1.1. Fibratların Etki Mekanizması

Fibratlar, etkilerini lipoprotein metabolizmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunda değişiklikler yaparak gösterirler. Bu etkide " Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptörler " (PPAR) olarak isimlendirilen nükleer hormon reseptörleri aracılık eder. PPAR'ler çevreden aldıkları sinyalleri genoma taşıyan transkripsiyon faktörleridir. Nükleer reseptörler DNA'yı tanır ve DNA'da

"response element" (RE) olarak isimlendirilen spesifik yerlere bağlanır. Fibrat etkisiyle aktive olan PPAR'ler diğer bir nükleer reseptörle (retinoik asit -x- reseptör) heterojen bir şekilde birleşerek "peroksizom proliferatör response element" olarak adlandırılan spesifik RE'ye bağlanır ve hedef genin transkripsiyon hızını değiştirir. Fibratların lipoproteinler üzerine etkisi PPAR α aracılığıyla (2).

2.1.2. Fibratların Yan Etkileri

Çoğu fibratlar hafif mide bozukluğu, karın ağrısı, baş ağrısı, baş dönmesi, miyopati (kreatin kinaz yükselmesi nedeniyle kas ağrısı), saç dökülmesi ve az da olsa anemiye sebep olmaktadır. Statin sınıfı ilaçlarla beraber kullanılıncaya fibratlar rabdomyelit (kas dokusunun hasar görmesi sonucu oluşan böbrek yetmezliği) riskini artırır. Kuvvetli bir statin ilacı olan cervastatin (Lipobay) bu komplikasyon nedeniyle piyasadan çekilmiştir. Daha az lipofilik olan statinlerin böyle bir reaksiyona yol açma olasılığı daha düşüktür ve fibratlarla kullanılmaya daha müsaittirler.

2.1.3.PPAR(Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptörler)

2.1.3.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

PPAR (Peroksizom Proliferatörleri ile Aktifleştirilen Reseptörler) nükleer hormon reseptör süper ailesine ait hücre içi transkripsiyon faktörleridir. Fizyolojik ya da farmakolojik ligandlarla aktivasyonları sonucu özel DNA dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenlerler. PPAR'nin üç tipi bilinmektedir. Bunlar PPAR α , PPAR γ ve PPAR δ (veya β)'dir. PPAR α (alfa); karaciğer, böbrek, kalp, çizgili kas ve yağ dokusunda, PPAR δ (veya β) birçok dokuda bulunmakla birlikte belirgin olarak beyin, yağ dokusu ve deride, PPAR γ ise yağ dokusu, kalp, böbrek, pankreas, kolon ve bağırsakta bulunmaktadır. Fibratlar özellikle bezafibrat, gemfibrozil, siprofibrat ve fenofibratlar peroksizom proliferatörleri ile aktifleştirilen reseptör alfa'nın ligandlarıdır ve PPAR α (alfa)'yı aktive ederler (1).

PPAR α (alfa) aktivasyonu ile;

1. İnsan monositlerinde doku faktör salınımı ve aktivitesinin inhibisyonu,
2. Yağ asidi β oksidasyon enzim genlerinin transkripsiyonel regülasyonu,
3. VSMC Aktivasyonunun inhibisyonu,
4. İnflamatuar sitokin üretiminin azaltılması,
5. Vasküler duvarda inflamasyon inhibisyonu,
6. Yağ asidi katabolizmasının uyarılması,
7. HDL-K artışı,
8. Trombin ile indüklenen ET-1 biyosentezinin inhibisyonu,
9. Akut faz proteinlerinin sentezinin baskılanması,
10. Glukoz homeostazı,
11. NF-kB transkripsiyonunun inhibisyonu sağlanır.

2.2. Eritrositler

Eritrositler, sulu ortamda hareket halinde özelleşmiş hücrelerden oluşan kan dokusunda bulunurlar ve ilk olarak 1665 yılında Malphigi tarafından tanımlanmışlardır. 1673 yılında Leeuwenhock, kana kırmızı rengini eritrositlerin verdiğini tesbit etmiştir. İnsan eritrositleri çekirdeksiz, bikonkav disk şeklindedir ve yapısında % 34 hemoglobin ve Fe^{+2} molekülü bulunmaktadır. En önemli görevleri yapılarında bulunan hemoglobin ile dokulara O_2 'yi taşımaktır. Bu görevlerinin yanısıra vücut için tampon görevi de üstlenmektedir (10).

2.2.1. Eritrosit Metabolizması

Eritrositlerde hemoglobin yapısındaki Fe^{+2} şeklinin korunması, düşük $[\text{Na}^+]$ ve yüksek $[\text{K}^+]$ ile düşük $[\text{Ca}^{+2}]$ düzeyinin sürdürülmesi, hemoglobin ve diğer

proteinlerdeki tiyol gruplarının oksidasyonunun önlenmesi, eritrosit membran ve iskeletin bütünlüğünün korunması için enerji ve antioksidan güç gerekmektedir. Eritrositlerde nükleus, mitokondri, ribozom, lizozom, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi organeller bulunmadığından protein ve nükleik asit sentezi yapılamaz, yağlar yakıt olarak kullanılamaz. Eritrositler varlıklarını korumak ve sürdürmek için gerekli enerjiyi glukozdan sağlarlar. Glukozdan anaerobik glikoliz yoluyla eritrositlerin enerji ihtiyacı karşılanır; pentoz fosfat yoluyla da antoksidan güç olarak NADPH üretilip taşıdığı oksijenden gelen oksidatif ortamın etkisini bertaraf eder. Eritrositlerde en bol bulunan enzimler karbonik anhidraz, katalaz, peptidaz, kolinesteraz, anaerobik glikoliz yolu ve pentoz fosfat yolu enzimleridir (11).

Eritrositlerde karbonik anhidraz enziminin CA I ve CA II izoenzimleri bulunur ve toplam miktarları hemoglobinin yaklaşık % 1'i kadardır. Bu enzimin başta gelen fizyolojik fonksiyonu dokularda oluşan CO₂'in ihtiyaç duyulan hızda uzaklaştırılmasını sağlarken, asit-baz dengesine de katkı vermektir. G6-PD enzimi ise eritrositlerdeki pentoz fosfat yolunun ilk ve kontrol enzimidir. Bu yol ile RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH sentezlenmektedir. Tabii ki eritrositlerde riboz-5-fosfat kullanılmayıp, oksidatif olmayan pentoz fosfat yolu reaksiyonlarıyla glikoliz yolu ara bileşiklerine dönüştürülür. Glukoz 6- fosfat dehidrogenaz klinik yönden de çok önemli bir enzimdir. Eksikliğinde eritrositlerin hemoliz olduğu bir genetik anemi hastalığı görülür (6).

2.3. Karbonik Anhidraz

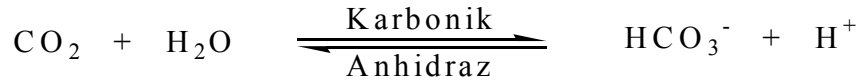
2.3.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (CA, E.C,4.2.1.1, karbonat hidroliyaz) mikroorganizmalardan bitkilere, böceklerden hayvanlara kadar çok geniş dağılımı olan bir enzimdir. Yaklaşık 260 amino asitten oluşur ve 30 kDa ağırlığındadır. Aktif bölgesinde Zn⁺² iyonu ihtiva eden monomerik bir protein olup, organizmada çok önemli rollere sahiptir. Canlılarda 5 farklı bilinen yapısal CA ailesi vardır. Bunlar; α -CA (omurgalılar, bakteriler, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında),

β -CA (çoğunlukla bakteriler, algler, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında), γ -CA (temel olarak archealarda ve bazı bakterilerde), δ -CA (bazı deniz diatomlarında) ve yakın zamanda bulunan ϵ türleridir.

Bunlardan en fazla bilineni alfa ailesidir (12). Memelilerde bulunan alfa tipi CA'ların doku dağılımı, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri farklı on altı ayrı (CA I-XVI) izoenzimi tarif edilmiştir. Bunlardan CA I, II, III, VII ve XIII sitoplazmada, IV, IX, XII, XIV ve XV'ler membran bağımlı, V mitokondride, VI tükürük salgısında, diğerleri 3 CA ilişkili proteinler olan (CARP), VIII, X ve XI'de sitozolde yer alır. Üzerinde en çok çalışma yapılan izoenzimlerden biri karbonik anhidraz II (CA II)'dir. CA II, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, eritrositlerde, mide mukozasında, beyin v.s gibi birçok doku veya organın sitozolünde lokalizedir. CA ilk kez 1933 yılında memeli eritrositlerinden saflaştırılmıştır.

CA'nın temel fizyolojik fonksiyonu CO_2 'nin hidrasyonu veya bikarbonatın dehidrasyon reaksiyonlarını dönüşümlü olarak katalizlemesidir (12).



Bu reaksiyonla beraber; CO_2 taşınması, bikarbonatın dokular ve akciğerler arasında metabolize olmasında, pH homeostazisinde, doku ve organlardaki elektrolit sekresyonu, birçok biyosentez reaksiyonunda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, idrar asidifikasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması ve daha birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol almaktadır (13,14). Karbonik anhidraz karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehytlerin ve pirüvatın hidrolizini de katalizlemektedir. Ancak, bugüne kadar bunların fizyolojik önemi üzerinde durulmamıştır (15).

2.3.2. Karbonik Anhidraz II

CA II, alfa sınıfı CA ailesinin maksimum CO₂ hidrasyonu turnover sayısına sahip, katalitik aktivitesi en yüksek olan üyesidir. Katalitik etkisi, aktif bölgesindeki çinko iyonlarının 3 histidin rezüdüleriyle koordinasyonu ile gerçekleşir (16). Kataliz sırasında çinko iyonları nükleofilik lewis asidi gibi görev yaparlar.

CA II, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, eritrositlerde, mide mukozasında, beyinde, karaciğerde, pankreatik kanal ve endotel hücrelerinde, trombositlerde ve spermatozoada bulunur. CA II, ayrıca safra kesesinin epitel hücrelerinde eksprese edilmektedir. Bazı hücrelerde CA II asit-baz dengesi için temel rol oynar. Üriner asidifikasyon için H⁺ salgılayan renal tubuler ve H⁺ salgılayan gastrik parietal hücrelerinde etkindir. CA II, pankreas sıvısı için pankreatik kanal hücrelerine HCO₃⁻ temin eder. Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glakomda CA II enziminin önemli rolü vardır. Glakom anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Dünyada on milyonu aşkın kişinin yüksek göz içi basıncına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında büyük rol oynamaktadır (17). Aköz humorun salgılanmasında da CA II enziminin uyarıcı etkisi vardır. CA II aynı zamanda böbrekte, eritrositlerde ve karaciğerde proksimal tübüllerde CO₂ değişimine katkıda bulunur (18).

Tablo 1. Memeli karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin doku dağılımı ve bu dokulardaki işlevi (14).

Doku dağılımı	İşlevsel rolleri
❖ Kemik osteoklast hücreleri	❖ Kemik resorpsiyonu
❖ Göz	❖ Aköz hümörün üretimi
❖ Testis	❖ Sperm hareketliliği
❖ Böbrek	❖ İdrar asidifikasyonu
❖ Beyin	❖ BOS salgısı
❖ Akciğer	❖ Gaz değişimi
❖ Eritrositler	❖ Gaz değişimi
❖ Gastrointestinal epitel	❖ H ⁺ salgısı, HCO ₃ ⁻ salgısı

2.3.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları

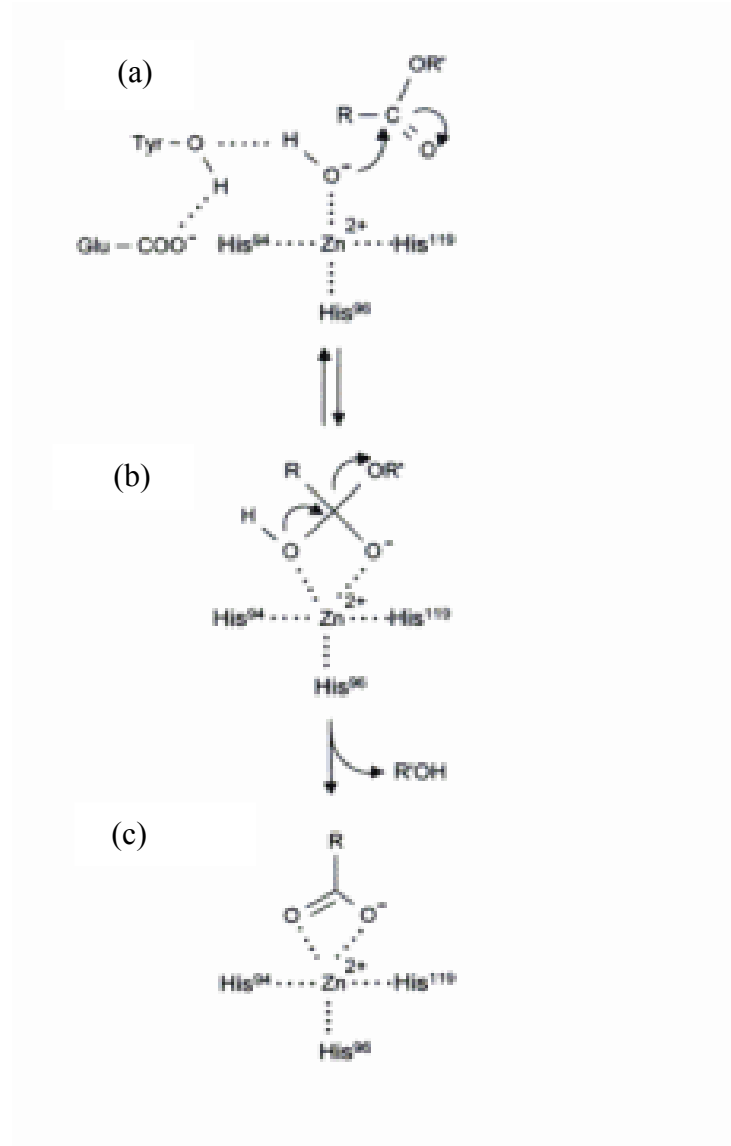
Karbonik anhidraz aktivitesi, enzimin CO_2 hidratasyonu, HCO_3^- 'in dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenebilir. Katalizlediği reaksiyona bakıldığında, ortama göre CO_2 gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H^+ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO_2 gazı, kantitatif olarak monomerik yolla tespit edilebilir ancak monomerik metodun, reaksiyon pH'sının değişken olması, CO_2 'nin suda sınırlı çözülmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır (19). İkinci olarak, H^+ konsantrasyonu, pH'nın düşmesi veya yükselmesi gibi geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi avantajının yanı sıra reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO_2 'nin suda sınırlı çözülmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır (20, 21). Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metodlar aktivite tayininde kullanılmaktadır.

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde, CO_2 hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşüşü için geçen süre, bromtimol mavisi indikatörü kullanılarak bulunmakta ve enzim birimi, enzimsiz CO_2 hidratasyonu süresi(t_0) ile enzimli reaksiyon süresi(t_c) arasındaki farkın t_c 'ye bölünmesi ile belirlenmektedir (22).

Karbonik anhidrazın ester hidrolizleyici özelliğinden faydalanılarak da aktivitesi belirlenebilir. Kullanılan esterin birim zamanda hidrolizlenen miktarı spektrofotometrik olarak takip edilir ve enzimin aktivitesi bulunur. Bu amaçla en çok kullanılan ester p-nitrofenil asetatıdır. p-nitrofenil asetatın hidrolizi ile oluşan p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun 348 nm'de verdiği absorbansın ölçümüyle aktivite tayin edilmektedir (23, 24).

2.3.4. Karbonik Anhidraz Esteraz ve Hidrataz Mekanizmaları

2.3.4.1. Karbonik Anhidraz Esteraz Mekanizması

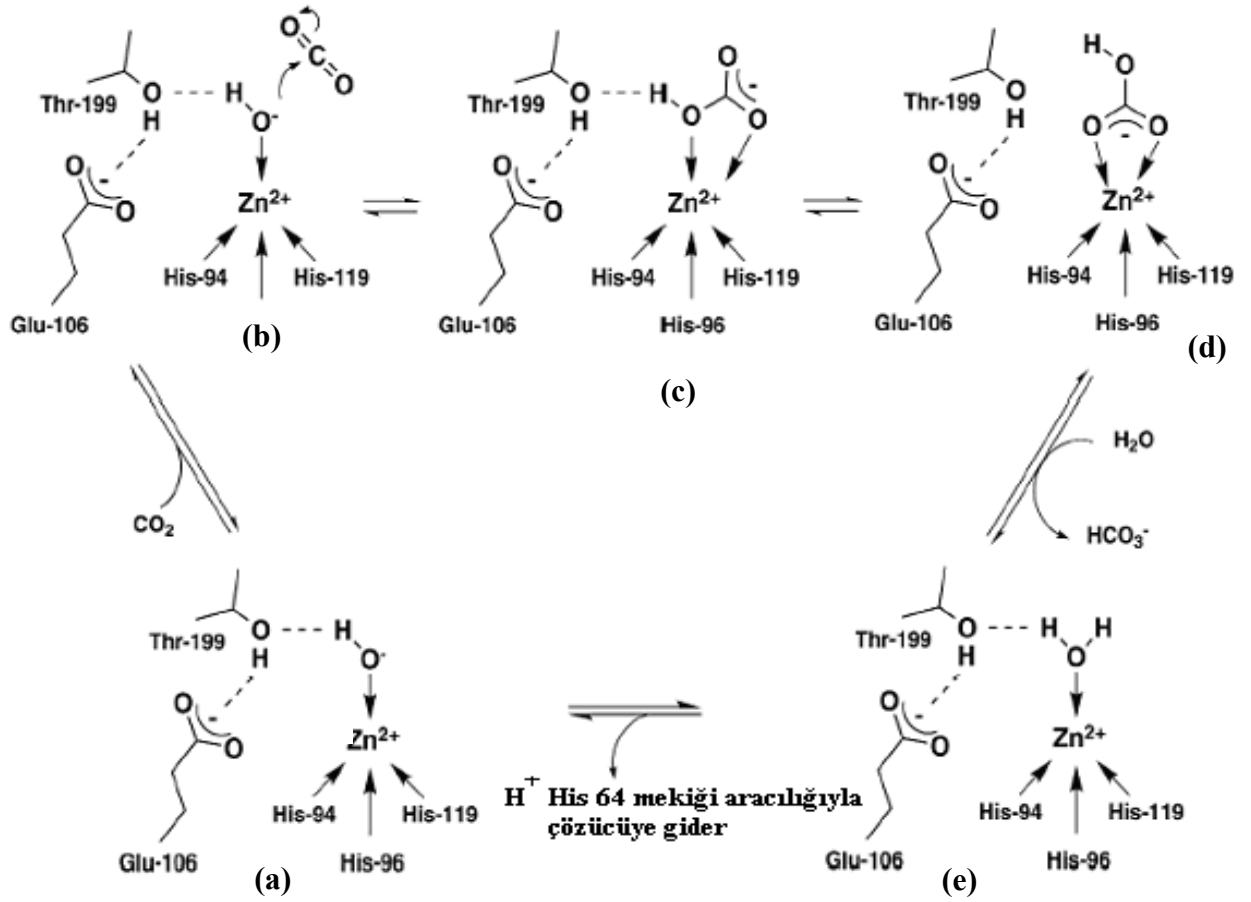


Şekil 1. Karbonik Anhidraz II'nin Katalizlediği Esteraz Mekanizması

Birinci basamakta Zn^{+2} iyonuna bağlı ($-\text{OH}$) grubundaki bağ yapmayan elektron çiftinin, $\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{OR}(\text{ester})$ molekülüne nükleofilik atak yaparak, karbon-oksijen bağı oluşturması esnasında (b) II-bağı açılmaktadır (c). Daha sonraki basamakta, negatif yüklü oksijen atomunun proton abstraktı ile $\text{R}-\text{OH}$ ayrılmaktadır (25).

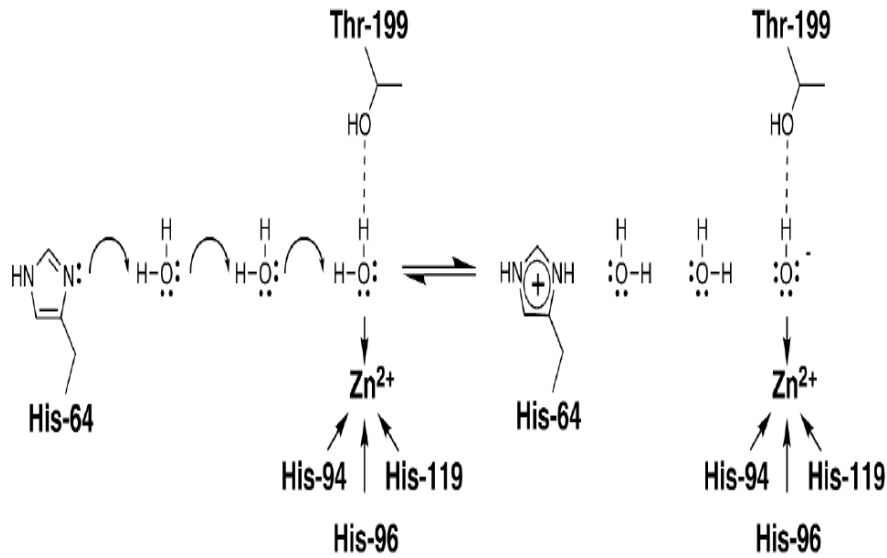
2.3.4.2. Karbonik Anhidraz CO₂ Hidrataz Mekanizması

Karbonik anhidrazın katalizlediği CO₂ – Hidrataz mekanizması basitçe şekil 2’de verilmiştir. Birinci basamakta Zn⁺² iyonuna bağlı (–OH) grubundaki bağ yapmayan elektron çiftinin, CO₂ molekülüne nükleofilik atak yaparak, karbon-oksijen bağı oluşturmada (b) II-bağı açılmaktadır (c). Daha sonraki basamakta, negatif yüklü oksijen atomunun proton abstraktı(d) ve su girişi ile HCO₃⁻ iyonu ayrılmaktadır. Son olarak (e) nolu bileşik bir H⁺ iyonu kaybederek yeniden 1 nolu bileşiğe dönüşmektedir.



Şekil 2. Karbonik anhidraz II’nin katalizlediği CO₂-hidrasyon reaksiyonunun mekanizması (12).

Bu enzimatik mekanizmada hız belirleyici basamak protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması safhasıdır. Bu nedenle aktif bölgedeki proton taşıma kapasitesine sahip aminoasit birimleri aktivitede önemlidirler (Şekil 3).

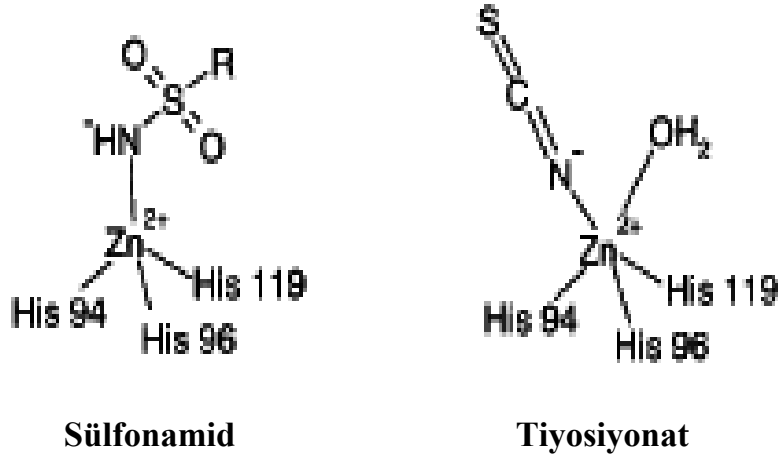


Şekil 3. Aktif bölgeden protonun bir taşıyıcı birim (his-64) aracılığıyla uzaklaştırılması. Çinkonun üç bölgesine bağlı ve dördüncü bölgenin yakınında olan ligandlar olan amino asit birimleri gösterilmektedir (12).

2.3.5. Karbonik Anhidraz İnhibitör ve Aktivatörleri

2.3.5.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz, aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna bağlanan birçok iyon ve molekül tarafından inhibe edilmektedir. Sülfonamid türevleri (asetazolamid, klorozamid, dorzalamid, brinzolamid) CA'nın spesifik ve güçlü inhibitörleridir. Halojenürler, CN^- , SCN^- gibi mononegatif çözücüler ise daha gevşek bağlanarak zayıf bir inhibisyon oluşmasını sağlarlar. Bu inhibitörlere en dayanıklı izoenzim CA-III'dür (26).



Şekil 4. Sülfonamid ve anyonik inhibitörlerin karbonik anhidraz inhibisyon mekanizması (26).

Karbonik anhidraz inhibitörleri(KAİ) göz içi basıncını düşürmek için kullanılan en güçlü ajanlardandır. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin iki formu vardır. Asetozolamid, bu inhibitörlerin sistemik formu olup 1954'ten beri kullanılmaktadır. Asetazolamid merkezi sinir sistemindeki bazı fonksiyon bozukluklarının (epilepsi gibi) tedavisinde yardımcı olarak işlev görür. İlk topikal KAİ olan dorzolamidin kullanıma girmesi, glokom tedavisinde önemli bir gelişmedir. Dorzolamid günümüzde kullanılan topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinden olup, kornea geçirgenliği yüksek, selektif karbonik anhidraz-II izoenzim inhibitörüdür. Bu yönüyle sistemik yan etkileri yüksek olan asetozolamide alternatif olarak kullanılmaktadır. İkinci topikal KAİ olan brinzolamid 1998'den beri oftalmolojide kullanılmaktadır. Dorzolamid ve brinzolamid gibi topikal KAİ'lerinin başlıca avantajı oral ajanlara bağlı gelişen sistemik yan etkilerde belirgin azalmadır. Bununla birlikte bazı hastalarda ciddi yan etkilerde görülebilir (26)

2.3.5.2. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri

Karbonik anhidrazlar, aminler ve bazı aminoasitler tarafından aktive edilirler. Bugüne kadar 16 memeli izoenziminin bu moleküllerle ilişkisi

incelenmiştir. CA aktivatörleri, Alzheimer hastalığının tedavisi ve hafızanın gelişiminde güçlü bir ajan olarak kullanılmaktadır. CA aktivasyon mekanizması ilk olarak histaminle birlikte CA II izoenziminin X-ışını kristal yapısının rapor edilmesi ile anlaşılmıştır. Bunu takiben kinetik ve X-ışını kristallografik çalışmaları, aktivatörlerin aktif bölge girişine inhibitör ve substratlardan farklı bölgeye bağlandığını göstermektedir.

En iyi bilinen karbonik anhidraz aktivatörleri L-Histidin, D-Histidin, L-Triptofan, D-Triptofan, L-Fenilalanin, D-Fenilalanin amino asitlerinin yanı sıra histamin, dopamin, serotonin gibi aminler tarafından da aktive edilirler (27,28).

Tablo 2. α -CA izoenzimleri, hidrataz aktivitesi, sülfonamid inhibitörleri için afinite ve hücre içi yerleşimleri (14).

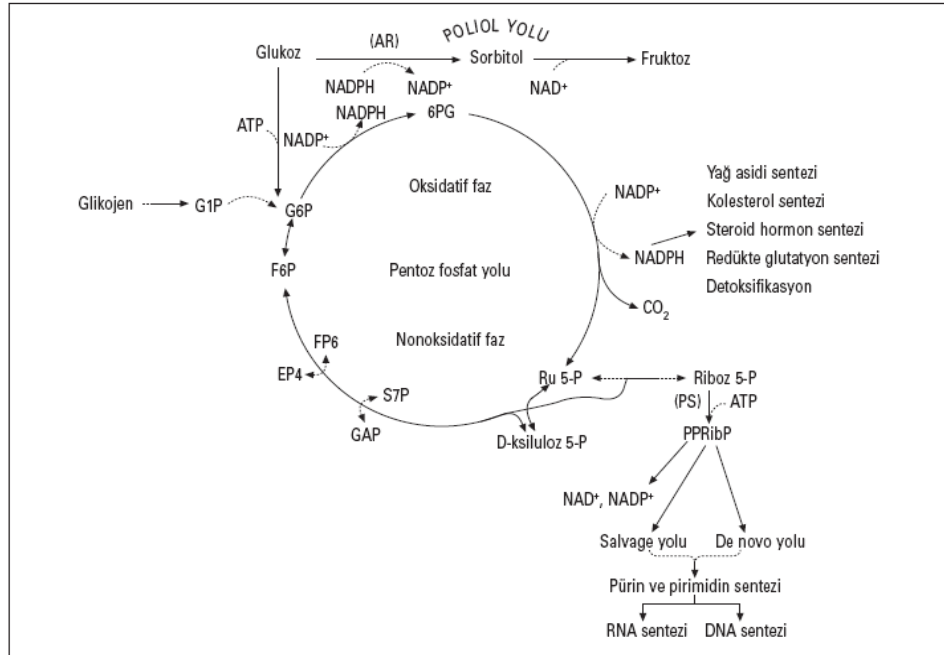
İzoenzim	Katalitik aktivite (CO₂ hidrataz)	Sülfonamidler için afinite	Hücre içi yerleşim
CA-I	Orta dereceli	Orta dereceli	Sitozol
CA-II	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CA-III	Çok düşük	Çok düşük	Sitozol
CA-IV	Yüksek	Yüksek	Membrana-bağlı
CA-VA	Düşük-orta dereceli*	Yüksek	Mitokondri
CA-VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA-VI	Orta dereceli	Yüksek	Tükrük/süt içinde
CA-VII	Yüksek	Çok yüksek	Sitozol
CARP-VIII	Yok	#	Sitozol
CA-IX	Orta dereceli-yüksek	Yüksek	Transmembran
CARP-X	Yok	#	Salgılanır
CARP-XI	Yok	#	Salgılanır
CA-XII	Düşük	Çok yüksek	Transmembran
CA-XIII	Orta dereceli	Orta dereceli- yüksek	Sitozol
CA-XIV	Orta dereceli	Yüksek	Transmembran
CA-XV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

2.4. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz

2.4.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi:

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi (G6-PD) (D-glukoz-6-fosfat; NADP⁺ oksidoredüktaz E.C. 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir (29). Pentoz fosfat metabolik yolunun hücrede, RNA, DNA ve nükleotid sentezi için gerekli riboz-5-fosfat ve redüktif biyosentezlerde indirgeyici güç olan NADPH'ları sentezlemek gibi başlıca iki fonksiyonu vardır (30). Bunun yanında bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan sedoheptuloz-7-fosfat gibi fosforile karbonhidratlar ile aromatik aminoasit ve vitamin sentezinde gerekli eritroz-4-fosfat sentezlenmektedir (31). Pentoz fosfat yolu oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki kısma ayrılır.

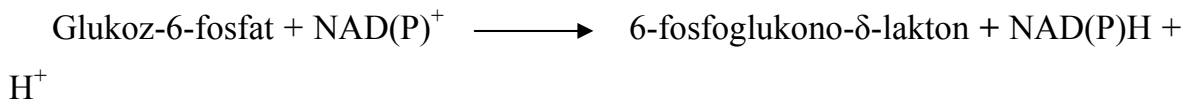
Pentoz fosfat metabolik yolu ve diğer sentez yolları ile bağlantısı Şekil 5'te gösterilmektedir (32).



Şekil 5. Pentoz fosfat metabolik yolu

NADPH hücrede ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonu yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezi, glutatyonun indirgenmesi ve peroksidlerin indirgenmesinde görev alır (31,33). Eritrositlerde pentoz fosfat yolu okside glutatyonun indirgenmesi için gerekli NADPH'yı sağlar. Redükte glutatyon (GSH) ve GSH bağımlı enzimler hücreyi iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklerden ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) korur (34). Fagositlerde oksijen tüketimi ve H₂O₂ oluşumu fazla olduğundan pentoz fosfat yolunun aktivitesi de yüksektir (35). Ksenobiyotikler, glutatyon peroksidaz, sitokrom p450 detoksifikasyon sistemleri ile NADPH kullanılarak metabolize edilir (36). NADPH'nın damar düz kas hücrelerinde iyon kanallarının aktivitesini kontrol ettiği öne sürülmüştür. NADPH'nın azalması özellikle V-tipi potasyum K⁺ kanallarının açılmasına ve vazodilatasyona neden olur (37).

G6-PD enzimi tüm memeli dokularında, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur, hayvan hücrelerinin mitokondri ve sitoplazmasında yer alırken, yeşil bitkilerin kloroplast ve sitozolünde yer alır. Bu enzim ilk kez Yoshida ve Huang tarafından insan eritrositlerinden izole edilmiştir (38,39). Birçok mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan enzim, aşağıdaki tepkimeyi katalizler (40).



G6-PD ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, D G-6-P oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Bu hidroliz pH bağımlıdır, pH 6,4 ve 28°C'de laktonun yarı ömrü 24 dakika, pH 7,4'te ise yaklaşık 1.5 dakikadır (41).

G6-PD aktivitesi beslenme, hormonlar ve özellikle NADPH konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir (42). Beslenmenin ve hormonların enzim üzerinde uzun süreli etkisi kaba kontrol, NADP⁺/ NADPH oranı ile kontrol ise kısa süreli ince kontroldür (43,44)

G6-PD, yaklaşık 515 aminoasitten oluşan, molekül ağırlığı memeli türlerinde 58-67 kDa, mikrobiyal türlerde ise 50-60 kDa arasında değişen bir enzimdir. Enzim genellikle aktif olarak dimerik yapı gösterir. Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, enzim, NADP^+ , NADPH konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olur (44).

Enzimin doğal substratı glukoz-6-fosfattır (G-6-P). Ancak 2-deoksi glukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-floroglukoz-6-fosfat, 2-deoksi-2-kloroglukoz-6-fosfat, mannoz-6-fosfat, 3-deoksiglukoz-6-fosfat gibi substrat analoglarının da belli oranlarda kullanabilmektedir (45).

2.4.2. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivatör ve İnhibitörleri

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ile yapılan kinetik çalışmalar sonucunda enzim aktivitesinin bazı ara bileşikler, metal iyonları, ATP, ADP, NADPH, bazı ilaç ve kimyasal maddeler tarafından etkilendiği tesbit edilmiştir.

Birçok çalışmada çeşitli kimyasal maddelerin G6-PD aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir (46, 47, 48, 49). Bunların bir kısmı inhibisyon oluştururken bazılarında inhibisyona rastlanmamıştır (50). Kadmiyum ve kadmiyum klorürün erkek albino sıçanlara 4 hafta süreyle verilerek G6-PD enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış ve her ikisinde G6-PD enzim aktivitesini önemli derecede azalttığı bulunmuştur (51). Klorpromazin ve haloperidolün in vitro koşullarda insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine etkileri belirlemek amacıyla yapılan çalışmada her ikisinde glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin aktivitesini in vitro olarak güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (52). Lipid peroksidasyonunun major ürünü 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), glutatyon yokluğunda belirli konsantrasyonlarda pentoz fosfat yolunun hız kısıtlayıcı enzimlerini inhibe etmektedir (53). Memelilerdeki G6-PD' in 17- ve 20-ketosteroidlerle yarışmasız olarak inhibe edilmektedir. Rat eritrositlerinde yapılan bir çalışma ile epiandrosteron G6-PD enzimini yarışmasız olarak inhibe etmektedir (54). İnsan eritrosit G6-PD enzim aktivitesi üzerine amoksisilin sodyum, penisilin-

G sodyum, seftriakson disodyum trisesquihidrat antibiyotiklerinin in vitro etkisi araştırılmış, bu antibiyotiklerin enzim üzerine inhibisyon yapıcı etki gösterdiği tespit edilmiştir (55). Sığır eritrositlerinden saflaştırılan G6-PD enzim aktivitesi üzerine ATP, ADP, NADPH ve NADH'ın etkileri araştırılmış ve ADP, NADPH ve NADH yarışmalı inhibisyon gösterirken, ATP yarışmasız bir inhibisyona sebep olmaktadır (56).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Alet ve Malzemeler

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin özellikleri.

Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler	Marka / model
Derin dondurucu	Vestel, Arçelik, Bosch
Hassas analitik terazi	Oertling NA 164
Çalkalayıcı	Nüve, SL 350
Vorteks karıştırıcı	Nüve, NM 110
Soğutmalı santrifüj	Heraeus, Sepatech
Spektrofotometre	Beckman Coulter DU530,UV/VIS
Etüv	Gallenkamp
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Saf su cihazı	Aguatron 4AD
Otomatik pipet, 10-100 µL	Eppendorf
Otomatik pipet,100-1000 µL	Eppendorf
Otomatik pipet,1-5 µL	Eppendorf
Otomatik pipet, 1-5 ml	Eppendorf
pH-metre	Hanna Instruments, HI 9321
Santrifüj	Heraeus, Labofuge 200

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmalar, ürün kodları ve bazılarının saflık düzeyleri Tablo 4. da verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler üretici firmalar ve ürün kodları

Kullanılan kimyasal maddeler	Satın alınan firma, kodu ve saflığı
Tris(hidroksimetil) amino metan	Merk , Ürün kodu:616K2239987
4-nitrofenilasetat	Sigma, Lot 023K2604
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄)	Carlo Erba, %96 (d=1,84 g/mL) No:300057
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck, >%99 (6462)
Hidroklorik asit (HCl)	Carlo Erba, %37 (d=1,25 g/mL) (7647-01-0)
Potasyum klorür (KCl)	Merck, %99-100 (711 TA299855)
Magnezyum klorür (MgCl ₂).6H ₂ O	Sigma, Ürün kodu: M 9272
HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]	Sigma, Ürün kodu: A 5888
CO ₂ gazı	Ticari olarak temin edilmiştir.
Asetazolamid (N-(5-sulfamoyl-1, 3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide)	Sigma, A6011
NADP ⁺	Sigma, Lot 18H7040
G-6-P	Sigma, Lot 67H7005
Ciprofibrate(Ciprofibrate, 2-[4-(2,2-dichlorocyclopropyl)phenoxy]-2-methylpropanoic acid)	Sigma, Lot 094K4056
İnsan eritrosit karbonik anhidraz II	Sigma, Lot 078K6276

Kullanılan çözeltiler ve bazılarının hazırlanışlarıyla yararlanıldığı yerler liste halinde Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Kullanıldığı Yer ve Hazırlanışı
1 M NaOH	10 g NaOH saf suda çözülerek 250 mL'ye tamamlandı. Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
1 M HCL	Tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanıldı.
0.05M Tris-SO ₄ Tamponu (pH=7,4)	(Karbonik anhidraz esterase aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) 6,055 g (0,05 mol) Tris, 950 mL distile suda çözüldü 1M H ₂ SO ₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.
3mM p-nitrofenil asetat çözeltisi	(Karbonik anhidraz esterase aktivitesi tayininde kullanılan substrat) 27,2 mg p-nitrofenil asetat, 1mL asetonda çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL distile suya, yavaş yavaş ilave edildi. Çalışma günü taze olarak hazırlandı.
0.1M asetazolamid Çözeltisi	1.11 g asetazolamid, 13 mL 1 M NaOH'te çözüldü ve 0.05 M Tris-sülfat (pH=7,4) tamponu ile hacim 50mL'ye tamamlandı. Serum karbonik anhidraz esterase aktivitesini inhibe etmek için kullanıldı.
HEPES Tamponu	(Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesi tayininde kullanılan tampon) 6,51 g HEPES bir miktar deiyonize suda çözüldü. 1 M'lik HCl ile pH=8,8 olacak şekilde titre edildi. Deiyonize su ile hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.
Asetazolamid çözeltisi	0,011g asetazolamid, % 10'luk 7,5 mL DMSO'da çözüldü ve son hacim 50 mL olacak şekilde hepesle tamamlandı
34,5mM Siprofibrat(Ciprofibrate) çözeltisi	Siprofibrat stok çözeltisi 34500µm (34,5mM)'dır. (Stok ciprofibrat; 10 mg ciprofibrat, 1mL % 100'lük DMSO'da çözülerek hazırlandı.) Stoktan farklı hacimlerde alınarak denemelerde kullanılacak çözeltiler hazırlandı.
0,5 M Tris (pH =7,4)	(G6-PD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon) 6,05 g Tris (0,05 mol) alınarak bir miktar (70-80 mL) distile suda çözüldü. 1M HCl ile pH metre yardımıyla pH'sı titre edilerek 7,5'e ayarlandı. Daha sonra çözeltinin hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
0,63 M MgCl ₂	(G6-PD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan aktivatör çözelti) 1,28 g MgCl ₂ .6H ₂ O bir miktar distile suda çözüldü. Distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

33 mM G6P	(G6-PD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi) 0,093 g G6P bir miktar distile suda çözüldü. Distile su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
3,8 mM NADP ⁺	(G6-PD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözelti) 0,0725 g NADP ⁺ bir miktar distile suda çözüldü. Distile su ile hacmi 25 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan tüm çözeltiler kullanılabildiği kadar +4 °C'de saklandı.

3.2. METODLAR

Çalışmamızda kullanılan glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi Atatürk Üniversitesi Kimya bölümünde insan eritrositlerinden saflaştırılmış ve saf halde temin edilmiştir. İnsan eritrosit karbonik anhidraz II enzimi ise Sigma'dan saf halde temin edilmiştir.

3.2.1. CA (Karbonik Anhidraz) Aktivite Tayini

3.2.1.1. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Tayini

CA hidrataz aktivitesi, modifiye Wilbur-Anderson metoduna göre ölçüldü. Metodun prensibi, CO₂ hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 7,0'ye düşüşü için geçen süre potansiyometrik olarak bulunmakta ve enzim birimi, enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın (t_c)'e bölünmesi ile belirlenmektedir (19).

Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesinin tayininde, ölçülen CO₂ hidratasyon aktivitesinin kendiliğinden bir reaksiyonla mı, veya, enzim katalizli mi olduğunu ayırt etmek için CA'nın inhibitörü olan asetazolamid kullanıldı. Böylelikle enzimin etkinliği bilinen inhibitörü ile test edilmiş oldu. Ortamın pH'sının ayarlanmasında HEPES tamponu (pH=8,8) ve substrat çözeltisi olarak da buz banyosunda saf suyun içerisinde 45 dakika süreyle CO₂ geçirilmesiyle elde edilmiş olan doygun CO₂ çözeltisi kullanıldı. Denemeler sırasında CO₂ konsantrasyonunu doygun

seviyede tutmak için çözelti içerisinde CO₂ gazı düşük hızda geçirilmeye devam edildi. Denemelerde kullanılacak siprofibrat, 1mL %100'lük DMSO ile çözüldü, daha sonra uygun hacimde ve konsantrasyonlarda hazırlanarak çalışmamızda kullanıldı.

CA hidrataz aktivitesi tayin işlemlerinde şu prosedür uygulandı; öncelikle deney tüplerine 2,6 mL HEPES tamponu, 0,1 mL enzim çözeltisi ve 0,1 mL %10'luk DMSO ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine 2,2 mL CO₂ çözeltisi ilave edildi ve pH metre yardımıyla pH'nın 8,3'ten 7,0'ye düşüşü için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_c). Aynı işlemler 0,1 mL enzim çözeltisi koyulmadan 2,9 mL HEPES tamponu, 0,1 mL %10'luk DMSO ve 2,0 mL CO₂ çözeltisi koyularak yapıldı, pH'nın 8,3'ten 7,0'ye düşüşü için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_0).

İkinci aşamada farklı konsantrasyonlarda (50,100,150,200 μ M) siprofibrat çözeltileri kullanılarak CA hidrataz aktivitesi tayin edildi. Bu amaçla deney tüplerine 2,6 mL HEPES tamponu, 0,1 mL CA enzim çözeltisi ve 0,1 mL farklı konsantrasyonlarda siprofibrat çözeltilerinden ilave edildi. Bu karışım enzim-siprofibrat etkileşiminin tam olarak sağlanabilmesi için on dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra üzerine 2,2 mL CO₂ çözeltisi eklenerek, pH'nın 8,3'ten 7,0'ye düşüşü için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_c). Aynı işlemler 0,1 mL enzim çözeltisi koyulmadan 2,9 mL HEPES tamponu, 0,1 mL siprofibrat ve 2,0 mL CO₂ çözeltisi koyularak yapıldı. pH'nın 8,3'ten 7,0'ye düşüşü için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_0). Her iki aşamadaki enzim ünitesi hesaplamaları, farklı siprofibrat konsantrasyonları için üçer kez tekrarlanarak ve ortalamalar alınarak aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı. Enzim üniteleri kıyaslanarak, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan siprofibrat çözeltilerinin enzim aktivitesi üzerine olan etkisi yorumlandı. Her iki aşamada buz içerisinde gerçekleştirildi.

Enzim aktivitesi ise Eşitlik 3.2'ye göre hesaplandı.

$$EU = \frac{t_0 - t_c}{t_c} \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

Burada;

- EU : Enzim ünitesi
 t_0 : Enzimsiz denemede ölçülen süre
 t_c : Numune varlığında ölçülen süre

3.2.1.2. Karbonik Anhidraz Esteraz Aktivitesi Tayini

Karbonik anhidraz esteraz aktivitesi tayini Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen esteraz aktivitesi metodu ile yapıldı (57). Metodun prensibi; karbonik anhidrazın *p*-nitrofenil asetatı; *p*-nitrofenol ve asetata hidrolizlemesi esasına dayanır. Oluşan *p*-nitrofenolün absorbansı 348 nm’de spektrofotometrik olarak takip edilerek karbonik anhidraz aktivitesi tayin edilir. Fenol grupları asidik olduklarından reaksiyon ortamının pH'sına göre değişen oranda fenolat ve H^+ iyonlarına ayrıışmaktadır. Fakat *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat 348 nm’de aynı absorbansı gösterdiklerinden aktivite tayinini etkilememektedirler (57, 58). Reaksiyon denklemi şu şekildedir:



p-nitrofenil asetat

p-nitrofenol

Asetik asit

CA esteraz aktivitesi tayin işlemlerinde şu prosedür uygulandı; öncelikle deney tüplerine 1,2 mL Tris-SO₄ tamponu, 0,3 mL enzim çözeltisi ve 0,3 mL saf su ilave edildikten sonra oda sıcaklığında iyice karıştırıldı. Daha sonra üzerine 1,2 mL *p*-nitrofenilasetat çözeltisi ilave edildi ve karışım kuartz küvete alınarak 348 nm’de spektrofotometrede üç dakika sonra absorbansı okundu. Aynı işlemler 0,3 mL enzim çözeltisi koyulmadan 1,5 mL Tris-SO₄ tamponu, 0,3 mL saf su ve üzerine 1,2 mL *p*-nitrofenilasetat çözeltisi ilave edilerek yapıldı. (Bu aşama ile 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen miktarı bulunmuş oldu.)

Tablo 6. Eritrosit CA II Esteraz Aktivite Ölçüm Küvet İçeriği

Reaktifler	Kontrol Tüpü (mL)	Numune Tüpü (μl)
0,05M Tris-SO ₄ (pH=7,4)	1,5	1,2
Saf su	0,3	0,3
Enzim çözeltisi	-	0,3
<i>p</i> -nitrofenilasetat	1,2	1,2

İkinci aşamada farklı hacim ve konsantrasyonda siprofibrat çözeltisi kullanılarak CA esteraz aktivitesi tayin edildi. Bu amaçla deney tüplerine 1.2 mL Tris-sülfat tamponu, 0,3 mL CA enzim çözeltisi ve (30,60,90,120,300μl) siprofibrat çözeltilerinden ilave edildi. Bu karışım enzim-siprofibrat etkileşiminin tam olarak sağlanabilmesi için on dakika inkübasyona bırakıldı. Sonra üzerine 1,2 mL substrat çözeltisi konulmasından üç dakika sonra absorbands okundu. Aynı işlemler 0,3 mL enzim çözeltisi koyulmadan 1,5 mL Tris-SO₄ tamponu, 0,15 mL saf su, 0,15 mL siprofibrat ve üzerine 1,2 mL *p*-nitrofenilasetat çözeltisi ilave edilerek yapıldı ve üç dakika sonra absorbands okundu.

Tablo 7. Eritrosit CA II Enziminin Esteraz Aktivitesİ Tayini İçin Kullanılan Çözelti Miktarları ve Bunlara Karşılık Gelen Siprofibrat Konsantrasyonları

0,05M Tris-SO ₄ (pH=7,4) (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Distile su hacmi (mL)	Siprofibrat çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Toplam hacim (mL)	Küvetteki siprofibrat konsantrasyonu (mM)
1,2	0,3	0,27	30	1,2	3,0	0,0345
1,2	0,3	0,24	60	1,2	3,0	0,069
1,2	0,3	0,21	90	1,2	3,0	0,104
1,2	0,3	0,180	120	1,2	3,0	0,138
1,2	0,3	0	300	1,2	3,0	3,45

Birinci aşamada bulunan total esteraz aktivitesi değerinden (ölçülen absorbans değerinden) bu aşamada bulunan değer çıkarılarak total esteraz aktivitesi içindeki CA II aktivitesi payı absorbans olarak bulunmuş oldu. Esteraz aktivitesi olarak bulunan bu absorbans değerleri enzim ünitesine çevrilmeden, doğrudan kullanıldı. Her iki aşamadaki absorbans değerleri farklı siprofibrat konsantrasyonları için üçer kez tekrarlanarak ölçüldü. Ortalama değerler ve standart sapmalar hesaplandı.

3.2.2. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesinin Tayini

G6-PD enzim aktivitesi tayini 37°C Beutler metoduna göre yapıldı. Enzimin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir.



Beutler metodu, NADPH'nin 340 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanır. Enzim aktivitesi, 37°C'de, NADP⁺ 'nın indirgenmesi ile oluşan NADPH'nin 340nm'deki absorbans artışı ile ölçülmektedir. Reaksiyon boyunca NADPH'nin oluşum oranı G6-PD aktivitesine bağlıdır (59).

Enzim aktivitesi ölçmek amacıyla hazırlanan reaksiyon tüpüne konulan maddeler ve miktarları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Eritrosit G6-PD Enziminin Aktivite Ölçüm Küvet İçeriği

Reaktifler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü (µl)
0,5M Tris (pH=7,4)	100	100
0,63M MgCl ₂	100	100
3,8 mM NADP ⁺	100	100
Enzim	50	50
Saf su	650	550
37 °C'de 10 dakika inkübasyon		
33 mM G6P	--	100

Pipetlemenin sonunda tüp içerikleri 1 cm ışık yollu kuartz küvetlere konularak spektrofotometrede kontrole karşı numunenin 4 dk boyunca absorbans değişimi 1 dk da bir kaydedildi. Absorbanslar aşağıdaki formülde yerine konularak litre başına enzim ünitesi (U/L) hesaplandı. Tüm absorbans ölçümleri farklı siprofibrat konsantrasyonları için üçer kez tekrarlanarak ölçüldü. Ortalama değerler ve standart sapmalar hesaplandı.

$$A = \frac{\Delta O.D}{6,22} \times \frac{V_T}{V_E}$$

A = Litre başına enzim ünitesi (EU/L)

$\Delta O.D = 340nm$ 'de optik dansitenin değişimi

V_T = Toplam küvet hacmi

V_E = Enzim çözeltisinin hacmi

6,22= 1cm' lik küvet yolunda 1mM NADPH'ın oluşturduğu absorbans değeri(milimolar ekstinksiyon katsayısı)

3.2.2.1. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine

Siprofibratın İn Vitro Etkisinin İncelenmesi

Siprofibratın glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesi için ilacın mümkün olan en yüksek konsantrasyonu hazırlandı ve bir ön deneyle araştırıldı. Bu araştırma sonucuna göre ilacımızın enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmadığı anlaşıldı. Kullanılan ilacın farklı

konsantrasyonlarını oluşturmak için stok çözelti seyreltildi. Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Tüm absorbans ölçümleri farklı siprofibrat konsantrasyonları için üçer kez tekrarlandı ve enzim aktiviteleri ortalama alınarak hesaplandı. Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltilerin miktarları ve buna göre küvetteki siprofibrat konsantrasyonları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 9. Eritrosit G6-PD Enzimi İçin Siprofibrat İlacı ile Yapılan Çalışmalarda Kullanılan Çözelti Miktarları ve Bunlara Karşılık Gelen Siprofibrat Konsantrasyonları

Saf su (μ l)	0,5M Tris (pH=7,4) (μ l)	0,63M MgCl ₂ (μ l)	3,8mM NADP ⁺ (μ l)	Enzim hacmi (μ l)	33mM G6P (μ l)	Toplam hacim (μ l)	Siprofibrat hacmi (μ l)	Küvetteki siprofibrat konsantrasyonu (mM)
560	100	100	100	30	100	1000	10	0,035
560	100	100	100	30	100	1000	10	0,0863
560	100	100	100	30	100	1000	10	0,173
560	100	100	100	30	100	1000	10	0,345

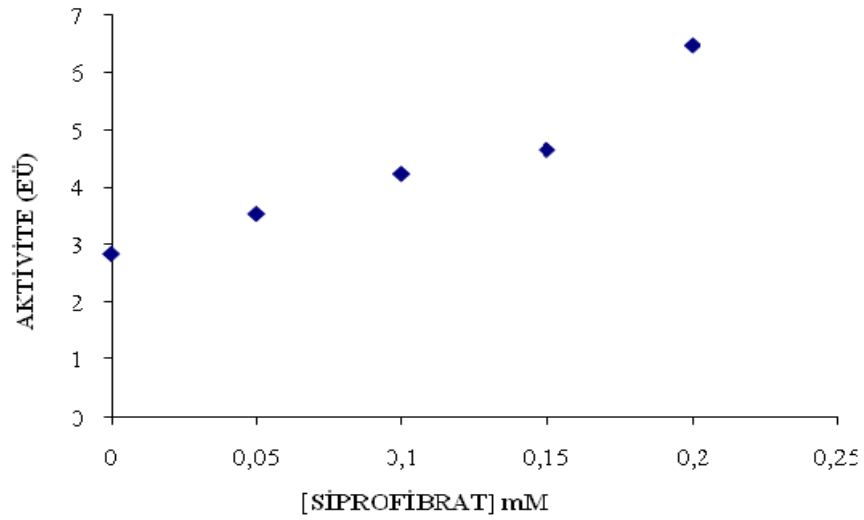
4. BULGULAR

4.1. Siprofibrat'ın Karbonik Anhidraz II Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Karbonik anhidraz enzim aktivitesi, enzimin hidrataz ve esteraz aktivitelerinden yararlanılarak belirlenir. Bu çalışmada siprofibrat bileşiğinin enzimin her iki aktivitesi üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

4.1.1 CA II Hidrataz Aktivitesi Sonuçları

Siprofibrat'ın CA II hidrataz aktivitesi üzerine in vitro etkisi farklı konsantrasyonlarda siprofibrat çözeltisinin belirli bir enzim konsantrasyonundaki çözeltiye ilavesi ile belirlendi. Sonuçlar Şekil 6'daki Aktivite-[Siprofibrat] grafiğinde gösterildi. Burada siprofibratın enzim aktivitesini artırdığı, dolayısıyla, aktivatör gibi davrandığı gözlenmektedir.



Şekil 6. Siprofibrat'ın CA II hidrataz aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili sonuçlar

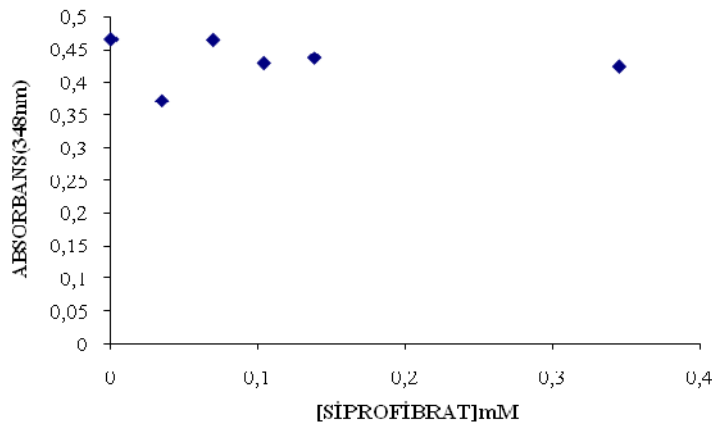
Ayrıca, ilave edilen siprofibrat miktarlarına göre elde edilen % aktifleşme dereceleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Siprofibrat'ın CA II hidrataz aktivitesi üzerine etki dereceleri

[Siprofibrat]mM	Enzim Ünitesi(EÜ) (n=3)	% Aktifleşme Derecesi
0	2,85 ± 0,90	0
0,05	3,55 ± 1,10	25
0,10	4,25 ± 1,55	49
0,15	4,67 ± 1,67	64
0,20	6,47 ± 2,20	127

4.1.2. CA II Esteraz Aktivitesi Sonuçları

CA II Esteraz aktivitesi üzerine siprofibratın farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin etkisi ile ilgili sonuçlar Şekil 7’de Absorbans(348nm)-[Siprofibrat] grafiğinde gösterilmiştir. Buradan bu ilacın CA II esteraz aktivitesini etkilemediği görülmektedir.



Şekil 7. Siprofibrat’ın CA II esteraz aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili sonuçlar

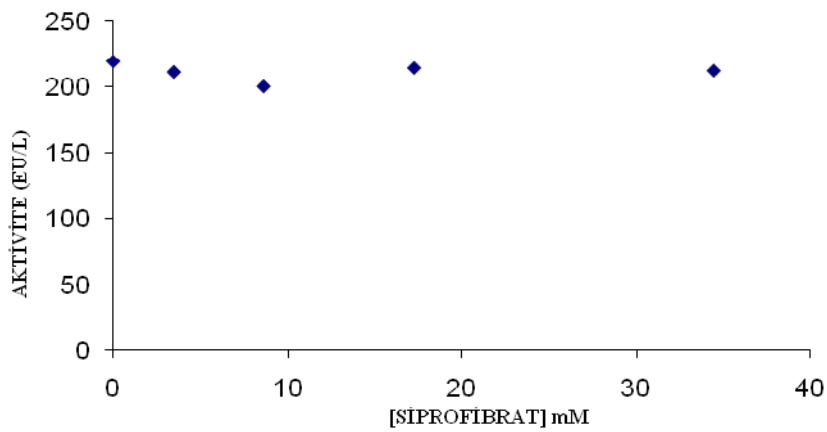
Tablo 11’de ilave edilen siprofibrat miktarlarına göre elde edilen % aktivite değişimi gösterilmiştir.

Tablo 11. Siprofibrat’ın CA II esteraz aktivitesi üzerine etki dereceleri

[Siprofibrat]mM	Absorbans(348nm)(n=3)	% Aktivite Değişimi
0	0,465 ± 0,21	0
0,0345	0,372 ± 0,17	-20
0,069	0,464 ± 0,22	-1
0,104	0,429 ± 0,21	-8
0,138	0,437 ± 0,22	-6
0,345	0,424 ± 0,20	-7

4.2.2.Siprofibrat'ın Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine siprofibratın farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin etkisi ile ilgili sonuçlar Şekil 8'de Aktivite-[Siprofibrat] grafiğinde gösterilmiştir. Buradan bu ilacın glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesini etkilemediği görülmektedir.



Şekil 8. Siprofibrat'ın G6-PD aktivitesi üzerine etkisiyle ilgili sonuçlar

İlave edilen siprofibrat miktarlarına göre elde edilen % aktivite değişimi Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Siprofibrat'ın G6-PD aktivitesi üzerine etki dereceleri

[Siprofibrat]mM	Enzim Aktivitesi(EU/L) (n=3)	% Aktivite Değişimi
0	220 ± 2,081	0
0,0345	212 ± 4,04	-4
0,086	201 ± 5,51	-9
0,18	215 ± 5,0	-3
0,345	213 ± 3,79	-3

5. TARTIşMA

Siprofibrat, hiperlipidemi bařta olmak üzere çeřitli metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılan lipid dūřurucu fibrat grubu bir ilaıtır. Fibratların lipid dūřurucu etkilerine PPAR α aracılık eder. PPAR α (alfa); karacięer, bōbrek, kalp, çizgili kas ve yaę dokusunda bulunan peroksizom proliferatōrleri ile aktiveřtirilen reseptōrler (PPAR) sūper ailesine ait hūcre iıi transkripsiyon faktōrūdūr. PPAR'ler fizyolojik ya da farmakolojik ligandlarla aktivasyonları sonucu özel DNA dizilerine baęlanarak gen ekspresyonunu dūzenler. PPAR'nin ūı tipi bilinmektedir. Bunlar PPAR α , PPAR γ ve PPAR δ (veya β)'dır (1).

Fibratlar etkilerini lipoprotein metabolizmasını kontrol eden genlerin ekspresyonunda değişiklikler yaparak gōsterirler. Bu etkide "Peroksizom Proliferatōrleri ile Aktiveřtirilen Reseptōrler " (PPAR) olarak isimlendirilen nūkleer hormon reseptōrleri aracılık eder. Fibratların bağlanması ile aktif duruma geıen bu reseptōrler diğer nūkleer reseptōrle (retinoik asit -x- reseptōr) heterojen bir şekilde birleşerek "peroksizom proliferatōr response element" olarak adlandırılan spesifik RE'ye bağlanır ve hedef genin özel promoter bōlgesine bağlanarak transkripsiyon hızını değiştirir (2).

Fibratların gen ekspresyonundan baęımsız olarak doęrudan enzim aktivitesi ūzerine etkileriyle ilgili literatūrde sınırlı ıalıřma bulunmaktadır. Bu ıalıřmada, eritrositlerin iki önemli enzimi karbonik anhidraz II ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktiviteleri ūzerine siprofibratın in vitro etkisi incelenmiřtir. Eritrositlerde yer alan bu iki enzim eritrositlerin canlılıęı iıin hayati ūneme sahip olmalarından dolayı seıilmiřtir. Bu hūcrelerin oksijen tařıma ūzelliklerinin,

membran bütünlüğünün ve kanın asit-baz dengesine katkılarının devam etmesi gerekir. Karbonik anhidraz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri eritrositlerin bu özellikleri ile ilgili başta gelen iki enzimdir (6).

Bu çalışmada kullanılan CA II izoenzimi ve G6-PD enzimleri insan eritrositlerine ait olup, piyasadan saf halde temin edilmiştir. Siprofibratın CA II enziminin hem hidrataz, hem de, esteraz aktivitelere olan etkileri ayrı ayrı belirlenmiştir. Her ne kadar CA II'nin fizyolojik fonksiyonu CO₂'nin hidratasyonu ise de, esteraz aktivitesi CA'ların in vitro olarak katalitik miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Fizyolojik önemi olmamasına rağmen bu enzimle ilgili kinetik çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu tercihin başlıca sebebi ölçümün spektrofotometrik olması ve hidrataz aktivitesi belirlenmesinde kullanılan potansiyometrik yöntemle göre daha doğru ve kesin sonuçlar vermesidir. Ancak, her iki katalitik aktivitenin mekanizmasında görev alan enzim üzerindeki gruplarda az da olsa, bazı farklılıkların olması siprofibrat etkisinin her iki aktivite üzerinde de ölçülmesini gerektirmiştir. Elde edilen sonuçlar da bu öngörümüzü haklı çıkarmıştır.

Siprofibratın CA II hidrataz aktivitesi üzerine etkileriyle ilgili sonuçlar Şekil 6 ve Tablo 10' da gösterilmiştir. Burada siprofibratın, CA II hidrataz aktivitesini konsantrasyonu ile orantılı olarak arttırdığı görülmektedir. Yani, bu bileşik enzimin bir aktivatörü gibi davranmıştır. Bu sonuç çalışmanın başlangıcında öngörülmeyen bir bulgu olarak sürpriz olmuştur. Çünkü, literatürde siprofibratın enzim aktivasyonu ile ilgili bir özelliğine rastlanmamıştır.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar Alzheimer benzeri nörodejeneratif hastalıkların ortaya çıktığı bazı durumlarda nöronlardaki CA aktivitesinin azaldığını göstermiştir. Bundan dolayı CA aktivatörlerinin bu azalmayı telafi edebileceklerinden bu hastalıkların tedavisinde kullanılması önerilmiştir. Siprofibrat her ne kadar hiperlipidemi tedavisinde kullanılsa da, bu hastalarda nörodejenerasyonu bir derece önleyebilecek ilave bir etkinin bu ilacın kullanımında pozitif bir katkı olacağı şüphesizdir.

Ayrıca, yapılan bazı çalışmalar siprofibratın aldoz redüktaz enzimini inhibe ettiğini göstermiştir (60). Hiperlipidemi gibi metabolik bir hastalık olan diyabette, özellikle, göz lensindeki katarakt oluşumunda katkısı olan aldoz redüktazın siprofibrat tarafından inhibisyonunun bu ilacın kullanımına yaptığı pozitif katkı kadar karbonik anhidraz inhibisyonunun da katkı sağlayacağı aşıkardır.

Siprofibratın CA II esteraz aktivitesi üzerine etkileriyle ilgili sonuçlar Şekil 7 ve Tablo 11’ da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre genel eğilim olarak siprofibratın esteraz aktivitesine etki etmediği düşünülmektedir. Ancak, düşük siprofibrat konsantrasyonunda (0,0345mM) gözlenen inhibisyon daha yüksek miktarlarda belirlenememiştir. Bunun çalışma hatasından kaynaklanma ihtimali de bulunmasına rağmen, ölçümlerin spektrofotometrik yöntemle ve tekrarlanarak gerçekleştirilmesi bu sonucun deney hatası olarak geçirilemeyeceği kanaatini vermiştir. Çeşitli enzimlerin bazı bileşikler tarafından inhibisyonunun çalışıldığı bazı tezlerde benzer bulgulara rastlanmış ancak aktivite seyrinde düşük bileşik konsantrasyonunda gözlenen inhibisyona bir açıklama getirilmeden bileşiğin etkisizliği ifade edilmiştir(61). Sonuç olarak, siprofibratın CA II esteraz aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı kanaatine varılmıştır. Siprofibratın CA II hidrataz aktivitesini artırırken, esteraz aktivitesini etkilememesi her iki aktivitenin de reaksiyon mekanizmalarındaki farklılığa bağlanabilir.

Siprofibratın G6-PD aktivitesi üzerine etkileriyle ilgili sonuçlar Şekil 8 ve Tablo 12’ de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre kullanılan siprofibrat miktarlarında enzim herhangi bir inhibisyona uğramamıştır. Dolayısıyla bu ilacın glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır. G6-PD ile ilgili literatürde birçok ilaç özelliği olan bileşiklerin etkilerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre bu ilaçların kullanılma şekilleri belirlenmiştir. Bu enzimi yüksek derecede inhibe eden bileşikler anemiye yol açabilirler. Dolayısıyla, anemi sebeplerinden biri olabilecek G6-PD inhibisyonunun siprofibrat için söz konusu olmadığı belirlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Siprofibratın insan karbonik anhidraz II (hCA II) enziminin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ile insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Siprofibrat hCA II'nin hidrataz aktivitesini artırmıştır, yani, bir aktivatör etkisi göstermiştir.
2. Siprofibrat hCA II'nin esteraz aktivitesi üzerine kayda değer bir etki göstermemiştir.
3. Siprofibrat insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi aktivitesi üzerine de herhangi bir etki sergilememiştir.

6.2. Öneriler

1. Siprofibrat dışındaki fibratların da çalışılan bu enzimler üzerine etkinliği incelenebilir.
2. Siprofibratın hCA II'nin hidrataz aktivitesini artırmasından yola çıkarak bu ilacı kullananlarla ilgili prospektif bir çalışma ile nörodejeneratif hastalıklarla ilişkisi araştırılabilir.
3. Yukarıdaki husus hayvan çalışmalarıyla da desteklenebilir.
4. Siprofibrat ve fibrat türü ilaçların diğer karbonik anhidraz izoenzimleri için de aktivatör olarak davranıp davranmayacağı saf haldeki bu izoenzimlerde incelenebilir.

7. ÖZET

SİPROFİBRATIN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ II VE GLUKOZ 6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ

Siprofibrat, fibrat grubu ilaçlar sınıfında yer alan geniş spektrumlu lipid düşürücü bir ilaç olup, hiperlipidemi başta olmak üzere, çeşitli metabolik hastalıkların tedavisinde kullanılır. Fibratlar, plazma trigliserid ve LDL kolesterol düzeyini azaltırken, HDL kolesterol düzeyini artırır. Fibratların lipid düşürücü etkilerine PPAR α aracılık eder.

Fibratların gen ekspresyonundan bağımsız olarak doğrudan enzim aktivitesi üzerine etkileriyle ilgili sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, eritrositlerin iki önemli enzimi karbonik anhidraz II ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktiviteleri üzerine siprofibratın in vitro etkisi incelenmiştir.

Aktivite ölçümleri saf halde temin edilen insan eritrosit karbonik anhidraz II izoenzimi (hCA II) ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6-PD) enzimiyle gerçekleştirilmiştir. hCA II üzerine siprofibrat etkisi enzimin hem hidrataz, hem de esteraz aktivitelerinden yararlanılarak belirlenmiştir.

Aktivite ölçümleri sonucunda siprofibrat, aktivatör gibi davranarak, CA II hidrataz aktivitesini, konsantrasyonu ile orantılı olarak, artırmıştır. Fakat, hCA II'nin esteraz aktivitesi ve G6-PD enzimi aktivitesi üzerine önemli bir etkisi

bulunamamıştır. Bu bulguların ışığı altında ilaç olarak kullanılan siprofibratın insan sağlığı ile ilgili muhtemel ilave etkileri de tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Karbonik anhidraz(CA II), glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6-PD), siprofibrat, PPAR α .

8.SUMMARY

AN INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CIPROFIBRATE ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE II AND GLUCOSE 6- PHOSPHATE DEHYDROGENASE ENZYMES ACTIVITIES IN VITRO

Ciprofibrate is a lipid decreasing drug which belongs to the class of fibrates, and used in the treatment of various metabolic diseases, especially, in many hyperlipidemias. Fibrates decrease TG and LDL levels whereas increasing the HDL levels. PPAR α mediates the lipid decreasing effects of the fibrates.

There are limited number of studies on direct effects of fibrates on the enzyme activities. In this study, effects of ciprofibrate on in vitro activities of two significant erythrocyte enzymes, carbonic anhydrase II (CA II) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6-PD) were investigated.

For activity measurements pure human erythrocyte CA II isoenzyme (hCA II) and G6-PD enzyme which were provided commercially were used. Effects of ciprofibrate on hCA II is determined on both hydratase and esterase activity of the enzyme.

As the result of the measurements, ciprofibrate, acting as an activator, increased the CA II hydratase activity proportional to its concentration. But, no effects on esterase activity of hCA II and G6-PD enzyme activity were observed.

Under the lighth of these results the possible additional effects of ciprofibrate which is used as a medicine were also discussed.

Key words: Carbonic anhydrase II (CA II), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6-PD), ciprofibrate, PPAR α .

9. KAYNAKLAR

1. Staels, B., Chinetti, G., Fruchart, J.C.: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflammation Research*, 49: 497–505, 2000.
2. Kota, P.B., Hsun, T., Huang, W., Roufogalis, B.D.: An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*, 51: 85–94, 2005.
3. Sly, W.S., Hu, P.Y.: Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual Reviews of Biochemistry*, 64: 375-401, 1995.
4. Maren, T.H.: Carbonic Anhydrase, Physiology and Inhibition. *Physiol*, 47: 595, 1967.
5. Cappellini, M.D., Fiorelli, G.: Glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371: 64-74, 2008.
6. Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., Biyokimya. Altıncı Baskı. Aktif Yayınevi, İstanbul, s. 341-342.
7. Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., Fruchart, J.C.: Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 98: 2088-93, 1998.

8. Fruchart, J.C., Staels, B., Duriez, P.: The role of fibric acids in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 3: 83-92, 2001.
9. Schonfeld, G.: The effects of fibrates on lipoprotein and hemostatic coronary risk factors. *Atherosclerosis*, 111: 161-74, 1994
10. Özer, A.: *Pratik Hematoloji. Klinik Laboratuvar ve Tedavi. Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir*, 1985.
11. Siems, W.G., Sommerburg, O., Grune, T.: Free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol*, 53(Suppl 1): 9-17, 2000.
12. Supuran C. T.: Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews, Drug Discovery*, 7:1-12, 2008.
13. Supuran, C.T., Scozzafava, A.: Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4336–4350, 2007.
14. Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran T. C.: Carbonic anhydrases: current State of the art, therapeutic applications and future prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19: 199-229, 2004.
15. Pocker, Y.: Water in enzyme reactions: biophysical aspects of hydration-dehydration processes. *Cell Molecular Life Science*, 57: 1008–1017, 2000.
16. Akisawa, N., Nishimari, I., Miyaji, E., Iwasaki, S., Maedo, T., Shimizu, H., Sato, N., Onishi, S.: The ability of anti-carbonic anhydrase II antibody to distinguish autoimmune cholangitis from primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Jour Gastroent*, 34: 366-371, 1999.
17. Maren, T.H., Jankowska, I., Sanyal, G., Edelhauser, H.F.: The Transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Experimental Eye Research*, 33: 457, 1983.

18. Epstein, D. L., Grant, W.M.: Carbonic anhydrase inhibitors side effects;Serum Chemical Analysis. Archives of Ophthalmology, 85: 1387, 1977.
19. Wilbur, K.M., Anderson, N.G.: Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase. Journal of Biological Chemistry, 76: 146, 1948.
20. Maren, C.H.: Simplified Micromethod for the Determination Carbonic Anhydrase and its Inhibitors. Journal of Pharmacology Expedition Therapeutic,130: 26, 1960.
21. Conroy, C.W., Maren T.H.: The Determination of Osteopetrotic Phenotypes by Selective Inactivation of Red Cell Carbonic Anhydrase Isoenzymes. Clinica Chimica Acto, 15: 3347, 1985.
22. Mathews, C.K., Holde, K.E.V.: Biochemistry, The Benjamin Publishing Company Inc. Oxford, 308-317, 1990.
23. Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T.: Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. The Journal of Biological Chem, 242 (18): 4221-29, 1967.
24. Koester, M.K., Pullan, L.M., Noltmann, E.A.: The p-nitrophenyl Phosphatase Activity of Muscle Carbonic Anhydrase. Arch Biochem Biophys, 211(2): 632-42, 1981.
25. Testa, B., Mayer, M.J.: Hydrolysis in drug and prodrug metabolism. Science, 2003, pp 69.
26. Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A.: Carbonic Anhydrase Inhibitors. Medicinal Research Reviews, 23(2) : 146-189, 2003.
27. Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D., Supuran, C.T.: 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. *Chem. Eur. J*, 12: 7057 – 7066, 2006.

28. Briganti, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T.: Carbonic Anhydrase Activators. Part 19 Spectroscopic and kinetic investigations for the interaction of isoenzymes I and II with primary amines. *Metal Based Drugs*, 4:(4), 221-227, 1997.

29. Mehta, A., Mason, P., Vulliamy, T.J.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bailliers Best Pract Res Clin Haematol*, 13: 21-38, 2000.

30. Krebs, H.A., Eggleston, L.V.: The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver. In: Weber G (ed). *Adv enzyme regul.* Oxford: Pergamon Press Ltd, 12: 421-33, 1978.

31. Wood, T.: Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. *Cell Biochem Funct*, 4: 235-40, 1986.

32. Tandoğan, B.: Kuzu böbrek korteksinden, glukoz-6-fosfat dehidrogenazın saflaştırılması ve bazı özelliklerinin saptanması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Yüksek Lisans Tezi Çalışması, 2004.

33. Nelson, D.L., Cox, M.M.: *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. USA: Worth Publishers, 743-4, 2000.

34. Siems, W.G., Sommerburg, O., Grune, T.: Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin Nephrol*, 53(Suppl 1): 9-17, 2000.

35. Borregaard, N., Schwartz, J.H., Tauber, A.: Proton secretion by stimulated neutrophils. *J Clin Invest*, 74: 455-9, 1984.

36. Hollenberg, P.F.: Mechanisms of cytochrome p-450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASEP J*, 6: 686-94, 1992.

37. Gupte, S.A, Li, K., Okada, T., Sato, K., Oka, M.: Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 301: 299-305, 2002.
38. Antonenkov, V.D.: Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem*, 183: 75-82, 1989.
39. Bublitz, C., Steavenson, S.: The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 263: 12849-53, 1988.
40. Oeser, A., Tolbert, NE., Schnarrenberger, C.: Two isoenzymes each of G-6PD and 6-PGD in spinach leaves. *Arch Biochem Biophys*, 154: 438-48, 1973.
41. Zaheer, N., Tewari, K.K., Krishan, P.S.: Mitochondrial forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic acid dehydrogenase in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 120: 22-34, 1967.
42. Scott, W.A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *neurospora crassa*. *Methods Enzymol*, 41: 177-82, 1975.
43. Levy, H.R.: Glucose-6-phosphate dehydrogenases. In Meister A (ed). *Advan Enzymol*. New York. John Wiley and Sons Inc, 48: 97-191, 1979.
44. Ayala, A., Fabregat, I., Machado, A.: The role of NADPH in the regulation of glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase in rat adipose tissue. *Mol Cell Biochem*, 105: 1-5, 1991.
45. Seifter, R.C., Boxer, J.L., Zimmerman, D.C., Cantley, L.C.: Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. *J Biol Chem*, 266: 12442-8, 1991.
46. Telefoncu, A., Zihnioğlu, F.: Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine primaquin'in etkisi. *Tr J.Med.Sci*, 14: 7-63, 1990.

47. Çiftçi, M., Küvrevioğlu, Ö.İ., Gündoğdu, M., Özmen, İ.: Effects of some antibiotics on enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Pharmacological Research*, 41(1), 2000.
48. Gupta, B.I., Nehal, M., Baquer, N.Z.: Effect of experimental diabetes on the activities of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catecolamines in rat erythrocytes of different ages. *Indian J. Exp. Biol*, 35: 792-5, 1997.
49. Firguet, B., Stadtman, E.R., Szweda, I.J.: Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. *J.Biol.Chem*, 26:268, 1994.
50. Warnock, D.G.: Appletion and Lange, 1989, pp.183-97
51. Gümüşlü, S., Öner, G.: Kadmiyumun eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine etkisi. *Türk Tıp Araştırma* 10(5): 240-244,1992.
52. Büyükokuroğlu, M. E., Altıkat, S., Çiftçi, M., Banoğlu, N.Z., Göçer, F.: Klorpromazin ve haloperidol'ün insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerine in vitro etkileri. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 11(2):101-105, 2001.
53. Bekyarova, G., Yankova, T., Kozarev, L.: Combined application of alpha-tocopherol and FC-43 perfluorocarbon emulsion suppresses early postburn lipid peroxidation and improves deformability of erythrocytes. *Acta.Chir.Plant*, 40:17-21,1998.
54. Beutler, E.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood*, 84: 3613-36,1994.
55. Pençe, S., Çiftçi, M., Küvrevioğlu, Ö.İ.: İnsan eritrosit glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerine bazı antibiyotiklerin in vitro etkileri. *Genel Tıp Dergisi*, 10(4): 141-5, 2000.

56. Altıkat, S., Çiftçi, M., Beydemir, S., Yılmaz, H.: Purification of glucose 6-phosphate dehydrogenase from Buffalo (*Bubalus bubalis*) erythrocytes and investigation of some kinetic properties. *Protein Expression and Purification*, 29: 304–310, 2003.
57. Armstrong, J. Mc., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., Edsal, J. T.: Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 214: 5137-49, 1996.
58. Koester, M. K., Pullan, L. M., Noltmann, E. A.: The p-nitrophenyl Phosphatase Activity of Muscle Carbonic Anhydrase. *Arch Biochem Biophys*, 211 (2): 632-42, 1981.
59. Beutler, E.: Red cell metabolism. *Manual of biochemical methods*. Academic press, London, 12: 68-70, 1971.
60. Balendiran, G. K., Rajkumar, B.: Fibrates inhibit aldose reductase activity in the forward and reverse reactions. *Biochemical Pharmacology*, 70: 1653–1663, 2005.
61. Özabacıgil, B.: İnsan eritrosit 6- fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması, bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine in vitro ve tavşanlarda in vivo etkisinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı Doktora Tezi Çalışması, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

24.02.1983 tarihinde Ordu'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ordu'da tamamladı. 2000 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nü kazandı. 2005 yılında bu bölümden mezun oldu. 2006-2007 yılları arasında Özel Ordu Umut Hastane'sinde biyokimyager olarak çalıştı. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı. Halen aynı bölümde yüksek lisans eğitime araştırma görevlisi olarak devam etmektedir.

Diler US