ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİGİTALİS LAMARCKİİ IVANİNA (YÜKSÜK OTU) BİTKİSİNİN ÇEŞİTLİ KISIMLARININ EKSTRELERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİMİNİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Cuma DİNÇER

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Cuma DİNÇER tarafından hazırlanan **"*Digitalis Lamarckii Ivanina* (Yüksükotu) Bitkisinin Çeşitli Kısımlarının Ekstrelerinin Karbonik Anhidraz II Enziminin Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması"** adlı tez çalışması 13/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Dr. Öğr. Üyesi Ümit YIRTICI
Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı
Kırıkkale Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞU
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Şevki ADEM
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Digitalis Lamarckii Ivanina*** **(Yüksükotu) Bitkisinin Çeşitli Kısımlarının Ekstrelerinin Karbonik Anhidraz II Enziminin Aktiviteleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (13/09/2021).

Cuma DİNÇER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİGİTALİS LAMARCKİİ IVANİNA (YÜKSÜK OTU) BİTKİSİNİN ÇEŞİTLİ KISIMLARININ EKSTRELERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ II ENZİMLERİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Cuma DİNÇER

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

Karbonik anhidraz enzimi CO_2'in, HCO_3ve H^+ iyonlarına iki basamakta dönüşümlü olarak hidratasyonunu katalizleyen, çinko iyonlu metaloenzimlerden biridir. İnsan gözünde CA-I, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bulunur. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aközhumorun salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncın (IOP) düşürdükleri için, glokom hastalığı tedavisinde sıklıkla etkili bir şekilde kullanılırlar.Yüksük otu (*Digitalis L.)* canlı vücudu için çok önemli olan ve özellikle kalp ilaçlarının ana maddesi olan kardenolit glikozitleri içerdiğinden ötürü ülke ekonomisine ciddi bir şekilde katkıları olan çok nadir yerde yetişen ülkemizde birçok yerde yetişen Scrophulariaceae familyasına ait endemik otsu bir bitki türüdür.Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday *Digitalis lamarckii* Ivanina (yüksük otu) bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilen metanol, hekzan, kloroform, aseton ve kaynatma ekstrelerinin karbonik anhidraz inhibisyonu aktiviteleri incelenmiştir. Ekstreler 64-761 µg/mL IC_{50} değerleri aralığında inhibisyon etkisi göstermiştir. Gövde kaynatma ve hekzan ile elde edilen ekstre 64 ve 101 µg/mL IC_{50} değerleri ile en yüksek inhibisyon etki göstermişlerdir.

2021, 51 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik anhidraz, *Digitalis lamarckii*, Ekstre, Glokom, Yüksük otu

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF EXTRACTS FROM DIFFERENT PARTS OF *DIGITALIS LAMARCKII IVANINA* (FOXGLOVE) PLANT ON CARBONİC ANHİDRASE II ENZYME

Cuma DİNÇER

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Şevki ADEM

The carbonic anhydrase enzyme is one of the zinc ion metalloenzymes that catalyzes the hydration of CO_2 to HCO_3 and H^+ ions alternately in two steps. The human eye contains CA-I, CA-II, and CA-IV isoenzymes. Carbonic anhydrase inhibitors are often used effectively in the treatment of glaucoma because they reduce the high intraocular pressure (IOP) produced by the secretion of aqueous humor.Foxglove (Digitalis L.) is an endemic herbaceous plant species belonging to the Scrophulariaceae family, which grows in many places in our country, which is very important for the living body and contributes significantly to the country's economy, especially because it contains cardenolite glycosides, which are the main ingredient of heart medicines.In this study, carbonic anhydrase inhibition activities of methanol, hexane, chloroform, acetone and decoction extracts obtained from root, stem, leaf and flower parts of *Digitalis lamarckii Ivanina* (Foxglove) plant, which is a candidate to be used in the treatment of glaucoma, were investigated. The extracts showed an inhibitory effect in the range of IC_{50} values of 64-761 μg/mL. The extract obtained with stem decoction and hexane showed the highest inhibition effect with IC_{50} values of 64 and 101 μg/mL.

2021, 51 pages

Keywords: Carbonic anhydrase, *Digitalis lamarckii*, Extract, Glaucoma, Foxglove

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yaptığım çalışmamda her zaman bana her türlü yardım ve desteği veren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, akademik ve insani yönden kendime daima örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Şevki ADEM' derin minnet ve sevgilerimi sunarım. Çalışmamda başta Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya laboratuvarında çalışan sayın Dr. Ali Rıza Tüfekçi olmak üzere emek veren tüm hocalarım ve ÇAKÜ Kimya bölümünde bana yardımcı olan çalışanlara teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen bu süreçte sabır gösteren ve desteğini her zaman hissettiren eşim, oğlum Said Mirza DİNÇER'e ve başta değerli babam olmak üzere aileme ve bu zorlu süreçte yanımda olan ve tüm sevenlerime minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Cuma DİNÇER

Çankırı, Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1.GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ÖZETLERİ **4**
2.1 Enzimler **4**
2.1.1 Karbonik anhidraz enzimi **6**
2.2 *Digitalis Lamarckii* **9**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **15**
3.1 Materyal **15**
3.1.1 Yararlanılan alet ve cihazlar **15**
3.1.2 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması **15**
3.2 Yöntemler **17**
3.2.1 Docking çalışmaları **17**
3.2.2 Ekstraksiyon **17**
3.3 Enzim Aktivitesi Tayini **24**
3.4 HCA-II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Yüksük Otu Ekstrelerinin Etkilerinin Belirlenmesi **26**
4. BULGULAR **27**
4.1 Enzim Çalışmaları **27**
4.2 HPLC Sonuçları **38**
4.3 Moleküler Docking Sonuçları **40**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **46**
KAYNAKÇA **48**
ÖZGEÇMİŞ **51**

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
ng	Nanogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
α	Alfa
±	Artı-Eksi
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece

KISALTMALAR DİZİNİ

dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
m^2	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Anahtar kilit modeli (Fisher modeli) 4
Şekil 2.2 CA'nın katalizleme reaksiyonu 7
Şekil 2.3 CA-II enziminin 3 boyutlu yapısı 8
Şekil 2.4 Digitalis purpurea 10
Şekil 2.5 Farklı digitalis türleri 11
Şekil 2.6 *D.Lamarckii Ivan'ın* hipokotil eksplantlarından doğrudan somatik embriyolar 13
Şekil 3.1 Digitalis lamarckii Ivan.toplanma bölgesi İst.1, Kızılcahamam Şahinler Milli parkı, 1469m Kızılcahamam /ANKARA 18
Şekil 3.2 Yüksük otunun farklı açıdan görünüşü 18
Şekil 3.3 Yüksük otunun farklı açıdan görünüşü 19
Şekil 3.4 Yüksük otunun farklı açıdan görünüşü 19
Şekil 3.5 Digitalis lamackii Ivan bitkisinin toplanma bölgesinde çekilmiş fotoğrafları 20
Şekil 3.6 Digitalis Lamarckii Ivan bitkisinin kurutulmuş ve bölümlerine ayrılmış halleri 21
Şekil 3.7 Ekstraksiyon sonrası çözeltiler 21
Şekil 3.8 Afinite jeli hazırlanırken oluşan reaksiyonlar 22
Şekil 3.9 p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması 24
Şekil 4.1 *D.lamarckii* kök aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 28
Şekil 4.2 *D.lamarckii* gövde aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 28
Şekil 4.3 *D.lamarckii* yaprak aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 29
Şekil 4.4 *D.lamarckii* çiçek aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 29
Şekil 4.5 *D.lamarckii* kök metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 30
Şekil 4.6 *D.lamarckii* gövde metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 30
Şekil 4.7 *D.lamarckii* yaprak metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 31
Şekil 4.8 *D.lamarckii* çiçek metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 31
Şekil 4.9 *D.lamarckii* Kök $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 32
Şekil 4.10 *D.lamarckii* Gövde $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 32

Şekil 4.11 *D.lamarckii* Yaprak $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 33
Şekil 4.12 *D.lamarckii* Çiçek $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 33
Şekil 4.13 *D.lamarckii* Kök Hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 34
Şekil 4.14 *D.lamarckii* Gövde Hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 34
Şekil 4.15 *D.lamarckii* Yaprak Hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 35
Şekil 4.16 *D.lamarckii* Çiçek Hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 35
Şekil 4.17 *D.lamarckii* Kök Kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 36
Şekil 4.18 *D.lamarckii* Gövde Kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 36
Şekil 4.19 *D.lamarckii* Yaprak Kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 37
Şekil 4.20 *D.lamarckii* Çiçek Kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi 37
Şekil 4.21 Moleküllerin enzimin aktif bölgesine bağlanma modeli 41
Şekil 4.22 Rutin'in bağlanma şekli 42
Şekil 4.23 Naringin bağlanma şekli 43
Şekil 4.24 Neohesperidin bağlanma şekli 44
Şekil 4.25 Hesperidin'in bağlanma şekli 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Memelilerde CA II enziminin doku dağılımı ve işlevi (Parkkila et al. 2004)..... 2
Çizelge 3.1 Maddelerin ortalama katılım miktarları..... 25
Çizelge 4.1 Bitkinin sulu ekstrelerinin karbonik anhidraz enzimi üzerindeki etkileri..... 27
Çizelge 4.2 HPLC sonuçları..... 39
Çizelge 4.3 Moleküler docking sonuçları..... 40

1.GİRİŞ

Ülkelerin çeşitli varlıkları ve bulundurdukları endemik türleri çeşitli faydalar sağlamaktadır. Bir yörenin herhangi bir alanda zenginliği o yörenin birçok alanda gelişmesine olanak vermektedir. Birçok alanda konumlarını zirveye çıkarmasına sebep olabilir. Ülkemizin de bitki çeşitliliği açısından çok geniş bir farklı başka yerde bulunmayan bitki türüne sahip olması birçok konuda ülkemize avantaj sağlamaktadır. Gerek sosyal gerek kültürel gerek ekonomi alanında birçok avantaj sağlamaktadır. Özellikle coğrafyamızda bulundurduğumuz endemik türler ülkemizi birçok alanda cazibe merkezi haline getirmiştir.

Bir yörede farklı iklim koşullarının farklı türlerin meydana gelmesine olanak sağlar. *Digitalis* (Plantaginaceae) adı verilen yüksük otu cinsi ülkemiz coğrafyasında 36 ya yakın türden oluşur (Güneş and Özhatay 2000). Bulunan bu türler birçok farklı alanda kullanılmaktadır. *Digitalis* bitkisinin birçok bölümleri ise hastalıkları gidermek amacıyla kullanımdadır. Bugüne kadar elde edilmiş çalışmada *D. Lamarckii* bitkisinin bakterilere karşı önemli bir şekilde etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Benli *et al.* 2009). *Digitalis* bazı türleri önemli hastalıklara karşı etkisi gözlenmiştir. Alzheimer hastalığı, şeker ve deri hastalıkları gibi birçok hastalıktada etkili olan enzimlere karşı antioksidan çalışmaları gösterilmiştir (Zengin *et al.* 2017). *D. Lamarckii* birçok enzim üzerinde etkisi araştırılmıştır. Yapılan araştırmalarda elde edilen bulgularda kolinesteraz, ve amilaz enzimi ile yapılan laboratuar deneylerinde enzimleri inhibe edici etkisi oldukça zayıf olduğu belirtilmiştir (Zengin *et al.* 2017).

Gelişmiş çağımızda modern tıp olarak denilen teknoloji aşırı derecede fazla kullanıldığı günümüz tıp teknolojisinde ilaç üretiminde bitkiler önceki dönemlerde olduğu gibi bu zamanda da çok önemli bir yere sahiptir. Hastalıkları tedavi alanında elde edilen tedavi yöntemlerinin yanı sıra bitkiler hala hastalıkları iyileştirmede kullanılmaktadır (Shu 1998). Bitkiler her dönemde tedavide ilgi odağı olmuştur. Gelişmiş bu zamanda tıp sektörü ileriye gittikçe elde edilen yeni yöntemlerin yanı sıra kullanılan şifalı bitkilerin biyolojik olarak etkilerinin fazla olması sebebiyle bitkilere olan ilgi artmıştır (Newman and Cragg 2007).

Keşfi ilk defa sığırın eritrositlerinden yapılmaya başlayan karbonik anhidraz enzimi canlılarda CO_2 hidratlaşmasını ve bikarbonatın dehidratlaşma reaksiyonlarını dönüşümlü olarak kataliz eden önemi büyük bir enzimdir (Gülçin *et al.* 2016).

Glokom hastalığının tedavisinde karbonik anhidraz II enzimi kullanılır. Karbonik anhidraz II enziminin kullanılmasının amacı göz içi basıncı dengelemektedir. Bu sebepten dolayı tekrar geri dönülemeyen körlüğe neden olan glokom hastalığında Karbonik anhidraz enzimi II çok enzimi önemli bir yere sahiptir. Bu hastalık yüksek derecede gözün iç basıncıyla ortaya çıkmaktadır. Dünya genelinde ise sayısı azımsanmayacak kadar birçok insanın yüksek göz içi basıncına sahip olduğu düşünülmektedir. Göz içi basıncını sağlanmasında aköz hümör çok önemli bir yerde rol oynamaktadır. Karbonik anhidraz II enzimi aköz hümörün salgılanmasını sağlayan güçlü bir uyarıcı etkisi vardır. Karbonik anhidraz II enzimi eritrosit, böbrek karaciğer ve proksimal tubüllerde CO_2 değişiminde çok önemli rollerde yer almaktadır. Karbonik anhidraz II eksikliğinde ise osteopetrozis, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon gibi başlıca hastalıklara yol açan hemen hemen hiç görülmeyen otozomal çekinik bir hastalık olduğu 2008 yılında Nampoothiri ve Anikster gibi bilim insanları tarafından bildirilmiştir. Memelilerin karbonik anhidraz II (CA II) izoenziminin dokudaki dağılım ve bu dokudaki işlevi gösterilmiştir(Epstein and Grant 1977, Pastarekova *et al.* 2004). (Çizelge 1.1)

Çizelge 1.1 Memelilerde CA II enziminin doku dağılımı ve işlevi (Parkkila et al. 2004)

Doku Dağılımı	**İşlevsel Rolleri**
Yemek borusu(özafagus) ve larinks epiteli	Midede yemek borusu ve daha yukarı bölgelere mide içeriğinin geri akımını engeller
Kemi osteoklast hücreleri	Kemik resorpsiyonu
Göz	Akoz hümörün üretimi
Testis	Sperm hareketliliği
Böbrek	İdrar asidifikasyonu
Beyin	BOS salgısı
Akciğer	Gaz değişimi
Eritrositler	Gaz değişimi
Gastrointestinal epiteli	H^+ salgısı, HCO_3^- salgısı

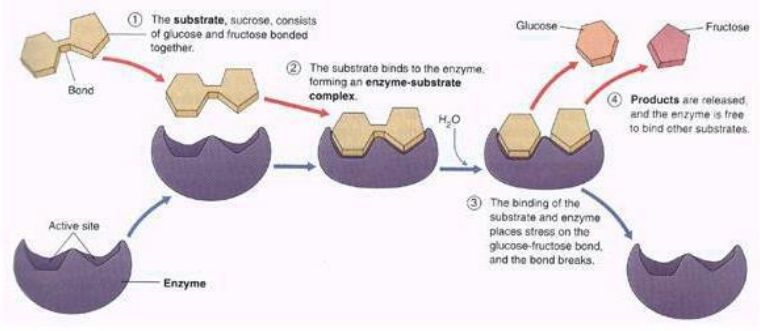
Glokom hastalığı göz hastalıklarından merkezi görme siniriyle ilgili optik sinir adı verilen bir çeşit önemli bir göz hastalığıdır. Optik sinirin görevi ise retinanın içinden gelmekte olan ışığı üreten sinir sinyallerini alır ve aldığı bu elektrik sinyallerini görme olarak algıladığımız yere yani beyne iletir. Glokom hastalığı ilk başlangıçta genellikle hafif bir yan görüş kaybı ile başlayıp daha sonra ise sinir hücrelerine kadar ilerleyen ve ilerledikçe hasarın özel bir durumu tarafından karakterize edilmektedir. Glokom hastalığı eğer ki erken teşhis ve tedavi erken edilmezse, merkezi görme kaybı yaşanır ve daha sonraki ileriki aşamada körlüğe kadar yol alabilen tehlikeli bir hastalıktır. Glokom hastalığı her zaman değil, fakat genellikle göz içindeki basınçla ilgilidir. Özellikle ana merkezi sinir olan optik sinir (göz siniri) hasarına sebep olan yüksek göz basıncı hastalığıdır. Bazı durumlarda, glokom hastalığı anormal olmayan gözdeki basıncın oluşunda da meydana gelebilir. Glokomun bu şekilde meydana gelmesine, gözün sinirine doğru yetersiz ve düzenli bir şekilde kan akışının sebep olduğu gözlenmiştir. Glokom gibi zararlı bir hastalığın hiçbir tedavisinin olmadığını anlamak çok önemlidir. Gözdeki sinir dokuları öldüğü ve görme işlevi kaybedildiği zaman yenilenemezler. Tedavide ise sadece geriye kalan görme duyusu korunmaya yardım edilebilir. Bu sebepten dolayı hastalığı ilk aşamada tespit etmek çok önemlidir (Bhowmik *et al.* 2012).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Enzimler

Canlılardaki yaşamsal reaksiyonları meydana getiren ve herhangi bir yan ürün oluşmasını engelleyen verimi %100 sağlayan biyolojik katalizörlere verilen genel isme enzim denir. Birkaç küçük enzim gurubu hariç bütün enzimlerin yapısında protein yer alır. Günümüze kadar yaklaşık olarak iki bine kadar enzim bulunmuş olup bunlardan ise hemen hemen 200'e yakını saflaştırılabilmiştir (Keha and Küfrevioğlu 2005).

Enzimlerin aktif bölgesi subtratları ve varsa kofaktörleri bağlayan, bağ yapımında ve bağların yıkılmasında görevli olan katalitik aminoasitleri kapsar. Her enzim çeşidinin kendine has yapı, spesifiklik ve kataliz özellikleri birbirinden farklıdır. Aktif bölge ise enzimin toplam hacmine oranla çok küçük bir bölgeyi oluşturur ve substratlar bu bölgeye kovalent bağlara nazaran zayıf bağlarla bağlanmayı tercih eder. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar enzimlerin aktif bölgelerinin sert ve katı bir yapıya sahip olmadığını, tam tersine esnek bir yapıya ve sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu yapıdaki enzimler substratla biraraya geldiklerinde aktif bölge substrata uyum sağlamakta ve etkileşme sonucu induced fit diye açıklanan bir bağlanma modeli oluşmaktadır (Keha and Küfrevioğlu 2005). Bu bağlanma şekli Şekil 2.1'de belirtildiği gibi anahtar kilit uyumuna benzemektedir.



Şekil 2.1 Anahtar kilit modeli (Fisher modeli)

Bazı enzimler kataliz reaksiyonlarında katalizleme görevlerini sadece protein yapılarıyla yerine getirirken, bir kısım enzimler ise kofaktör olarak tanımlanan ve protein dışında başka gruplara da ihtiyaç duyarlar. Bu kofaktörler bir metal iyonu olabileceği gibi, koenzim adıyla gösterilen karmaşık organik yapıda bir bileşik de olabilir. Bazı zamanlar aktiflik için için her ikisine de ihtiyaç duyulabilir. Katalitik olarak aktif olan kofaktör-enzim kompleksi holoenzim olarak tanımlanır. Kofaktörsöz proteine olmayan ise apoenzim ismi verilir. Eğer ki enzim kofaktörüne kovalent olarak bağlanmış olarak sıkı bir şekilde bağlı bulunmakta ve diyalizle ayrıştırılıp uzaklaştırılamayacak kadar sıkı bir şekilde bağlanmış ise bu tür kofaktörlere prostetik grup adı verilir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonların hızlarını, reaksiyona katılan bileşiklerin aktifleşme enerjisini azaltarak artırırlar (Keha and Küfrevioğlu 2005).

Enzimler vücudumuzdaki tüm reaksiyonların ilerlemesini sağlayan bileşiklerdir. Bundan sebepten ötürü bütün metabolik olaylarda bulunması gereken öğelerin başında enzimler gelmektedir (Champe and Harvey 1997).

Enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar, katalizlenmeyen diğer reaksiyonlara göre 1015 ile 1020 kat arası daha hızlı olduğu gözlenmiştir. Yaklaşık olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 arasında substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir (Champe and Harvey 1997).

Belli bir kesim enzimlerin substrat isminin son kısmına ‘-az’ eki getirilerek adlandırılır (örneğin proteinaz) bazılarında ise ilk bulucuların belirttiği isimleri ile tanınırlar (örneğin tripsin). Lakin bu isimlerin birçoğu bu katalitik güce sahip moleküllerin çalışmaları hakkında bilgi eksikliğinden Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır ve kabul edilmiştir. Ayrıca her enzim için dört rakamlı enzim kodları uygun öngörülmüştür (Keha and Küfrevioğlu 2005, Lehninger *et al.* 2005).

Enzimler katalizleme ve reaksiyonlarına ve mekanizma biçimlerine göre şu şekilde sınıflandırılmıştır;

1. Oksidoredüktazlar: 2 substrat arasında redoks tepkimelerini katalizleyen enzim çeşidine verilen genel isimdir.

2. Transferazlar: 2 substrat ortasında hidrojen dışındaki diğer grupların transferlerini katalizleyen enzim çeşidine verilen genel isimdir.

3. Hidrolazlar: Esterler,eterler,peptidler, glikozid, anhidrid, C-halojenür veya P-N bağlarına suyun katılması ile hidrolizini katalizleyen enzim çeşidine verilen genel isimdir.

4. Liyazlar: Hidrolizden ayrı bir katalizleme mekanizması ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu biyoreaksiyonları katalizleyen enzim çeşidine verilen genel isimdir.

5. İzomerazlar: Optik, geometrik, veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülme reaksiyonlarını katalizleyen enzim çeşidine verilen genel isimdir.

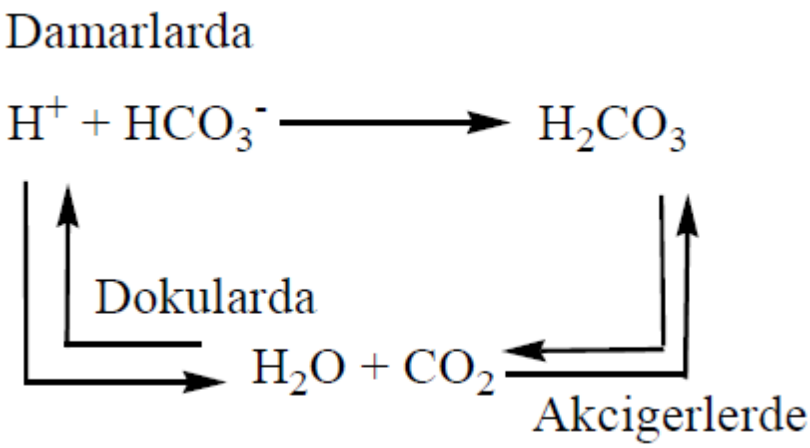
6. Ligazlar: Yüksek enerjili ATP ve GTP gibi fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu açığa çıkan enerjiyi kullanarak iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzim çeşidine verilen genel isimdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

2.1.1 Karbonik anhidraz enzimi

Karbonik anhidraz ilk keşfedilen Zn^{+2} iyonuna sahip bir metalo enzim çeşididir. İlk defa memeli hayvanların eritrositlerinden saflaştırılarak elde edilen karbonik anhidraz enzimi genellikle metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanında, en önemli işlevlerinden biri bir çok dokuda, H^+ ve HCO_3 -ın birikmesinde görev alır. Bu dokulardan bazıları böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini gibi birçok dokuyu örnek olarak verebiliriz. Bunların dışında başka histokimyasal metodlar ile, tükrük bezi, kas, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularda da karbonik anhidraza rastlanmış ve bunlardan birkısmı saflaştırılıp, biyokimyasal özelliklerine bakılmıştır. Karbonik anhidraz enzimine balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böbrek ve bakterilerde kabuklu hayvanların kabuklarının içinde, algler yeşil bitkilerin foto sentetik hücre kloroplastları bu enzimin farklı görevleri de olduğu ispatlanmıştır. Karbonik anhidraz enzimi bahsi geçen canlıların hücrelerinde çoğu zaman stoplazmasında çözünmüş halde, bazende

hücre membranına zayıfça bağlanmış bir şekilde yer almaktadır (Maren 1967, Pocker and Ng 1974).

Eritrosit Karbonik anhidraz enziminin önemi yüksek fonksiyonu ise, doku kılcal damarların içinde, metabolizma ürünü olan CO_2'i H_2CO_3'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3'i CO_2'e dönüştürme reaksiyonu katalizleyip, solunum olayında yer almaktadır. Katalizlenen reaksiyon; Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 CA'nın katalizleme reaksiyonu

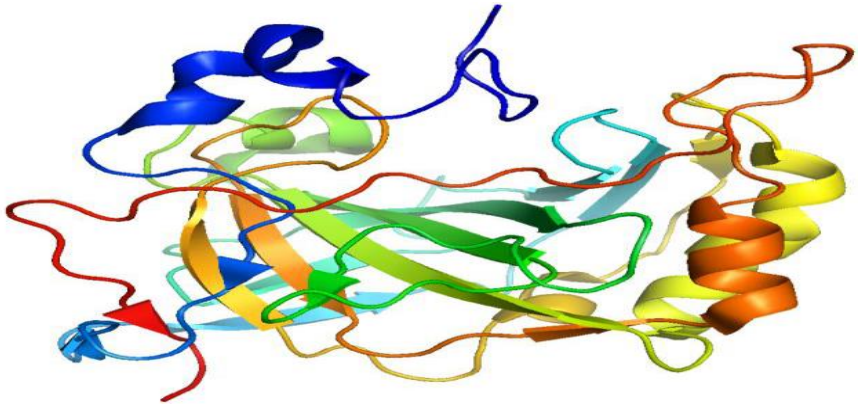
Böbreklerin tübullerindeyse, aynı reaksiyonlar ile, Na^+ ve H_2O geri emilimesi gibi önemli bir emilim olayını gerçekleştirmektedir. Diğer dokularda yine yukarıdaki reaksiyon ile ya CO_2 transferini, yada H^+ iyonu birikimini temin ederek, hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Böylelikle omurgalıların kan ve hücrelerarası sıvısındaki en önemli tampon sistemidir (Carter *et al.* 1982, Dodgson *et al.* 1983, Keha and Küfrevioğlu 2004) .

Genel olarak insandaki Karbonik anhidraz izoenzimlerinin incelenmesi sonucunda ortaya çıkarılmıştır. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri ise insan eritrosit hücrelerinde bulunmuştur. Bu izoenzimlerin en önemli özelliği; doku kılcal damarlarındaki oluşan ve metabolik bir ürün olan CO_2'i H_2CO_3'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3'i CO_2'e dönüşümünü katalizleyerek solunum olayında doğrudan çok önemli bir olayda yer

almasıdır. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi gözlenmemiştir (Sly and Hu 1995, Supuran *et al.* 2003) .

Karbonik anhidrazın üzerinde en çok çalışılan kısım ise karbonik anhidraz II kısmıdır. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 ^{o}C'de 106 s^{-1}olarak bulunmuştur. karbonik anhidraz II'nin doku dağılımı çok geniştir ve birçok farklı organ ve hücre çeşidinde bulunur. Osteoporoz, renal tübüler,asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini gösterir (Lindskog 1997).

Karbonik anhidraz II enzimi, eritrositlerde, trombositlerde, endotel hücrelerinde, beyinde, böbrek tubulus hücrelerinde, gözde processus siliariste, mide mukozasında, karaciğerde, pankreatik kanalda ve spermatozoada gibi birçok yerde bulunur. Safra kesesinin epitelyum hücrelerinde eksprese edilen Karbonik anhidraz II enzimi, bazı hücrelerde asit-baz dengesini ayarlamak için görev alır. Üriner asidifikasyon için H^+ salgılayan renal tubuler ve H^+ salgılayan gastrik parietal hücrelerinde de etkinliği vardır. Karbonik anhidraz II enzimi, pankreas sıvısı için pankreatik kanal hücrelerine HCO_3- sağlar. Anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkan ve dönüşümsüz körlüğe sebep olan glokomda Karbonik anhidraz II enziminin önemli rolü vardır. Öte yandan Karbonik anhidraz II enzimi, eritrositlerde, böbrekte, karaciğerde ve proksimal tubüllerde CO_2 değişimine katkı sağlar (Epstein and Grant 1977). CA-II enziminin 3 boyutlu yapısı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 CA-II enziminin 3 boyutlu yapısı

HCA-II ve HCA-IV izo enzimleri, göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda gibi kısımlarda bulunur. Glokom hastalığının tedavisi için yapılan araştırmalar sonucunda gözdeki HCA-II izoenziminin ne denli önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Glokom hastalığı sonucunda, yüksek göz içi basıncı görülmekte (intraocular pressure, IOP) ve hastalık en sonunda geri dönülemeyen körlüğe sebep olmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Karbonik anhidraz enziminin humor aközün salgılanmasını sağlayan uyarıcı bir etkiye sahiptir. Bu enzimin inhibisyonuyla silyer epitelinin salgı aktivitesi %25–30 oranda azalır (Supuran and Scozzafava 2000).

2.2 *Digitalis Lamarckii*

Digitalis, Scrophulariaceae sınıfına ait bir otsu bitki taksonumunda olup bu grupta yaklaşık olarak 402'a yakın tür bulunmaktadır. *Digitalis* digitabulum (yüksük) kelimesinden türetilmiş, purpurea kan kırmızısı, lanata yünlü anlamına gelir ve ingilizcede isim olarak foxglo ve kullanılmaktadır. *Digitalis'in* türlerinin içinde en önemli olanlar; Kırmızımsı yüksük otu; *Digitalis purpurea* ve Yünlü yüksük otu; *Digitalis lanata*'dır. Her ikisinden de elde edilen kardenolit (kalbe etkili) glikozitleri ilaçların yapımlarında kullanılmaktadır. Daha önce ilk kez M.S 5.yy 'da İrlandalılar tarafından kullanılmış ve William Withering adlı bilim adamı 1785'de *digitalis* bitkisini önce vücut ödeminde sonrada kalp rahatsızlıklarında uygulamış ve diğer araştırmalarda bu çalişmayı takip etmiştir (Wu *et al.* 2012).

*Digitalis purpurea'*nın (Şekil 2.4) asıl vatanı; Batı Avrupa ülkeleri, İngiltere, Fransa, Hollanda, Almanya, Belçika, Güney İsveç, Güney Norveç, Kuzey İspanya, Kuzey Portekiz ve Danimarka gibi ülkelerdir ve birçok ülkede de kültür bitkisi olarak yetiştirilmektedir. Her ikisinden de elde edilen kardenolit (kalbe etkili) glikozitleri ilaç yapımında kullanılmaktadır (Wu *et al.* 2012).



Şekil 2.4 Digitalis purpurea

*D.lanata'*nın ise ülkemizde batı Trakya'dan başlayıp Bulgaristan, Bosna, Arnavutluk, Romanya Güneydoğu Avrupa ülkeleri gibi birçok ülkede de kültür bitkisi olarak elde edilmektedir. Bunlardan üretilen kardenolit (kalbe etkili) glikozitleri ilaçların yapılmasında kullanılmaktadır. Geçmişte ise ilk defa M.S 5.yy 'da İrlandalılar tarafından kullanıldığı ve William Withering 1785'de *digitalis* bitkisini önce vücut ödemine sonrada kalp rahatsızlıklarına karşı uygulamış ve birçok araştırmalarda kullanmıştır (Wu *et al.* 2012).

Digitalis türleri genellikle deniz seviyesinden 1190 m - 1500 m kadar yüksekliklere yaşayabilmektedir. Ülkemizde *Digitalis* cinsine bağlı 8 tür yayılış göstermektedir. Bu türler;

1. *Digitalis cariensis* (İshalotu)*;* Güney-Batı Anadolu bölgesi (Muğla Milas, Konya civarları)
2. *Digitalis davisiana* (Has yüksük otu)*;* Güney Anadolu bölgesi
3. *Digitalis ferruginea* (Arıkovan); Trakya, Kuzey Anadolu bölgesi
4. *Digitalis grandiflora* (Koca yüksük otu); Trakya bölgesi
5. *Digitalis lamarckii* (Yüksük otu); Orta Anadolu bölgesi
6. *Digitalis lanata* (Yünlü yüksük otu); Trakya bölgesi
7. *Digitalis trojana* (Kapıdağı yüksük otu); Kazdağı bölgesi (Balıkesir, Truva bölgesi)

8. *Digitalis viridiflora* (Yeşil yüksük otu); Trakya bölgesi

Bu türler içinde ülkemizde endemik olan dört çeşit vardır endemiklik oranı % 45'e yakındır. bunlar; *Digitalis trojana, Digitalis davisiana, Digitalis cariensis* ve *Digitalis lamarckii* 'dir (Davis 1982). Şekil 2.5 Farklı digitalis türleri gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Farklı digitalis türleri

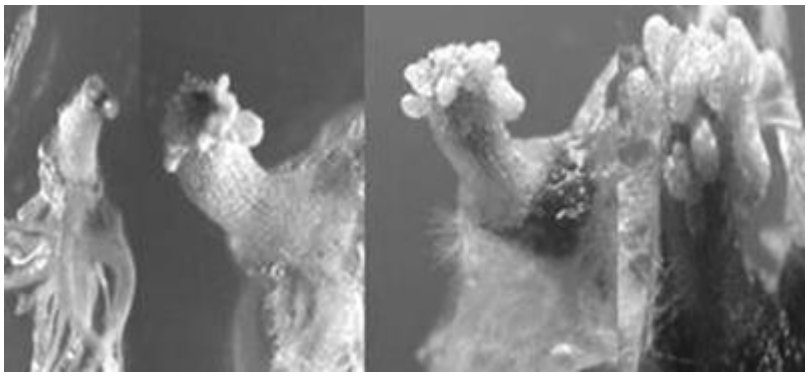
Digitalis türleri iki yada çok yıllık otsu bitkiler olup pembe, mor, kırmızı, sarı veya beyaz renklerde çan şeklindeki çiçekleri, bugüne kadar en yaygın ziyaretçileri olan bombus arıları tarafından tozlaşır. Tohumu ekildiğinde ise ilk sene kalın, rozet, oval şekilde büyüyen yapraklar çıkarır. Yaprakların bazal rozetleri, haziran ayının ortasından temmuz ayının ortasına kadar yaklaşık bir ay boyunca çiçek açan, bir metre yüksekliğinde dikey bir çiçeklenme meydana getirir.

Murashige ve Skoog (MS) (Ekim *et al.* 2000, Murashige T and Skoog F 1962) ortamının farklı güçlerinin *Digitalis lamarckii Ivan'daki* kardiyotonik glikozit birikimi üzerindeki etkileri araştırıldı. *D. lamarckii* ,yaygın olarak cüce yüksükotu olarak bilinir, Türkiye'ye endemik bir tıbbi bitkidir ve Plantaginaceae familyasına aittir. *Dijitalis* türünün tedavi kalp sorunları için kullanılan önemli bir kalbe etkili bileşikler (glikozitler) ihtiva eden iki yılda bir veya çok yıllık otlardır. *D.Lamarckii* Türkiye Bitkileri Kırmızı Veri Kitabında (2) hassas (VU) olarak işaretlenmiştir. %3 sakaroz, 0.5

ppm TDZ ve 0.25 katkılı MS besiyerlerinin farklı kuvvetlerinde 10 gün süreyle kültüre edilen hipokotil eksplantlarından geliştirilen kallustaki beş farklı kardenolidin (digoksigenin, gitoksigenin, lanatosid C, digoksin ve digitoksin) içerikleri. ppm IAA, HPLC ile belirlendi. MS ortamının üç farklı gücü test edildi; çeyrek, yarım ve tam güç. Beş kardenolidden, tüm orta kuvvetlerde kültürlenen kallusta yalnızca lanatosid C saptanabildi. En yüksek lanatosid C konsantrasyonu, yarı-kuvvetli MS ortamında (690 ug/g kuru ağırlık, dw) gözlenirken, kallus, sırasıyla 231 ve 332 ug/g dw lanatoside C üreterek tam ve çeyrek güçlü ortamlarda kültürlendi. Sonuç olarak,*Digitalis* türleri.

Türkiye Florasında *Digitalis* cinsi 9 tür ((Lamond 1978) ile temsil edilmektedir. Araştırmaların çoğu kardenolidlere odaklandığından, fenolikler gibi diğer aktif bileşikler, *Digitalis* ekstraktlarının biyolojik aktivitesindeki rolleri açısından araştırılmamıştır (Çalış I 1999). Bu çalışmada, *D. Ferruginea* L. subsp.'nin sulu ekstraktları üzerinde elde edilen karşılaştırmalı biyolojik genel araştırmalar yapılmıştır.S*chischkinii* (Ivan) Werner ve *D. Lamarckii* Ivan, sitotoksik aktiviteleri temelinde. Sitotoksik aktivite Hep-2 kanser hücre hattı üzerinden MTT yöntemi ile belirlendi (Saracoglu *et al.* 1995). Her iki ekstrenin de konsantrasyona bağlı sitotoksisite gösterdiği bulundu. Ekstresi *D ferruginea* subsp.*schischkinii*,200 µg/mL konsantrasyonda %60,09 yüzdelikle elde edilen gerçek veri olan inhibisyon değeri,*D.*lamarckii'nin inhibisyonu %35,13'tür. Elde edilen ekstresi bir yana *D.Ferruginea* subsp.*schischkinii* daha aktif olduğu tespit edilmiştir,bu biyo-güdümlü paya ayırma için poliamid kolon kromatografisi uygulanmıştır. Poliamid kolonunun ana fraksiyonları, Hep-2 hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteleri için de araştırıldı. Feniletanoid glikozitler açısından zengin fraksiyon,200 µg/mL'de %52 inhibisyon gösteren en aktif olarak bulundu. Aktif fraksiyon üzerindeki fitokimyasal çalışmalar, yedi bileşiğin izolasyonu ile sonuçlanmıştır. İzole edilmiş bileşikler ayrıca IC arasında Hep-2 hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteler göstermiştir.$_{50}$:100 – 150 mg/ml. İzole edilen üç bileşiğin yapıları, kapsamlı NMR teknikleri ile forsythiaside, calceorioside A ve metil caffeoate olarak belirlendi. Diğer biyoaktif bileşikler üzerinde yapı belirleme çalışmaları devam etmektedir.

Digitalis lamarckii (Plantaginaceae), Türkiye florasının endemik bir türüdür. *D.lamarckii*, kardiyak difüzyonu güçlendiren ve kalp ritmini düzenleyen kardiyak glikozitler içerdiğinden tıbbi açıdan önemli bitkilerdir. *D.*lamarckii'nin 21 günlük fidelerinden alınan hipokotil kesitleriindol-3-asetik asidin (IAA) doğrudan somatik embriyogenez üzerindeki etkisini test etmek için kullanıldı. Hipokotil eksplantlarının üst kısmından tüm IAA konsantrasyonları (0.1, 0.5 ve 1mg/l) ile doğrudan somatik embriyogenez elde edilmesine rağmen, 1mg/l IAA ile optimum sonuçlar elde edilmiştir. Çeşitli çalışmalar, oksinin uygun polar taşınmasının, küresel aşamanın ötesinde normal embriyogenez için bir ön koşul olduğunu göstermiştir. Oksin taşıma inhibitörü 2,3,5-triiyodobenzoik asit (TIBA), sonraki aşamalara morfolojik geçişleri bloke eder örneği büyümüş küresel ve dikdörtgen embriyoların oluşumuna neden olurlar. Oksin polar transport inhibitörleri (1-5mg/l TIBA ile 0.1-2mg/l IAA) ile desteklenmiş ortamda gelişen morfolojik olarak anormal embriyolar gözlemledik *D. Lamarckii* mevcut araştırmada, doğrudan somatik embriyoların (Şekil 2.7) toplam kardenolid içeriğinin yanı sıra beş kardenolidin içeriği belirlendi, toplam kardenolit miktarı 380 mg/kg oldu. Küresel evredeki somatik embriyoların yeşile döndüğü ve eş zamanlı olarak *Digiltalis lanata'da* kardiyak glikozitler üretmeye başladığı bildirilmiştir



Şekil 2.8 *D.Lamarckii Ivan'ın* hipokotil eksplantlarından doğrudan somatik embriyolar

Daha önceki çalışmalarda Satureja cuneifolia'nın özleri hakkında çeşitli biyoaktivite çalışmaları araştırılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, Satureja cuneifolia ekstraktlarının hCA I ve hCA II üzerindeki engelleyici özellikleri ilk kez incelenmiştir. (Oke et al. 2009, Taslimi et al. 2020)

Cassia absus L. tohum ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi üzerindeki in vitro aktivitesi (Ahmad *et al.* 2019).

Bu çalışmada, ham etanol özütü ve etanol özünden elde edilen n-bütanol, kloroform, n-heksan ve su fraksiyonları in vitro karbonik anhidraz biyoaktivitesi olarak incelenmiştir. Bu çalışmada, Cassia absus L.'nin etanol özütü, karbonik anhidraz enzimi üzerinde en güçlü inhibitör aktiviteyi (inhibisyon (%): 54,1±0,06; IC50: 1,875 ± 0,0009 mg/mL) göstermiştir.

Başka bir çalışma, beş farklı bitkinin (Alcea rosea, Foeniculum vulgare, Elettaria kakule, Laurus azorica ve Lavandula stoechas) ekstraktlarının hCA I ve II üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Sonuçlara göre, Elettaria cardamomum'un metanol özütü hCA I üzerinde en yüksek inhibitör potansiyeli (0.032 mg/mL) göstermiş ve hCA II için en yüksek inhibisyon (0.067 mg/mL) Lavandula stoechas'ın metanol özünden elde edilmiştir(Kaya *et al.* 2019).

(Akkemik *et al.* 2019), Cucumis melo L. tohum ekstraktlarının hCA I ve II üzerindeki inhibisyon özelliklerini araştırmıştır. Tohumların yağ ve metanol ekstraktları hCA I izoenzim aktivitesini aktive ederken, bu ekstraktlar hCA II izoenzimini de inhibe etmiştir. hCA II üzerindeki yağ ekstraktının IC50 ve Ki değerleri sırasıyla 0,497 ng/mL ve 0,369±0,166 ng/mL olup, metanol ekstraktlarından hCA II için 10,98 µg/mL ve 7,25~0,400 µg/mL elde edilmiştir. .

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Yararlanılan alet ve cihazlar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda aşağıda belirtilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

UV/Vis spectrophotometer	:	Beckman Coulter's DU700 series
Sogutmalı santrifüj	:	Hermle Z 323 K(Germany)
Derin dondurucu	:	Sanyo, Japan
pH-metre	:	Schott pH-Meter CG840
Hassas terazi	:	Gecavery (UK)
Kar makinesi	:	Scotsman AF-20 (Authomatic ice machines)
Otomatik pipetler	:	Eppendorf
Çalkalayıcı	:	Nüve SL 350
Vorteks	:	Fısons whırlı-mixer
Saf su cihazı	:	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	:	Stuart Scientific
UV-Spektrofotometre küveti	:	1 cm^3'lük Kuartz Küvet
Peristaltik pompa	:	ismatec
Elektroforez tankı	:	Bio Rad (dikey)
Güç kaynagı	:	Bio Rad Power Pac 3000

3.1.2 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Enzimin esteraz aktivitesinin ölçülmesinde kullanilan çözeltiler:

1. 0,0500 M Tris-SO4 p:7,40 (Esteraz aktivite ölçümüyle ve diyalizde kullanılmakta olan tampon çözeltisi) : 6,05500 g Tris 950 ml saf su içerisinde çözülerek, 0,1 N H_2SO_4 ile pH'ı 7,4'e kadar titrasyona maruz kaldıktan sonra toplam hacminde destile su ile 1 litreye kadar tamamlanması ile hazırlandı.

2. *p*-nitrofenilasetat çözeltisi: 27,20 mg *p*-nitrofenilasetat alınıp 1 mL asetonun içinde çözüp sonra 49 mL saf suya az az eklenip hazır hale getirildi.

Afinite jelinin hazırlanmasına kullanılan çözeltiler:

1. İlk önce 0,2 M $NaHCO_3$ çözeltisi pH:8,8 (Sepharose-4B matriksi üstüne afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,80 g $NaHCO_3$, 950 mL destile suda çözülerek, 0,1 N NaOH ile pH:8,8'e kadar titrasyon edildikten sonra, toplam hacmi destile su ile 1 litreye kadar tamamlandı.

2. Daha sonra 0,20 M $NaHCO_3$ çözeltisiyle pH:10 (Sepharose-4B matriksi üstünde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,80 g $NaHCO_3$, 950 mL destile suda çözüldükten sonra, 0,1N NaOH ile pH: 10'a titrasyon edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

3. Sülfanilamid çözeltisi (afinite jeli hazırlandığında kullanılan çözelti): 25 mg sülfanilamid 0ºC civarında 10 mL 1M HCl içinde çözüldükten sonra 75 mg $NaNO_2$ ihtiva eden 0 ºC'daki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla eklenerek hazır hale getirildi.

Enzimin saflaştırılma aşamasında kullanılan çözeltiler:

1. 25 mM Tris-HCl/0,10 M Na_2SO_4 çözeltisi pH:8,7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na_2SO_4, 950 mL destile suda çözülerek 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye titre edildi. Daha sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na_2SO_4 çözeltisi pH:8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na_2SO_4, 950 mL destile suda çözüldü. 0,1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Na_2HPO_4 /1 M NaCl çözeltisi pH:6,3 (kolona tutunmuş HCA-I izoenzimininelüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na_2HPO_4 ve 14,625 g NaCl alınıp, pH 6,3'e ayarlandıktan sonra hacim 250 mL'ye saf su ile tamamlandı.

4. 0,10 M CH_3COONa/0,50 M $NaClO_4$ çözeltisi pH:5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g $NaClO_4$ ve 2,040 g $CH_3COONa.3H_2O$, 120 mL destile su içerisinde çözüldü. 0,1 N HCl ile pH'sı 5,60 ayarlandıktan sonra hacim destile su kullanılarak 0,150 L'ye tamamlandı.

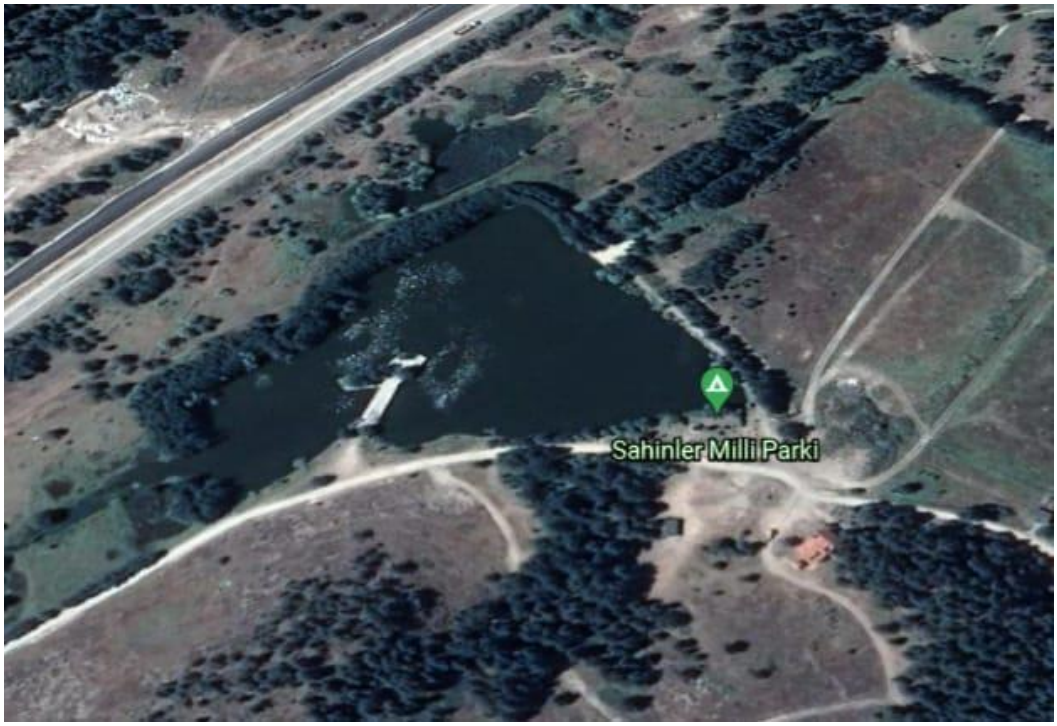
3.2 Yöntemler

3.2.1 Docking çalışmaları

İlk önce moleküllerin 3 boyutlu yapılarını PubChemden indirdik.Daha sonra 3HS4 kodlu kristal yapıyı PDB den indirdik ve Molegro Virtual Docker programına ekledik. Daha sonra 3 boyutlu 20 ligantı Molegro Virtual Docker programında doking bölgesine ekledik. Doking bölgeyi ayarladıktan sonra herbirine 10 tekrarlı doking yaptık. Doking etkileşim sonucunu Discovery Stüdio 2021 Client programında inceledik.

3.2.2 Ekstraksiyon

Tezimde kullanılan olan bitkimiz (*Digitalis lamarckii Ivan.*) İst.1, Kızılcahamam-Gerede yolu 28. km Şahinler göleti yakınında yolun sağında, 1470m doğal yaşam ortamından (Şekil 3.1) yeni birçok farklı açılardan görüntülenmekte olan farklı resimler Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5 teki gibi yerlerde toplanıp birçok açıdan görüntülenmekte olan farklı örnekleri Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olan Dr. Mesrur Ümid BİNGÖL tarafından teşhisi yapılmış ve. teşhis çalışmasında başta "Flora of Turkey" adlı 11 ciltlik eser olmak üzere ilgili birçok literatür çalışmalarından faydalanılmıştır.



Şekil 3.2 Digitalis lamarckii Ivan.toplanma bölgesi İst.1, Kızılcahamam Şahinler Milli parkı, 1469m Kızılcahamam /ANKARA



Şekil 3.3 Yüksük otunun farklı açıdan görünüşü



Şekil 3.4 Yüksük otunun farklı açıdan görünüşü



Şekil 3.5 Yüksük otunun farklı açıdan görünüşü



Şekil 3.6 Digitalis lamackii Ivan bitkisinin toplanma bölgesinde çekilmiş fotoğrafları

Toplanılan laboratuvara getirilen bitkiler kök, yaprak, çiçek ve gövdesi güzelce biribirinden iyice ayıklanıp daha sonra ayıklanma işlemi tamamlandıktan sonra uygun şartlarda Şekil 3.7 görüldüğü şekilde kurutulmuş ve çalışmaya hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.8 Digitalis Lamarckii Ivan bitkisinin kurutulmuş ve bölümlerine ayrılmış halleri

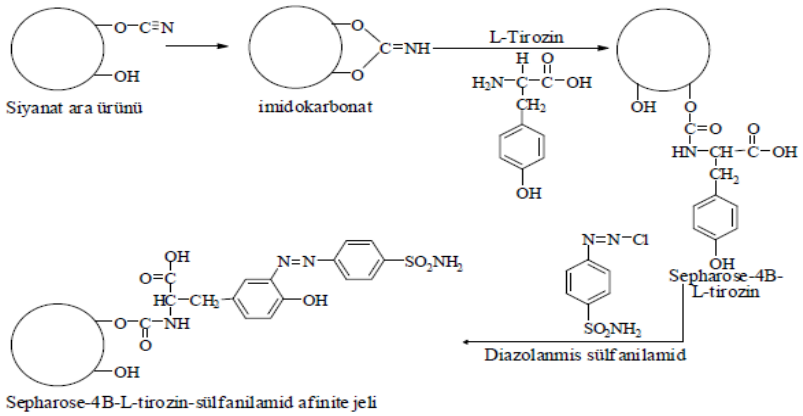
Kuruttuğumuz bölümleri sıvı azotla ayrıştırdık ve sırası ile hekzan, aseton, metanol, kloroform ve kaynatma ekstreler sıra ile hazırlandı. Öncelikli olarak, örnekler 1250 ml hekzan ile 2 gün işlem görüldü. **Şekil 3.7'** deki gibi hekzan alınıp evoparatör yardımı ile uzaklaştırıldı ve ekstreler alındı. Bu işlem 3 kez tekrarladık. Bu işlemin aynısını işlem diğer çözücüler ile tekrarladık. Su ile kaynatmadan sonra sulu fazdaki aktif maddelerin etil asetata geçmesi için ayırma işlemi yapıldı.



Şekil 3.9 Ekstraksiyon sonrası çözeltiler

Afinite jelinin hazırlanması

Yaptığımız deney için kullanacağımız bu jel, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksine tutturularak hazırlanmaya başlandı. Daha sonra bu kolonun materyaline L-tirozin kovalent olarak takılmaya başlandı. Daha sonra ise sülfanilamid ise diazollanacak şekilde irozine kenetlendi. Burada yapılan çalışma tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, ise karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek bir oranda saflaştırılmak amacı ile kullanıldı. Afinite jeli Şekil 3.8 reaksiyonuna göre hazırlandı.



Şekil 3.10 Afinite jeli hazırlanırken oluşan reaksiyonlar

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması

CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B, 320 mL soğuk 0,1 M NaHCO3 tamponu (pH:10) ile güzelce yıkanıp beher glasa transfer edildi. Aynı tampondan 20 mL alınarak 80 mg tirozinin çözündüğü soğuk çözelti beher glasa ilave edilip karıştırılmaya başladı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 sn den az bir sürede tamamlandığı gözlendi ve sonraki süreçde süspansiyon, 4 ^{o}C'de ve 2 saat süre ile manyetik bir karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat boyunca 4 ^{o}C'de bekletildi. Daha sonra yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar saf su ile iyice yıkandı. Böylece jele tutunmayan tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 0,100

L, 0,2 M $NaHCO_3$ tamponu ile (pH:8,8) tekrar yapılarak tirozin takılı jel, 40 mL'lik tampona aktarıldı.

Sülfanilamid kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0 ^oC civarı bir ortamda 10 mL 1M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg $NaNO_2$ bulunan 0^oC'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla eklenmeye başlandı. 10 dakika reaksiyon tepkimelerinden sonra diazolanmış bir şekilde bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. 1M NaOH ile pH 9,5'a çıkarılıp sabit tutularak 180 dakika süreyle normal oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Devamında 1L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO4 (pH:7,4) tamponu kullanılarak iyice yıkandı. Daha sonra üzerine 100 mL aynı tampondan eklenerek saklandı.

Kolonunun hazırlanması

Hazırlanmış olan jel dengeleme tamponuna (Tris-HCl, pH:7,8) eklenerek jel süspanse edilip ve su trompu kullanılıp vakum ile süspansiyon içindeki hava kabaracıkları alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona la kapatılıp paket haline getirildi. Jel çökmesini takiben bir peristaltik bir pompa yardımıyla dengeleme ve yıkama tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmesi elüat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının ve pH'larının eşitlenmesi ile test takip edildi.

Enzim saflaştırma çalışmaları

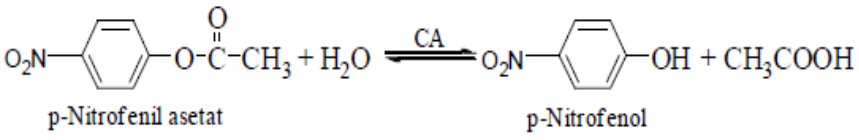
Hemolizatın hazırlanması: Alınmış olan taze kan santrifüj tüplerinin içine doldurularak 15 dakika boyunca +4ºC'de 2500xg'de santrifüj işlemine muamele edildi. Santrifüjden çıkmış tüplerin üstünde kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatlice alındıktan sonra tüplerin alt kısmında kalan eritrosit peletide 0,1540 M NaCl çözeltisiyle (izotonik) üç kez yıkandı. Her defasında +4ºC'de 2500xg'de 13-16 dakika arası santrifüj edildikten sonra üst bölümde kalan kısım damlalık ile uzaklaştırıldı.

Elimizde kalan eritrositler hacimlerinin yaklaşık olarak 4-5 katı kadar buzlu destile suyla karıştırılıp hemoliz yapıldı. Hemolizatın içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4^{o}C'de 20.000xg'de yaklaşık olarak 30 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan bölümdeki hemolizat damlalık ile yavaşça ve dikkat edilerek alındı, sonraki çalışmalarda kullanmak için +4^{o}C'de muhafaza edildi.

Afinitenin kolonuna örneğin tatbiki ve elüsyonu: Katı Tris ile pH'ı 8,70'ye ayarlı olan hemolizat kolona uygulandı ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na2SO4 (pH:8,7) çözeltisiyle güzelce yıkandı. Böylelikle Karbonik anhidraz enzimimiz kolona tutunmuş bir şekilde ve diğer safsızlıklar ise ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra 1 M NaCl/25 mM Na_2HPO_4 (pH:6,3) tamponu kullanılarak hCA-I enzimi daha sonra 0,1 M $NaCH_3COO$/0,5 M $NaClO_4$ (pH:5,6) çözeltisi kullanılarak hCA-II enzimiyle elüe edildi. Elüatlar 1,5'er mL olacak şekilde tüplere konuldu ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Bu aşamalar sırasında peristaltik pompa yardımıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı.

3.3 Enzim Aktivitesi Tayini

Esteraz aktivitesi: Bu yöntemle, karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitisine sahip olması üsülüne dayanır. Bu metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorbsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.9 de verildiği gibidir.



Şekil 3.11 p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat'ın her ikisi aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir

(Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte *et al.* 1967). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. 96'lık plateler ile ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddeler ortama katılım sırasına göre ise Çizelge 3.1'deki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.1 Maddelerin ortalama katılım miktarları

Kullanılan Maddeler	Kullanılan hacim (µL)
Tris-SO_4 (0,05M, Ph:7.4)	100
p-Nitrofenol asetat	100
Saf su	90
Enzim çözeltisi	10
Toplam hacim	300

Kullanılan maddeler ve miktarları: Tablodaki maddeler ile karışım hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okunmaya başlandı ve 3 dakika sonundaki 25 ^{o}C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı ölçüldü. Aktivite ölçümleri esnasında enzim dışında tüm reaktanatların katıldığı kuyucuklar blank olarak kullanıldı.

Deneysel çalışmalarda kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, her gün taze olarak hazırlandı; 27,2 mg substrat, 1mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş bir şekilde ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişik çözeltiyi hazırlamak, p-Nitrofenilasetatın sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967).

3.4 HCA-II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Yüksük Otu Ekstrelerinin Etkilerinin Belirlenmesi

Yapılan bu çalışmamızda yüksük otunun kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinden elde edilen farklı ektrelerin, insan kanından saflaştırılan Karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine olan etkisi *in vitro* olarak araştırıldı. Ölçümlerde esteraz aktivitelerinin ikisi kullanılarak yapıldı. Enzimler üzerine inhibisyon etkisi gösteren ekstereler için IC_{50} ve ayrı ayrı hesaplandı. Bu amaç ile öncelikle en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda hem hidrataz hem de esteraz aktivite ölçüm yöntemleriyle enzim aktivitesine bakıldı. Daha sonra elde edilen veriler kullanılarak %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizilerek bu grafiklerden inhibisyon gösteren eksreler için aktiviteyi yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1 Enzim Çalışmaları

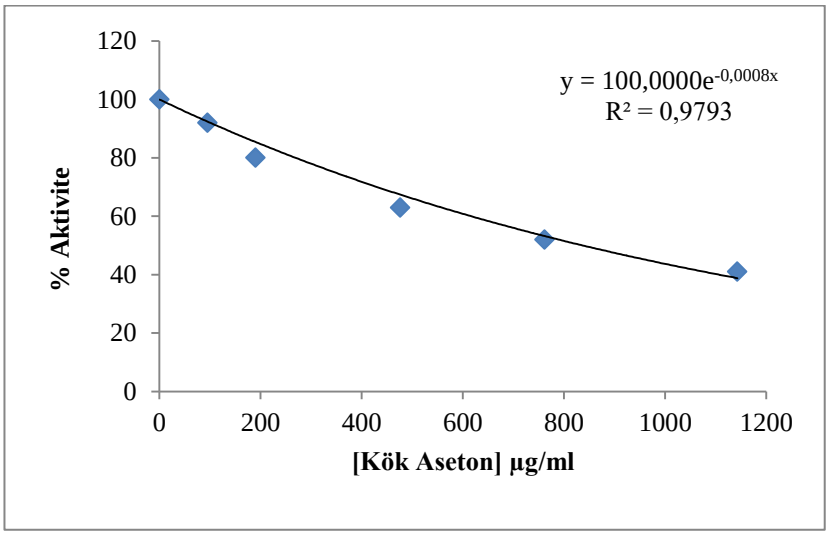
Yapılan çalışmada *Digitalis Lamarckii* Ivanina (yüksük otu) bitkisinin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımlarının sulu ekstreleri hazırlandı. Bu ekstrelerin Karbonik anhidraz enzimi üzerinde aktivitesine bakıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1' de verildi.

Çizelge 4.1 Bitkinin sulu ekstrelerinin karbonik anhidraz enzimi üzerindeki etkileri

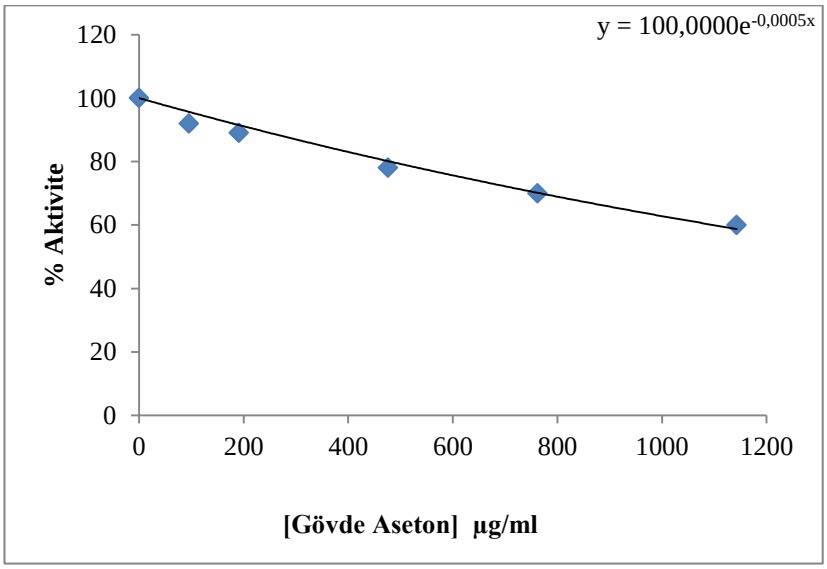
No	Bitkinin kısmı ve ektstre	IC_{50} değeri (µg/mL)
1.	D.lamarckii Kök Aseton	866
2.	D.lamarckii Gövde Aseton	138
3.	D.lamarckii Yaprak Aseton	693
4.	D.lamarckii Çiçek Aseton	693
5.	D.lamarckii Kök Metanol	990
6.	D.lamarckii Gövde Metanol	231
7.	D.lamarckii Yaprak Metanol	1732
8.	D.lamarckii Çiçek Metanol	-
9.	D.lamarckii Kök $CHCl_3$	693
10.	D.lamarckii Gövde $CHCl_3$	577
11.	D.lamarckii Yaprak $CHCl_3$	787
12.	D.lamarckii Çiçek $CHCl_3$	-
13.	D.lamarckii Kök Hekzan	99
14.	D.lamarckii Gövde Hekzan	192
15.	D.lamarckii Yaprak Hekzan	-
16.	D.lamarckii Çiçek Hekzan	231
17.	D.lamarckii Kök Kaynatma	231
18.	D.lamarckii Gövde Kaynatma	203
19.	D.lamarckii Yaprak Kaynatma	188
20.	D.lamarckii Çiçek Kaynatma	203

Ekstrelerin hepsi enzim üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. İnhibisyon etkisi Aktivite %-[Ekstrelerin µg/mL] grafiklerinden elde edilen eğim değerlerinden hesaplanmıştır. Aseton (Şekil 4.1-4.4) , metanol (Şekil 4.5-4.8) , kloroform (şekil 4.9-4.12) , hekzan (Şekil 4.13-4.16) ve kaynatma (Şekil 4.17-4.20) ekstrelerinin inhibisyon grafikleri sunulmuştur.Bütün ekstraktlar enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi

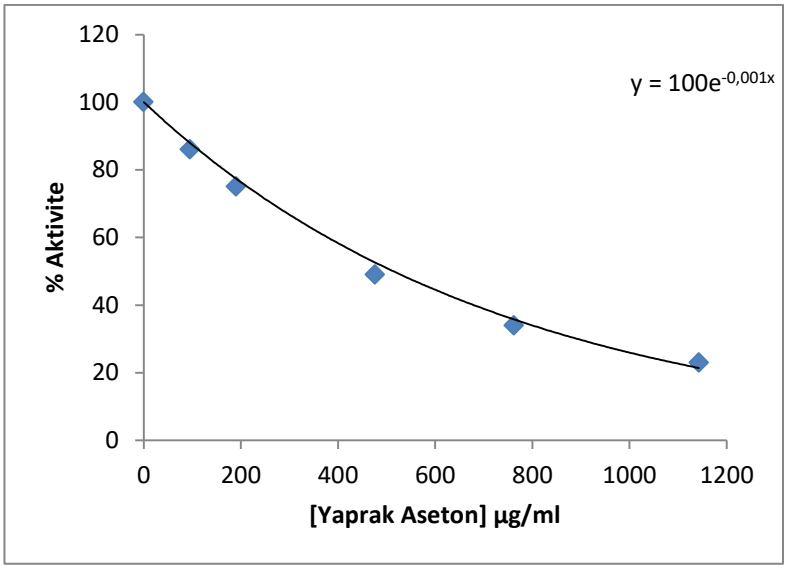
gösterdiği tespit edilmiş olup en düşük IC_{50} değeri yaprak ve kök metanol ekstratlarında gözlenmiştir. En iyi inhibisyon kök hekzan ve gövde aseton ektrelerinde gözlenmiş olup IC_{50} değerleri sırasıyla 99 ve 138 µg/mL olarak tesbit edilmiştir.



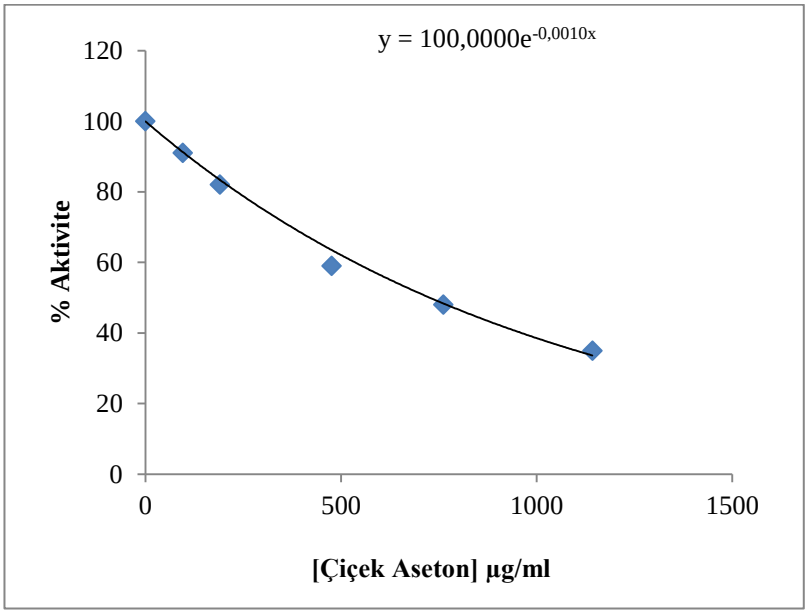
Şekil 4.1 *D.lamarckii* kök aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



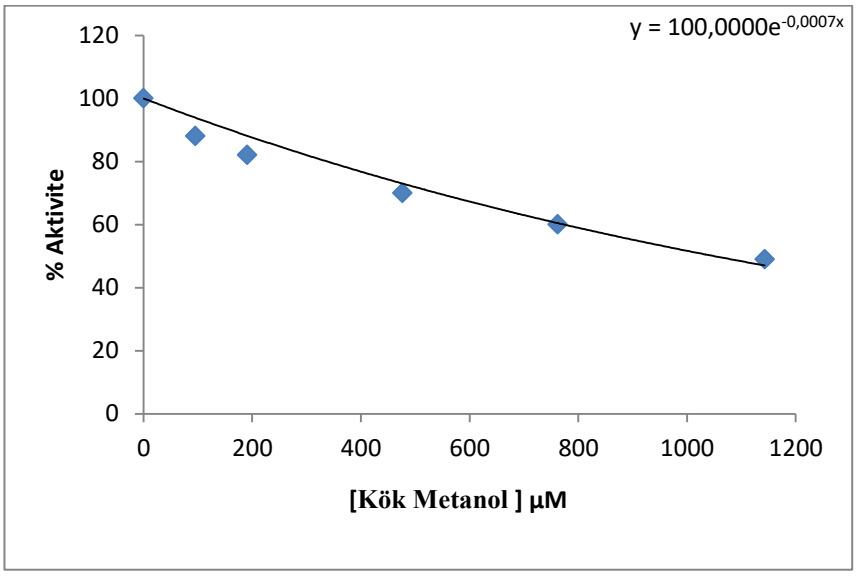
Şekil 4.2 *D.lamarckii* gövde aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



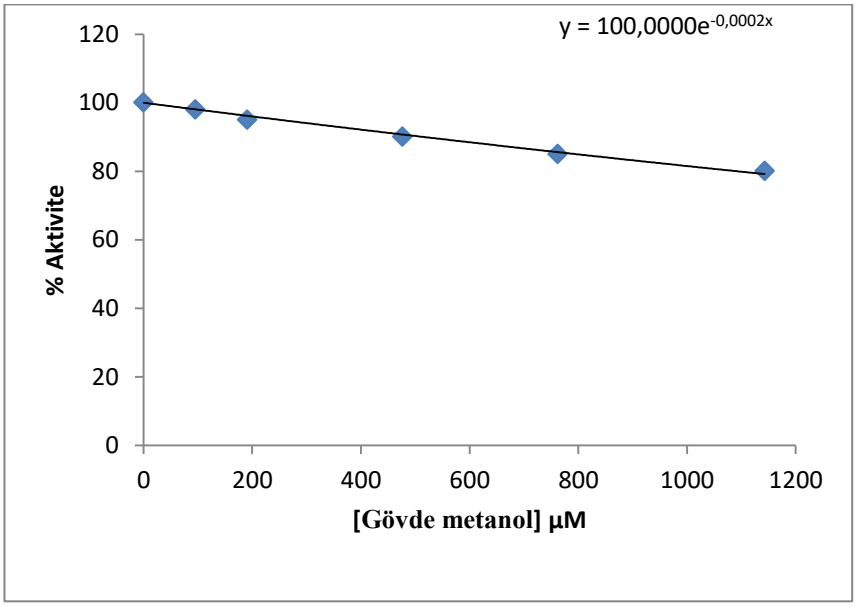
Şekil 4.3 *D.lamarckii* yaprak aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



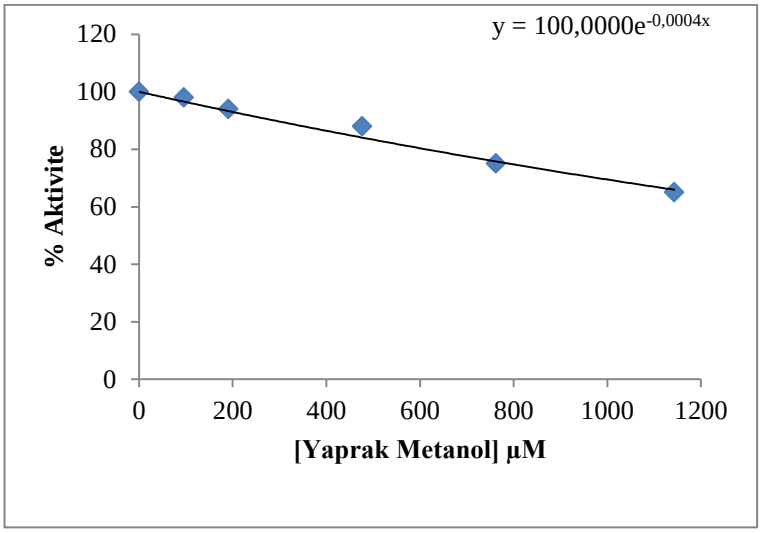
Şekil 4.4 *D.lamarckii* çiçek aseton ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



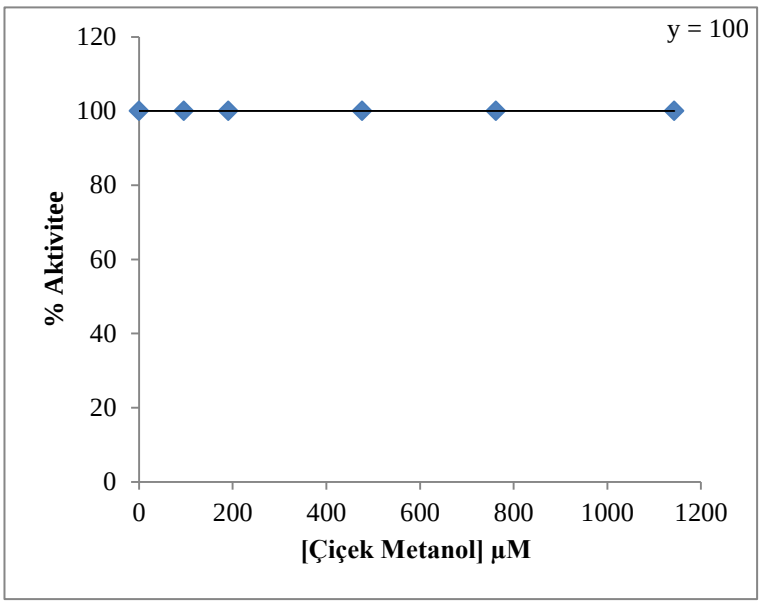
Şekil 4.5 *D.lamarckii* kök metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



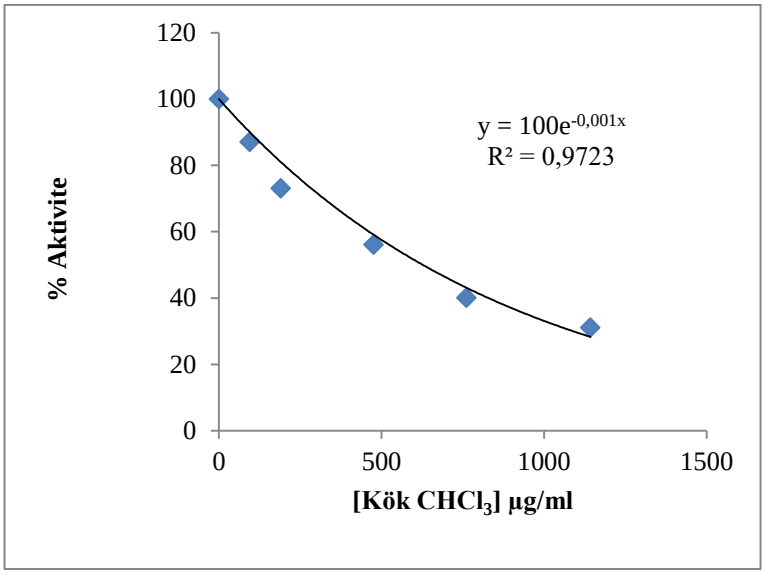
Şekil 4.6 *D.lamarckii* gövde metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



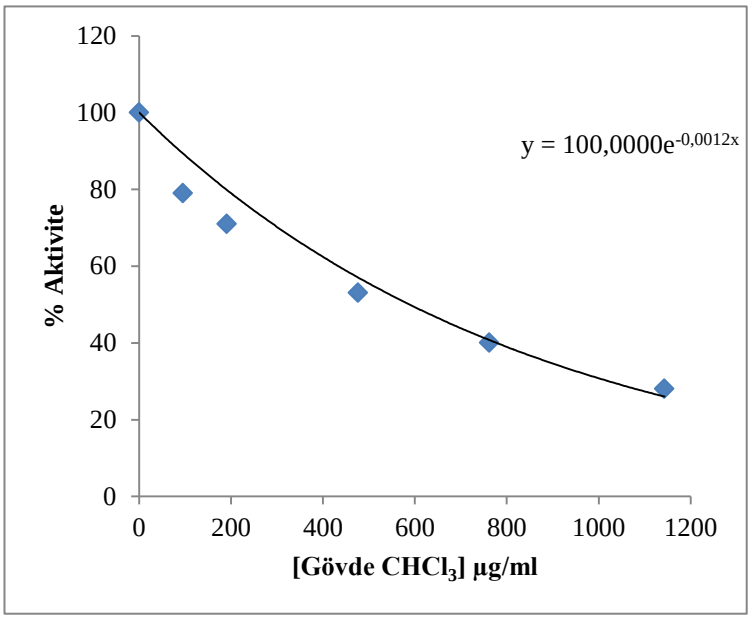
Şekil 4.7 *D.lamarckii* yaprak metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



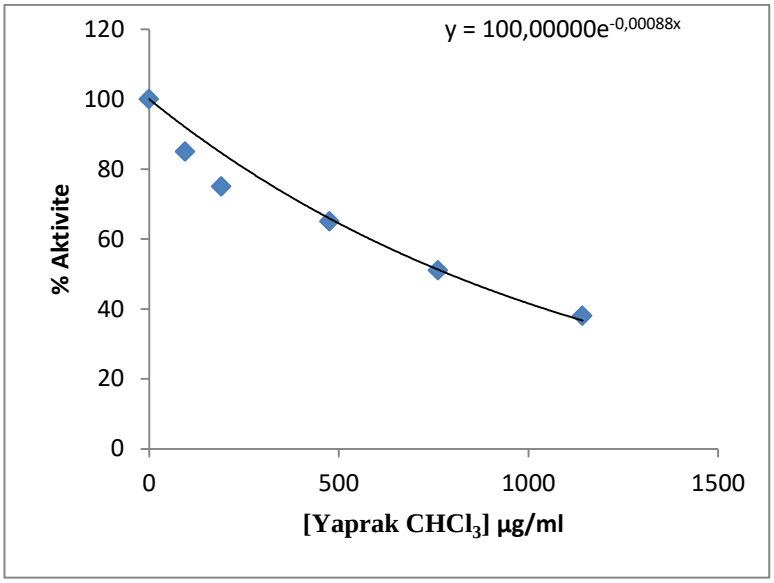
Şekil 4.8 *D.lamarckii* çiçek metanol ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



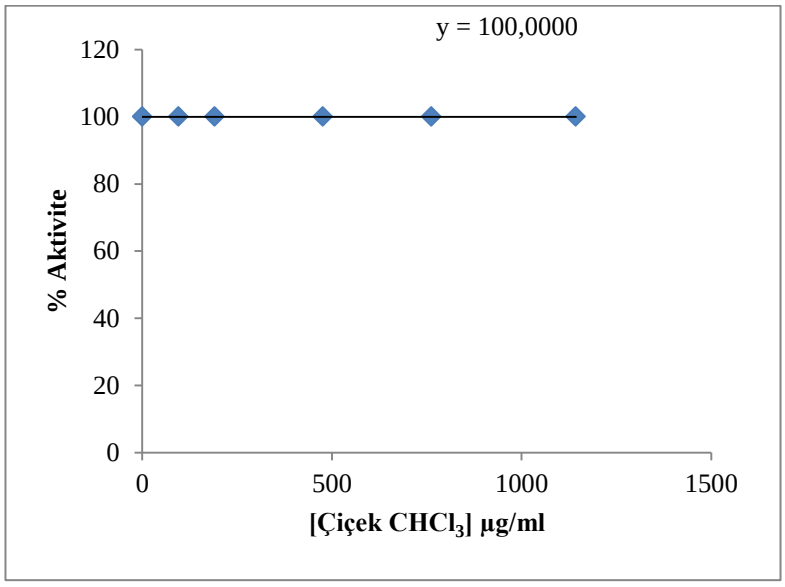
Şekil 4.9 *D.lamarckii* kök $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



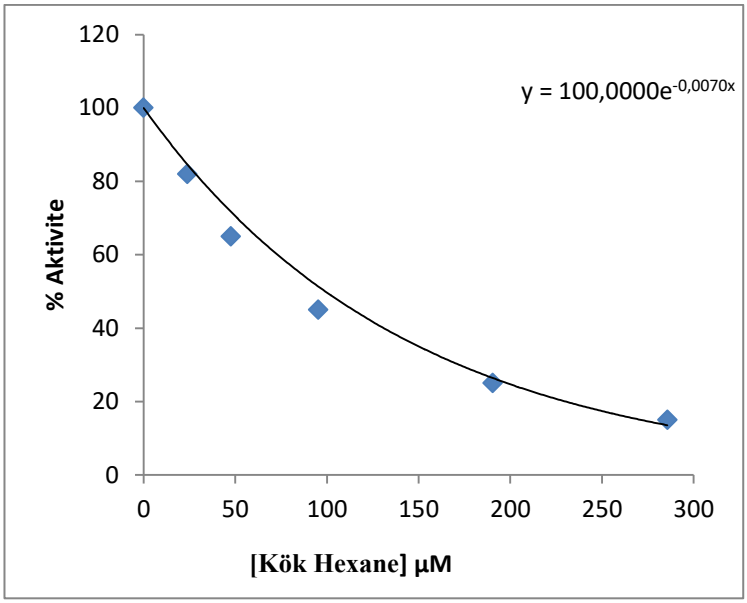
Şekil 4.10 *D.lamarckii* gövde $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



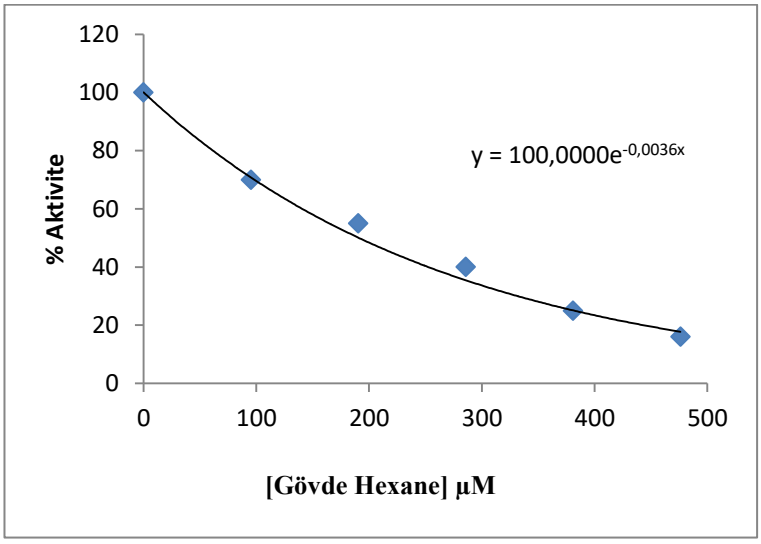
Şekil 4.11 *D.lamarckii* yaprak $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



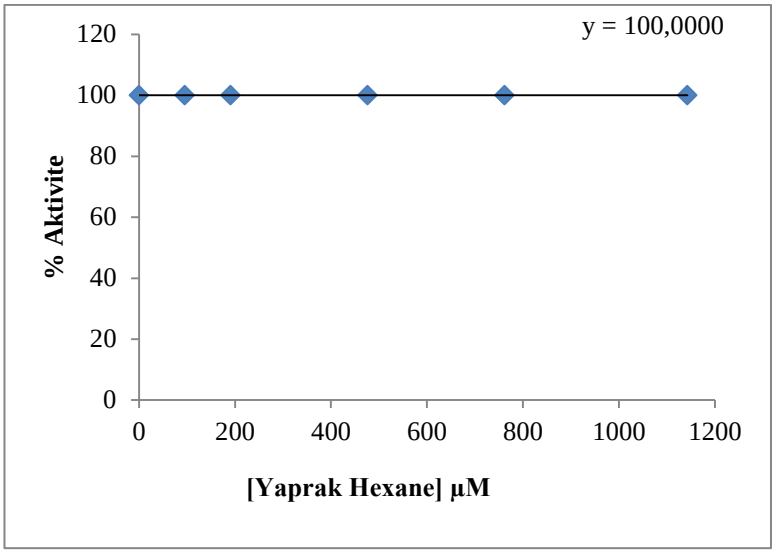
Şekil 4.12 *D.lamarckii* çiçek $CHCl_3$ ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



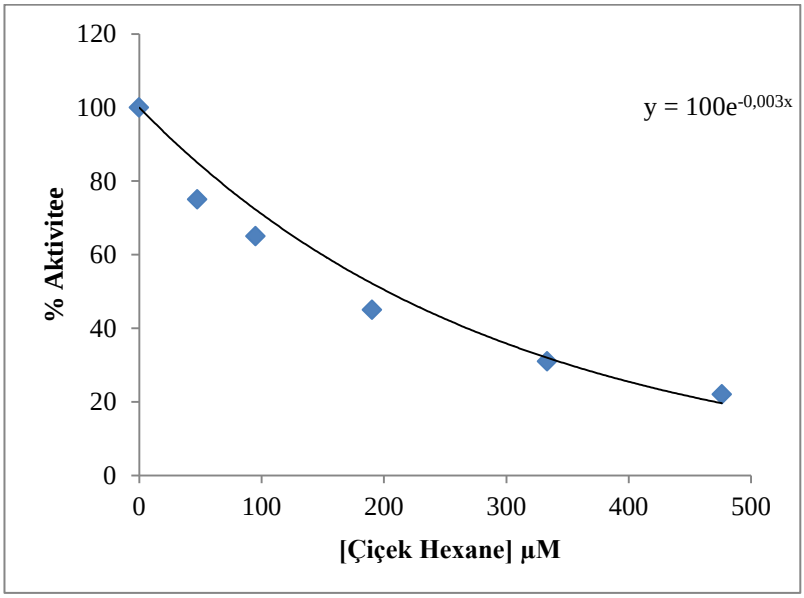
Şekil 4.13 *D.lamarckii* kök hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



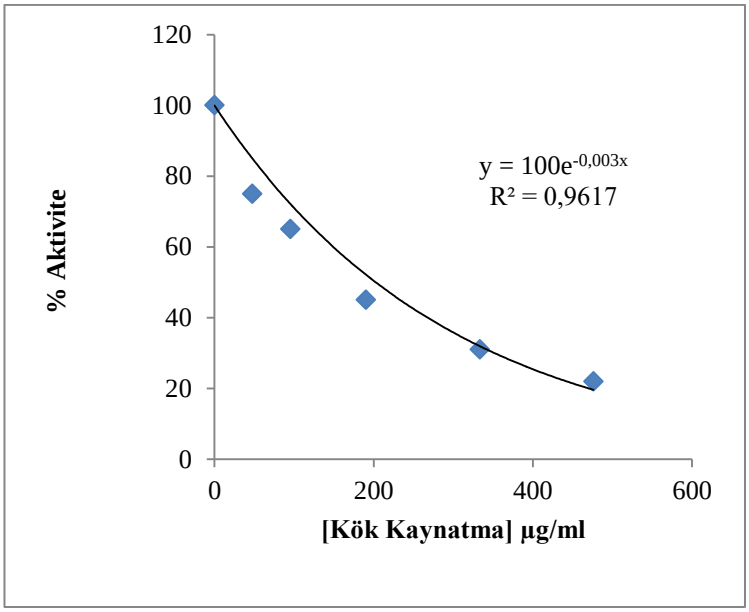
Şekil 4.14 *D.lamarckii* gövde hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



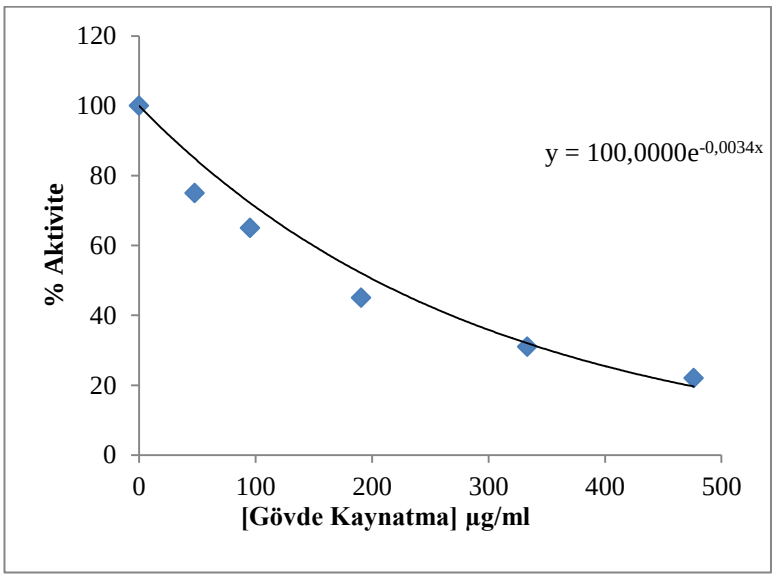
Şekil 4.15 *D.lamarckii* yaprak hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



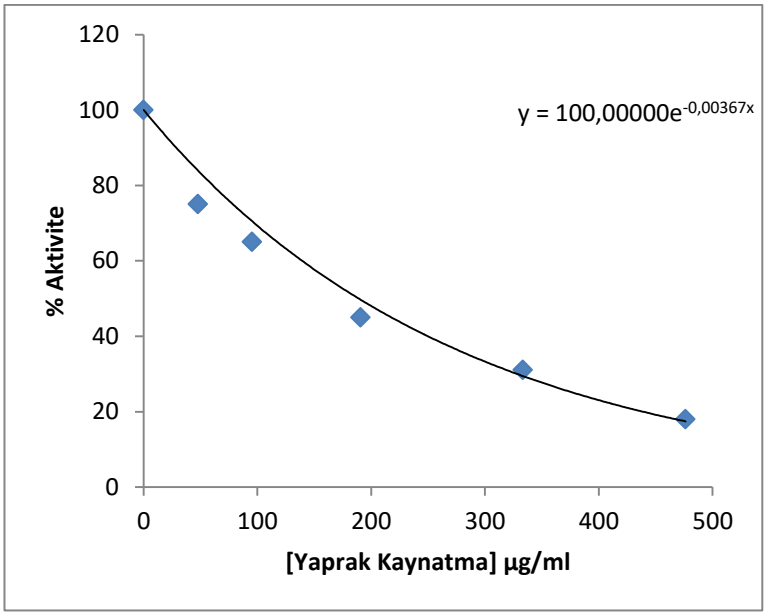
Şekil 4.16 *D.lamarckii* çiçek hexane ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



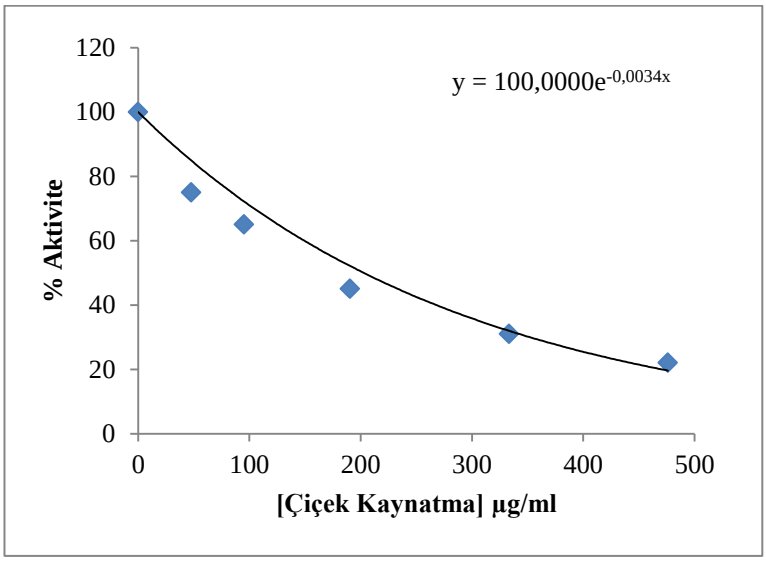
Şekil 4.17 *D.lamarckii* kök kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



Şekil 4.18 *D.lamarckii* gövde kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



Şekil 4.19 *D.lamarckii* yaprak kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi



Şekil 4.20 *D.lamarckii* çiçek kaynatma ekstresinin karbonik anhidraz II enzimi üzerindeki etkisi

4.2 HPLC Sonuçları

Yapılan çalışmada Digitalis lamarkii ivanina(yüksekotu)'nın bitkisinin çeşitli ekstrelerindeki fenolik içerikler incelendi.En yüksek fenolik miktar , Digitalis lamarckii çiçek kaynatma, Digitalis lamarckii çiçek kloroform, Digitalis lamarckii gövde kaynatma, Digitalis lamarckii gövde kloroform, Digitalis lamarckii kök kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak kloroformda gallik asitte rastlandı. Digitalis lamarckii çiçek kaynatma, Digitalis lamarckii gövde kaynatma,Digitalis lamarckii yaprak kaynatma da rutine rastlanmıştır. Digitalis lamarckii çiçek kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak kaynatma Digitalis lamarckii yaprak metanolde Neohesperedine rastlanmıştır. Digitalis lamarckii çiçek aseton, Digitalis lamarckii gövde kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak aseton da Kuarsetine rastlanmıştır. Digitalis lamarckii çiçek kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak kaynatma, Digitalis lamarckii yaprak kloroform da Hesperidine rastlanmıştır. (Çizelge 4.2)

Hplc sistemi: Agilent 1260 DAD dedektörlü HPLC
Kolon: ACE GENERİX5 C18 (4.6×250mm) 5µm
Dalga boyu: 300/200 nm Ref:500/100nm
Enjeksiyon ((µL): 10
Fırın (kolon) sıcaklığı (°C): 20
Mobil faz: A:%83 (%0,1 fosforik asit suda) B:%17 (%100ACN)
Zaman: 1mL/min
HPLC sonuçları verilen şartlar altında elde edilmiştir

Çizelge 4.3 HPLC sonuçları (nd:tesbit edilemedi, Ç: Çiçek, G:Gövde, K:Kök, Y:Yaprak)

STANDART MADDELER	ÇASETON	ÇHEXANE	ÇKAYNATMA	ÇKLOROFORM	ÇMETANOL	GASETON	GKAYNATMA	GKLOROFORM	GMETANOL	KASETON	KHEXANE	KKAYNATMA	KKLOROFORM	KMETANOL	YKAYNATMA	YASETON	YKOROFORM	ÇHEXANE	YMETANOL
Askorbik asit	1,16	nd	0,06	0,04	2,69	4,02	0,16	0,04	2,63	4,44	nd	0,34	nd	5,51	0,14	1,32	nd	nd	2,20
Gallik asit	2,30	2,26	30,93	32,55	3,54	8,50	27,21	26,28	4,83	9,75	0,23	32,36	34,69	3,92	31,40	2,33	35,92	2,26	4,51
Protokatekuik asit	0,68	0,06	0,90	nd	2,80	1,63	1,20	0,03	1,84	7,70	0,03	1,24	nd	11,41	0,65	0,49	nd	0,06	1,77
Kateşin	0,75	nd	1,47	nd	0,72	0,43	1,26	nd	0,43	0,87	nd	1,14	nd	2,26	0,99	0,50	nd	nd	0,61
Hidroksibenzoik asit	nd	0,07	nd	nd	1,53	1,30	nd	0,13	0,85	5,61	nd	2,85	0,09	3,21	1,37	nd	nd	0,07	1,49
Vanilik asit	0,65	0,07	6,30	nd	0,08	0,15	5,03	nd	0,06	0,74	nd	13,47	nd	0,31	5,33	0,32	nd	0,67	0,15
Gentisik asit	nd	nd	nd	0,43	nd	nd	nd	0,30	nd	nd	nd	nd	0,42	nd	nd	nd	nd	nd	nd
para-kumarik asit	nd	0,14	0,28	0,07	nd	nd	0,57	0,09	nd	nd	nd	0,60	0,15	nd	0,69	nd	0,06	0,01	nd
Rutin	4,30	nd	35,70	nd	0,33	1,36	6,31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10,99	nd	nd	nd	0,19
erulik asit	0,10	nd	nd	1,20	0,11	nd	0,45	nd	nd	nd	0,76	nd	nd	nd	0,62	nd	0,89	nd	nd
Naringinin	nd	nd	0,62	nd	nd	0,32	nd	0,10	0,11	2,03	nd	0,72	0,17	1,47	nd	nd	nd	nd	0,04
orto-kumarik asit	nd	nd	1,08	nd	0,06	0,05	0,50	nd	0,07	nd	nd	0,34	nd	nd	0,07	0,02	nd	nd	nd
Neohesperidin	2,91	nd	10,74	0,18	2,86	1,31	23,38	0,05	2,92	0,27	nd	0,50	nd	nd	18,77	1,68	0,25	nd	10,37
Kumarin	1,72	0,13	1,06	1,41	1,16	0,13	1,96	0,36	0,73	0,27	nd	0,49	0,19	0,10	0,09	0,62	0,17	0,01	2,14
Resveratrol	0,14	nd	0,31	0,03	nd	0,15	0,65	0,02	0,08	0,06	nd	0,40	0,04	0,05	0,60	0,03	nd	nd	0,08
Kuersetin	13,06	0,06	6,56	0,20	0,13	2,48	9,94	0,23	0,75	0,26	nd	1,25	0,09	0,06	17,55	9,92	0,51	0,06	2,64
trans-sinamik asit	0,05	0,02	17,06	0,15	1,06	0,25	0,11	0,13	0,05	0,05	nd	0,04	0,03	0,14	0,74	0,09	0,44	0,02	0,03
Hesperidin	0,24	0,38	16,03	5,42	nd	3,41	6,86	3,25	0,74	0,67	0,10	1,29	0,51	nd	15,52	9,11	12,48	0,38	2,41
Alizarin	0,45	0,23	0,29	0,23	nd	0,15	4,30	0,93	0,05	0,59	nd	4,96	1,41	0,12	0,81	2,68	0,31	0,23	nd
Flavon	0,09	2,76	1,19	nd	nd	nd	0,50	nd	nd	0,71	2,29	2,26	2,61	0,06	0,14	0,37	0,08	2,76	nd

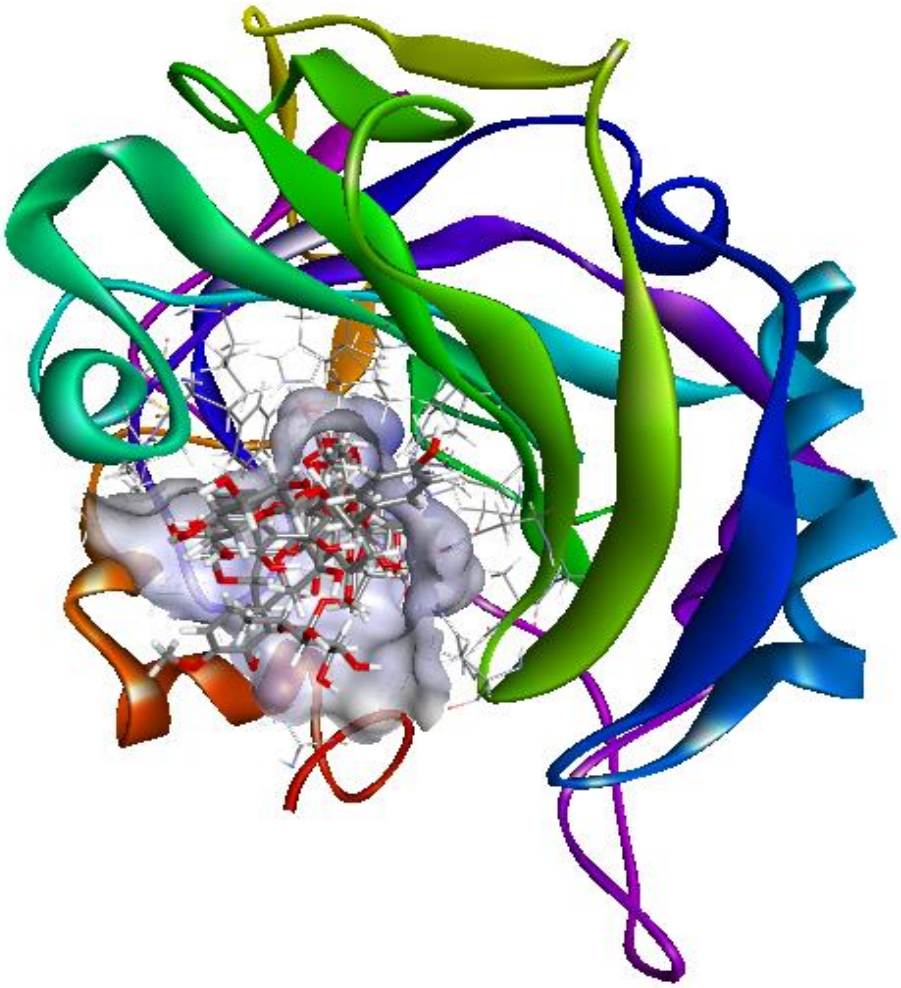
4.3 Moleküler Docking Sonuçları

Ektrelerde bulunan bileşiklerin Kar anh enzimini etkileme potansiyelleri Docking programı ile araştırşdı. Araştırma sonucu en yüksek MolDock Score'u veren dört madde Rutine, Naringin, Neohesperidin ve Hesperidin'in sonuçları gösterilmiştir. (Çizelge 4.4)

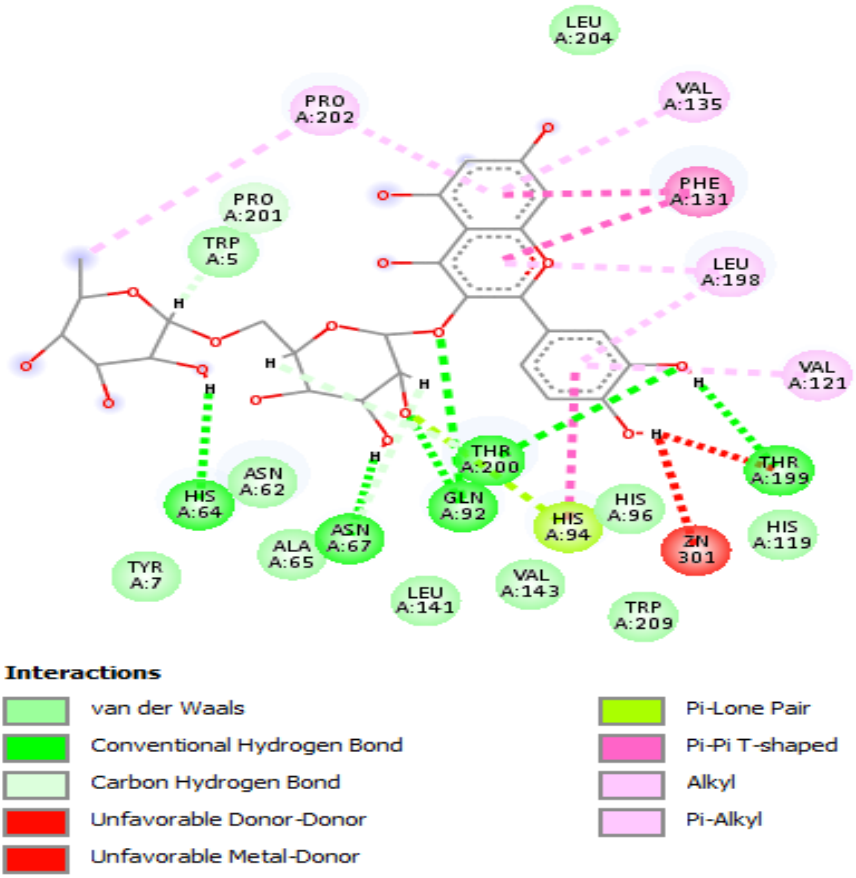
Çizelge 4.5 Moleküler docking sonuçları

Name	PubChem CID	MolDock Score	Rerank Score	HBond
Rutine	5280805	-145,639	-115,216	-13,2727
Naringin	442428	-139,68	-91,0009	-17,4964
Neohesperidin	442439	-137,049	-96,8903	-20,514
Hesperidin	10621	-131,356	-103,726	-10,7398
Ferulic acid	445858	-109,781	-88,599	-7,46638
Catechin	9064	-103,94	-79,3543	-5,84716
Resveratrol	445154	-103,393	-71,5134	-10,1125
Quercetin	5280343	-102,874	-85,9936	-12,382
Vanillic acid	8468	-97,7487	-79,5978	-9,13919
Para-coumaric acid	637542	-95,7205	-76,5704	-7,4999
Ortho-coumaric acid	637540	-95,5715	-75,3494	-8,51442
Gallic acid	370	-93,3955	-74,3273	-11,9103
Trans-cinnamic acid	444539	-90,8015	-72,8429	-3,94212
Flavone	10680	-90,4272	-64,3837	-
Protocatechuic acid	72	-89,6598	-71,135	-12,3329
Gentisic acid	3469	-88,2072	-71,0275	-6,20789
Hydroxybenzoic acid	135	-83,1598	-66,5815	-8,98031
Alizarin	6293	-81,7408	-77,2096	-5,95561
Ascorbic acid	54670067	-74,9951	-66,6469	-12,6365
Coumarin	323	-68,5736	-40,0135	-5,72308

Docking çalışmaları için enzimin seçilen bölgesi ve moleküllerin aktif bölgeye nasıl yerleştiği Şekil 4.21'de gösterilmiştir.

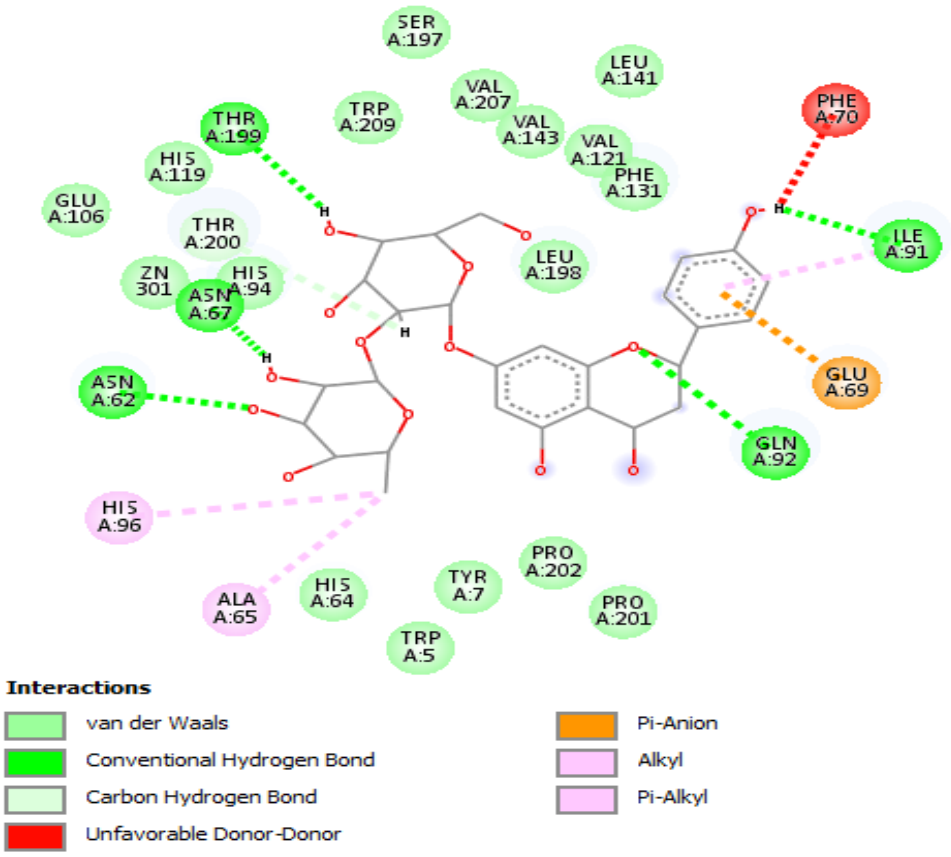


Şekil 4. 21 Moleküllerin enzimin aktif bölgesine bağlanma modeli



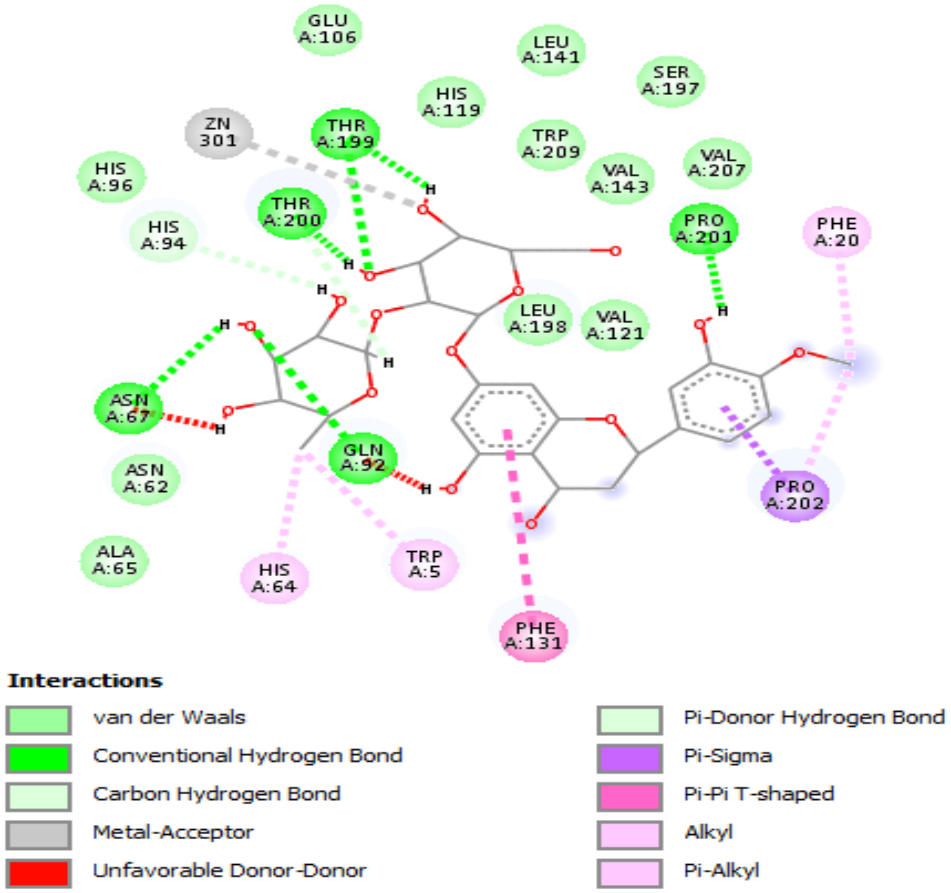
Şekil 4. 22 Rutin'in bağlanma şekli

Docking sonuçlarına göre rutinin enzimine bağlanma potansiyeli -145,639 MolDock Scoru olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, HIS 64, THR 200, HIS 94, THR 199, GLN 92 ve Asn 67 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. TYR 7, ALA 65, ASN 62, LEU 141, VAL 143,TRP 209, HIS96, HIS 119 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır(Şekil 4.22).



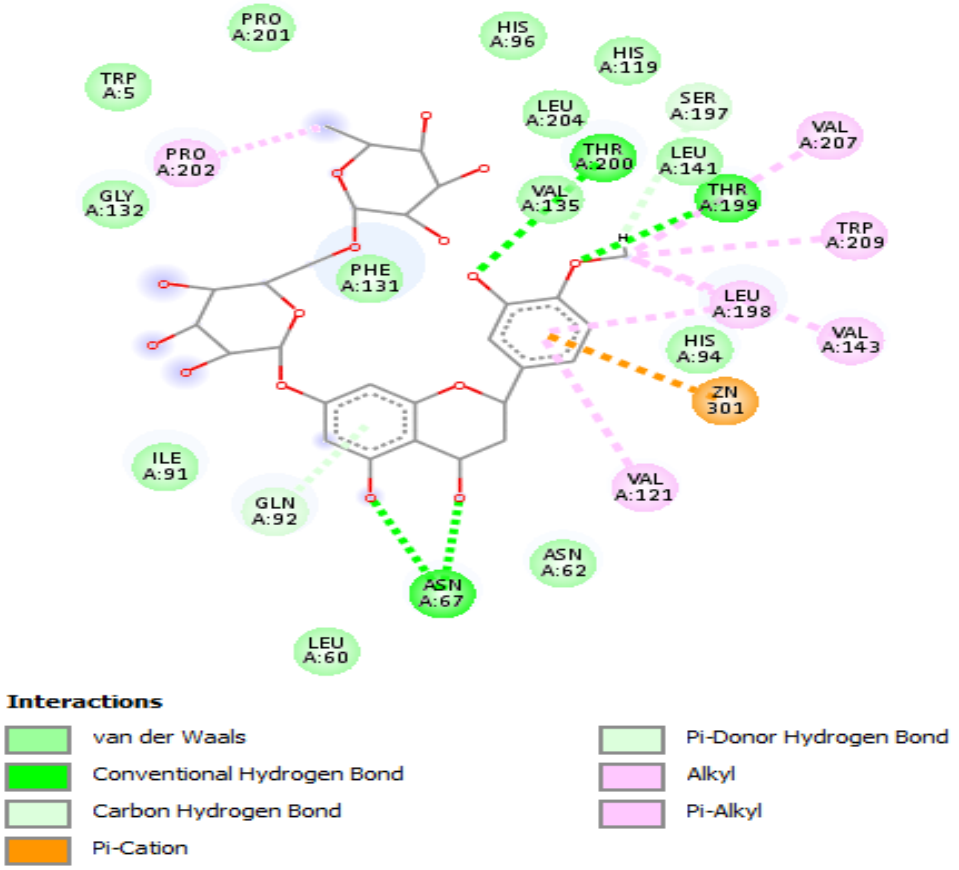
Şekil 4. 23 Naringin bağlanma şekli

Docking sonuçlarına göre MolDock Scoru -139,68 olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, ASN 67,GLN 92,ILE 91,THR 199,ve Asn 62 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. GLU 106,ZN 301,HIS 94,THR 200,LEU 198, VAL 121, PHE 131,VAL 143,VAL 207,TRP 209,LEU 141, SER 197,gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4. 24 Neohesperidin bağlanma şekli

Docking sonuçlarına göre MolDock Scoru -137,049 olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, ASN 67,GLN 92,THR 200,THR 199 ve PRO 201 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. HIS 96,HIS 119,GLU 106,LEU 141,TRP 209,VAL 143,SER 197,VAL 207,VAL 121,LEU 198 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4. 25 Hesperidin'in bağlanma şekli

Docking sonuçlarına göre MolDock Scoru -131,356 olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, ASN 67,THR 200,THR 199 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. HIS 96,HIS 119,GLY 132,LEU 141,TRP 209,VAL 143,SER 197,VAL 207,VAL 121,LEU 204,PRO 201, TRP 5 gibi amino asitler van der Waals etkileşimlerine katkı sağlamıştır (Şekil 4.25).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Binlerce yıldır insanlar karşılaştıkları hastalıklarda faydaları sebebiyle bitkileri şifa kaynağı olarak kullanılmıştır. Tedavi nedeniyle birçok bitki çeşidinden faydalanmıştır. Tüm dünyada bitkiler günümüzde dahi en önemli şifa kaynağıdır. Ülkemizde de bitki çeşitliliği yönünden birçoğu endemik olmak üzere geniş bir bitki çeşitliliği yayılımı göstermektedir. Bu bitki çeşitliliği ülkemize önemli katkılar sağlamaktadır. Fakat yanlış ve bilinçsiz kullanımı sebebiyle zararlı yan etkileri bulunmaktadır.

Günümüzde bitkiler gıda, kozmetik, boya, endüstri, ilaç vb. sanayilerinde doğal ve zararsız olması sağlığa faydalı olması sebebiyle bitkilerin önem kazanması ve bitkilere olan ilginin artması bitkilerin önemini arttırmıştır. Tıp alanında modern cihazların bulunması ile ham madde olarak bitkilerin önemi konumu itibarıyla daha çok artmıştır.

Sağlıklı bir yaşam ve tedavi için bitkilerin kullanımı antik çağlara dayanmaktadır. Günümüzde halk arasında bitkiler yine tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kırsal bölgelerde çevrede yetişen bitkiler kullanılırken, şehirlerde aktarlardan temin edilen bitkiler kullanılmaktadır. Piyasada zayıflatıcı özelliği olduğu savunulan birçok bitki özlü malzeme satılmakta ve oldukça büyük kitlelere hitap etmektedir. Bu tür malzemeler internet ortamında denetimsiz bir şekilde insanların kullanımına sunulmaktadır.

Glokom adı verilen geri dönüşümsüz hastalık son yıllarda giderek hızla artış göstermektedir. Tedavi edilmez ise geri dönüşümsüz körlüğün önde gelen sebeplerinden birisidir. Tüm dünyada 70 milyona yakın insanı etkilediği ve bunların yaklaşık 7 milyonuna yakını kör olabileceği tahmin edilmektedir (Quigley 1996). Glokom hastalığı nedeniyle 2020 yılında 80 milyona yakın insanın etkilenmesi ve bunların 11 milyondan fazlasının kör olması beklenmektedir (Quigley and Broman 2006).

Glokomun hastalığının teşhis ve takip sürecinde GİB ölçümü çok önemli bir yere sahiptir. GİB ve GİB'i düzenleyen hümör aköz dinamikleri; şimdi bile glokomatöz hasar gelişiminde bilinen ve ilerleyici glokomatöz hasarın önlenmesinde kontrol edilebilen en önemli risklerden biridir. Aksonların artmış GİB veya OSB'ye karşı artmış

basınç gradiyentine karşı intoleransı apoptozisi başlatan süreçlerden birisi olsa da, kontrol altına alınmış GİB'e rağmen hasarın devam etmesi veya normal GİB'e sahip kişilerde glokomatöz optik sinir hasarının görülmesi, hastalığın etyopatogenezinde vasküler ve bağ doku değişiklikleri ile nöral mekanizmaların da rol oynadığını düşündürmektedir (Quigley *et al.* 1995).

Bu kapsamda tezimizde kullanılmak üzere yaptığım çalışmamda bitki kaynaklı ekstrelerin ve kimyasal denemelerin karbonik anhidraz II enzimi üzerine inhibitör etkilerini inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlar bitkilerden ürettiğimiz bileşenlerin konsantrasyonlarının karbonik anhidraz üzerindeki inhibitör etkilerinin arttığını gösterdi.

Bizim çalışmamızda da metanol gövde ve kök ekstreleri diğer ekstrelere göre daha iyi anti-karbonik anhidraz etkisi göstermiştir. *Digitalis lamarckii* bitkisi kısımlarının aseton ekstresinde elde edilen IC_{50} değerleri 138-866 µg/mL arası, kloroform ekstresinde elde edilen edilen IC_{50} değerleri 577-787 µg/mL arası, hekzan ekstresinde elde edilen IC_{50} değerleri 99-231 µg/mL arası, kaynatma ekstresinde elde edilen IC_{50} değerleri 188-231 µg/mL arası, metanol ekstresinde elde edilen IC_{50} değerleri 231-1732 µg/mL arası değişmiştir.

Çalışmamızda karbonik anhidrazı en fazla inhibe eden gövde su ve hekzan ekstreleri olmuştur. Özellikle sulu ekstrelerin inhibisyon etkisinin olması önemlidir. Çünkü bu kısımlar bitki çayı gibi kaynatılıp değerlendirilebilir. Gövde kısmının etkili olması ise diğer bir pozitif yönü olarak değerlendirilebilir. Çünkü bu kısım çiçek gibi belirli bir zamanda değil daha uzun süre toplama imkanı olan bitki kısmıdır.

Kullandığımız bitki ekstrelerinin hepsinde Pankreatik karbonik anhidrazı inhibitör etkisi saptanmıştır. Yüksek oranda pankteatik karbonik anhidrazı inhibisyonu etkisi gösteren kısımlar glokom tedavisinde kullanılabilir. Ancak bitkide etken maddelerin izole edilerek yapılarının aydınlatılması ve karbonik anhidraz enzimi inhibisyonlarının *in vivo* deneylerle de ispatlanabilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

Ahmad, S. Hassan, A. Rehman, T. Basit, A. Tahir, A. and Arshad, M.A. 2019. In vitro bioactivity of extracts from seeds of Cassia absus L. growing in Pakistan. Journal of Herbal Medicine, 16, 100258.

Akkemik, E. Aybek, A. and Felek, I. 2019. Effects of cefan melon (cucumıs melo l.) Seed extracts on human erythrocyte carbonıc anhydrase I-II enzymes. Applıed Ecology and Envıronmental Research, 17, 14699-14713.

Benli, M. Yiğit, N. Geven, F. Güney, K. and Bingöl, Ü. 2009. Antimicrobial activity of endemic Digitalis lamarckii Ivan from Turkey.

Bhowmik, D. Kumar, K.S. Deb, L. Paswan, S. and Dutta, A. 2012. Glaucoma-A Eye Disorder Its Causes, Risk Factor, Prevention and Medication. The Pharma Innovation, 1, 66.

Carter, N. Jeffery, S. and Shiels, A. 1982. Immunoassay of carbonic anhydrase III in rat tissues. FEBS letters, 139, 265-266.

Champe, P.C. and Harvey, R.A. 1997. Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, .

Davis, P. 1982. Flora of Turkey and the East Aegean Island, Edinburg Univ. Press, Edinburg, 7, 384-394.

Dodgson, S. Forster 2nd, R. Schwed, D. and Storey, B.T. 1983. Contribution of matrix carbonic anhydrase to citrulline synthesis in isolated guinea pig liver mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 258, 7696-7701.

Ekim, T. Koyuncu, M. Vural, M. Duman, H. Aytaç, Z. and Adıgüzel, N. 2000. Türkiye bitkileri kirmizi kitabi.

Epstein, D.L. and Grant, W.M. 1977. Carbonic anhydrase inhibitor side effects: serum chemical analysis. Archives of Ophthalmology, 95, 1378-1382.

Gülçin, İ. Scozzafava, A. Supuran, C.T. Koksal, Z. Turkan, F. Çetinkaya, S. Bingöl, Z. Huyut, Z. and Alwasel, S.H. 2016. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 31, 1698-1702.

Güneş, F. and Özhatay, N. 2000. Lathyrus L. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 11, 92-94.

Kaya, E.D. Erğun, B. Demir, Y. Zuhal, A. and Beydemir, Ş. 2019. The in vitro impacts of some plant extracts on carbonic anhydrase i, ii and paraoxonase-1. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 47, 51-59.

Keha, E. and Küfrevioğlu, Ö.İ. 2005. Biyokimya,Aktif yayınevi, Erzurum.

Lamond, J. 1978. 75. Primulaceae. 1. Primula L.

Lehninger, A. Nelson, D. and Cox, M. 2005. Principles of Biochemistry. 3. baskıdan çeviri (Çeviri Editörü: Kılınç, N.). Palme Yayıncılık.

Lindskog, S. 1997. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. . Pharma col. Ther.74,, 1-20.

Maren, T.H. 1967. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. Physiological Reviews, 47, 595-781.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Physiol Plantarum

Newman, D.J. and Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of natural products, 70, 461-477.

Oke, F. Aslim, B. Ozturk, S. and Altundag, S. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia Ten. Food Chemistry, 112, 874-879.

Pastarekova, S. Parkkila, S. Pastorek, J. and Supuran, C. 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art. Therapeutic Applications and Future Prospects, 119, 199-229.

Pocker, Y. and Ng, J.S. 1974. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. Biochemistry, 13, 5116-5120.

Quigley, H.A. 1996. Number of people with glaucoma worldwide. British journal of ophthalmology, 80, 389-393.

Quigley, H.A. and Broman, A.T. 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. British journal of ophthalmology, 90, 262-267.

Quigley, H.A. Nickells, R.W. Kerrigan, L.A. Pease, M.E. Thibault, D.J. and Zack, D.J. 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. Investigative ophthalmology & visual science, 36, 774-786.

Saracoglu, I. INoUE, M. CALIS, I. and OGIHARA, Y. 1995. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants Phlomis

armeniaca and Scutellaria salviifolia. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 18, 1396-1400.

Shu, Y.-Z. 1998. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. Journal of natural products, 61, 1053-1071.

Sly, W.S. and Hu, P.Y. 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. Annual review of biochemistry, 64, 375-401.

Supuran, C.T. and Scozzafava, A. 2000. Carbonic anhydrase inhibitors-Part 94. 1, 3, 4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? European journal of medicinal chemistry, 35, 867-874.

Supuran, C.T. Scozzafava, A. and Casini, A. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Medicinal research reviews, 23, 146-189.

Taslimi, P. Köksal, E. Gören, A.C. Bursal, E. Aras, A. Kılıç, Ö. Alwasel, S. and Gülçin, İ. 2020. Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of Satureja cuneifolia and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. Arabian journal of chemistry, 13, 4528-4537.

Wu, B. Li, Y. Yan, H. Ma, Y. Luo, H. Yuan, L. Chen, S. and Lu, S. 2012. Comprehensive transcriptome analysis reveals novel genes involved in cardiac glycoside biosynthesis and mlncRNAs associated with secondary metabolism and stress response in Digitalis purpurea. BMC genomics, 13, 1-22.

Zengin, G. Ceylan, R. Katanić, J. Mollica, A. Aktumsek, A. Boroja, T. Matić, S. Mihailović, V. Stanić, S. and Aumeeruddy-Elalfi, Z. 2017. Combining in vitro, in vivo and in silico approaches to evaluate nutraceutical potentials and chemical fingerprints of Moltkia aurea and Moltkia coerulea. Food and Chemical Toxicology, 107, 540-553.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Cuma DİNÇER

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	2016-Halen
Lisans	Amasya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği Bölümü	2011-2015

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2021-Halen	Muş Türk Telekom Ortaokulu	Fen Bilimleri Öğret.