

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI NANOPARTİKÜLLERİN İNSAN KARBONİK
ANHİDRAZ I VE II ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Asiye BULMUŞ

Enstitü Anabilim Dalı : **ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ**
Tez Danışmanı : **Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL**
Tez Ortak Danışmanı : **Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK**

Ağustos 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI NANOPARTİKÜLLERİN İNSAN KARBONİK
ANHİDRAZ I VE II ENZİMLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

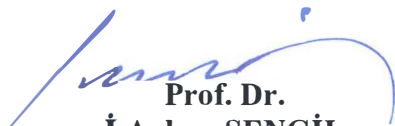
YÜKSEK LİSANS TEZİ


Asiye BULMUŞ


Enstitü Anabilim Dalı

: ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez ~~2019~~ 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
İ. Ayhan ŞENGİL
Jüri Başkanı


Dr. Öğr. Üyesi
Füsun BOYSAN
Üye


Dr. Öğr. Üyesi
Mustafa AKÇİL
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Asiye BULMUŞ

10. 05. 2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. İ. Ayhan ŞENGİL'e ve Sayın Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar yönetimine bu imkanı sağladıkları için teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince sabırla her türlü desteği veren eşim Serkan BULMUŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLOLAR LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ	1
-------------	---

BÖLÜM 2.

KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Enzimler	3
2.1.1. Enzim kinetiği	5
2.2. Karbonik Anhidrazlar.....	9
2.2.1. Karbonik anhidraz enziminin izoformları	12
2.2.1.1. Karbonik anhidraz I (CA I)	12
2.2.1.2. Karbonik anhidraz II (CA II).....	14
2.2.1.3. Karbonik anhidraz enziminin diğer izoformları (CA III- XIV).....	15
2.2.2. Karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri (CAI' ler).....	17
2.3. Nanoteknoloji	20
2.3.1. Nanoteknolojinin tarihçesi.....	20
2.3.2. Nanoteknolojinin faydaları ve uygulama alanları	21
2.3.3. Nanopartiküller	25
2.3.3.1. Nanopartiküllerin toksisitesi.....	29

2.3.3.2. Nanopartiküllerin uygulama alanları.....	30
---	----

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE METOD	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	33
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	33
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanması.....	34
3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini	35
3.2. Metodlar	35
3.2.1. Protein tayini	35
3.2.2. Enzim aktivitesi tayini	36
3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini	36
3.2.3. Enzim saflaştırma çalışmaları	37
3.2.3.1. Hemolizatın hazırlanması.....	37
3.2.3.2. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	38
3.2.4. hCA enzimi için IC ₅₀ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	38
3.3. Grafen ve Grafen Oksit Türevlerinin Sentezi	38

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik.....	40
4.2. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine Nanopartiküllerin Etkilerinin Belirlenmesi için Yapılan Çalışmaların Sonuçları.....	40
4.2.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren nanopartiküller ile ilgili sonuçlar	40
4.2.2. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren nanopartiküller ile ilgili sonuçlar	43

4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bazı nanopartiküllerin IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar	46
4.2.4. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırma basamakları sonuçları	47
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika birleşik devletleri
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
AgNPs	: Gümüş nanopartikülleri
ALP	: Alkalin fosfataz
ALT	: Amino aminotransferaz
AMS	: Akut dağ hastalığı
AR-GE	: Araştırma-Geliştirme
ATM	: Aztreonam
CA	: Klavulanik asit
CA	: Karbonik anhidraz enzimi
CAA	: Karbonik anhidraz aktivatörü
CAAs	: Karbonik anhidraz aktivatörleri
CAI	: Karbonik anhidraz inhibitörü
CAIs	: Karbonik anhidraz inhibitörleri
cm	: Santimetre
CSF	: Koloni uyarıcı faktör
CuNPs	: Bakır nanopartiküller
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
E	: Enzim
EC	: Enzim kod numarası
EP	: Enzim-ürün kompleksi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
EU	: Enzim aktivite birimi
g	: Gram
g	: Yer çekimi ivmesi
GFM	: Grafen familyası metali

GİB	: Göz iç basıncı
G	: Grafen
GO	: Grafen oksit
hCA	: İnsan karbonik anhidraz enzimi
I	: İnhibitör
IC ₅₀	: Enzim inhibisyonunu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _a	: Aktivasyon sabiti
k _{cat}	: Turnover sayısı
K _i	: İnhibitörün enzime bağlanma denge sabiti
K _i '	: İnhibitörün enzim-substrat kompleksine bağlanma denge sabiti
kDA	: Kilo dalton
kg	: Kilogram
K _m	: Michaelis Menten sabiti
K _s	: Substratın enzim için afinitesinin ölçüsü
L	: Litre
LDH	: Laktata dehidrogenaz
M	: Molar
mg	: Miligram
Mhz	: Megahertz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MSS	: Merkezi sinir sistemi
nm	: Nanometre
N	: Normal
NNI	: Ulusal teknoloji girişimi
NP	: Nanopartikül
P	: Reaksiyon ürünü
pH	: Asitlik veya bazlık derecesini ifade eden ölçü birimi
S	: Substrat
s	: Saniye
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid gel elektroforezi
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu

SUL	: Sulbactam
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin
Tris	: Trihidroksimetilaminometan
TZB	: Tazobactam
UV	: Ultraviyole ışınları
V	: İlk hız
V _{max}	: Maksimum hız
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
ε	: Epsilon
α-CA	: Alfa- Karbonik anhidraz
β-CA	: Beta- Karbonik anhidraz
θ -CA	: Teta-Karbonik anhidraz
γ-CA	: Gama-Karbonik anhidraz
δ-CA	: Delta-Karbonik anhidraz
ζ-CA	: Zeta-Karbonik anhidraz
ε-CA	: Epsilon -Karbonik anhidraz
η-CA	: Eta-Karbonik anhidraz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Enzim diyagramı (Palmer ve Bonner, 2011)	3
Şekil 2.2. Klasik tersinir enzim inhibisyonu tiplerinin, substrat konsantrasyonuna karşı hız grafikleri veya 1/substrat konsantrasyonuna karşı 1 / hız grafikleri üzerindeki etkilerinden belirlenmesi (Lineweaver-Burk çift karşılıklı çizit). Karışık inhibisyon daha karmaşık davranışlar gösterir ve Lineweaver-Burk çizitlerinin kesişme noktaları veya paralellikleri görülmez (Bhagavan ve Ha., 2015).	8
Şekil 2.3. Karbondioksitin (CO ₂) hidrasyonu ve dehidrasyonu (Çoban ve ark., 2007).....	9
Şekil 2.4. α-CA'ların katalitik (fizyolojik reaksiyon için), inhibisyon (çinko bağlayıcılarla) ve aktivasyon mekanizması (hCA I' in aktif bölgesindeki çinko ile etkileşen amino asitlerin numaralandırması) (Supuran, 2016).	13
Şekil 2.5. Sülfonamidler (A) ve anyonik (B) inhibitörler tarafından inhibe edilen CA enziminin inhibisyon mekanizması (Supuran ve ark., 2004).	18
Şekil 2.6. İnhibitörlerin (Fenol (A), spermin (B) ve kumarin ve trans-2-hidroksisinamik asit (C)' ler) bağlanma modelleri (Efe, 2017).....	19
Şekil 2.7. Nano ölçekli maddelerin boyut aralıklarının karşılaştırılması (Nasrollahzadeh ve ark., 2019).....	21
Şekil 2.8. Nanoteknolojinin potansiyel uygulama alanları (Nimesh, 2013)	22
Şekil 2.9. Nanopartiküllerin sınıflandırılması (Singh, 2016).....	26
Şekil 2.10. Aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımları ile NP tipik sentetik sentezleme yöntemleri (Iravani, 2011).....	27
Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm mekanizması (Verpoorte et al. 1976)	37

Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.	40
Şekil 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[garfen] grafiği.	41
Şekil 4.3. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafen oksitin 5 farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafenoksit] grafiği.	41
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1p NP' nin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1p] grafiği.	42
Şekil 4.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2p NP' nin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2p] grafiği.	42
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3p NP' nin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3p] grafiği.	43
Şekil 4.7. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafen] grafiği.	44
Şekil 4.8. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafen oksitin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafenoksit] grafiği.	44
Şekil 4.9. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1p NP' nin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1p] grafiği.	45
Şekil 4.10. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2p NP' nin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2p] grafiği.	45
Şekil 4.11. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3p NP' nin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3p] grafiği.	46

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Rekabetçi inhibisyonun Km ve Vmax üzerine etkileri (Michaelis-Menten kinetik parametreleri) (Bhagavan ve Ha., 2015)	7
Tablo 2.2. α -CA' lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Supuran, 2008).....	10
Tablo 4.1. hCA I için nanopartiküllerin esteraz IC ₅₀ değerleri.....	46
Tablo 4.2. hCA II için nanopartiküllerin esteraz IC ₅₀ değerleri.....	47
Tablo 4.3. İnsan eritrositlerinden hCA I-II izoenzimlerinin Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması basamakları.	47
Tablo 5.1. hCA I ve hCA II için nanopartiküllerin esteraz IC ₅₀ değerleri.....	50

ÖZET

Anahtar kelimeler: Enzim, hCA I-II, IC₅₀, inhibisyon, karbonik anhidraz, nanopartikül, grafen

Grafen (G), 2004 yılında keşfedilmesinden bu yana termal, mekanik ve elektriksel özellikler nedeniyle birçok potansiyel uygulamada umut vermiştir. Grafit malzemeler arasında grafen oksit (GO), olağandışı özellikleri ve kolay işlenebilirlikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. GO; hidroksil, epoksit, karbonil ve karboksil grupları dahil olmak üzere birçok oksijen içeren fonksiyonel gruba sahiptir.

Karbonik anhidrazlar (EC 4.2.1.1, CA'lar), kataliz için çok önemli olan bir Zn iyonu içeren metaloenzimlerdir. CA'lar birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynar. CO₂ ve H₂O'nun HCO₃⁻ ve H⁺'ye dönüşümü de dahil olmak üzere çeşitli reaksiyonları katalize eder. Karbonik anhidrazların inhibitörleri ise glokom, epilepsi, gastroduodenal ülserler, asit-baz dengesizlikleri ve nörolojik bozukluklar gibi birçok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde hayati öneme sahiptir.

Bu çalışmada, grafen (G), grafen oksit (GO) ve grafen oksit türevli nanopartiküllerin (1p, 2p ve 3p) IC₅₀ değerleri hesaplandı ve G ve GO'nun kinetik incelemeleri, referans CA inhibitörlerine kıyasla farklı sonuçlar gösterdi. İncelenen bu nanopartiküller, tıbbi uygulamalarda faydalı olabilecek yeni CA inhibitörlerinin hazırlanmasında kullanılabilir olacak teşvik edici öncü moleküllerdir.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SOME NANOPARTICLES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASES I AND II

SUMMARY

Keywords: Carbonic anhydrase, enzyme, graphene, hCA I-II, IC_{50} , inhibition, nanoparticle

Graphene (G) has given hope in many potential applications because of remarkable thermal, mechanical, and electrical properties since its discovery in 2004. Among graphitic materials graphene oxide (GO) mostly interests a great deal of attention because of their unusual features and easy-processabilities. GO has many oxygen-containing functional groups including hydroxyl, epoxide, carbonyl and carboxyl groups.

Carbonic anhydrases (EC 4.2.1.1, CAs) are a family of metalloenzymes which contains a Zn ion, crucial for catalysis. CAs plays a pivotal role in a number of physiological and pathological processes. They catalyze a variety of reactions including the conversion of CO_2 and H_2O to HCO_3^- and H^+ . Inhibitors of the carbonic anhydrases are vital in treatment and prevention of many of diseases such as glaucoma, epilepsy, gastroduodenal ulcers, acid-base disequilibria and neurological disorders.

IC_{50} values of graphene (G), graphene oxide (GO) and graphene oxide derived nanoparticles (1p, 2p and 3p) were calculated and kinetic investigations of G and GO showed different results compared to reference CA inhibitors. These nanoparticles investigated are encouraging agents which may be used as lead molecules in preparation of novel CA inhibitors that might be useful in medical applications.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda meydana gelen ve metabolik reaksiyonların katalizörleri olarak işlev gören biyolojik makromoleküllerdir (Perales ve ark., 2015). Karbonik anhidrazlar karbon dioksitin bikarbonata geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize eden metaloenzimlerdir (Ferry, 2010).

Karbonik anhidraz enzimi (EC 4.2.1.1, CA) ilk kez Meldrum ve Roughton tarafından 1933 yılında karakterize edilmiştir. CA 1933 yılında keşfedilmesine rağmen saflaştırma 1939-1944 yılları arasında Keilin ve Mann tarafından sığır eritrositlerinden elde edilmiştir. CA'nın ökaryotlarda keşfedilmesinden sonra 1961 yılında insan eritrositlerinden saflaştırıldı ve etanol-kloroform ekstraksiyonunu içeren yöntemle iki CA izoformu tespit edildi. Bu izoformlara insan karbonik anhidraz I (hCA I) ve insan karbonik anhidraz II (hCA II) adı verildi. Prokaryotlarda ise ilk kez 1963 yılında bulunduğu bildirilmiştir. Prokaryotlarda CA'nın ilk dizilimi 1992 yılında izole edilmiştir ve *Escherichia coli*'den saflaştırılmıştır (Shekh ve ark., 2012; Güler ve ark., 2016).

CA'lar hem temel bilim çalışmaları için hem de üst düzeyde araştırılmış enzimlerin eşsiz bir örneğini temsil eder. Proteinlerdeki karmaşık yapı-fonksiyon ilişkilerinin atomik seviyede incelenmesi, aynı zamanda pratik açıdan anlaşılmasını sağlayan bu enzimlerin inhibitörleri, çeşitli hastalıklar için klinik uygulamalara sahiptir.

Yapılan çalışmalar ile CA enzimlerin ve bunların inhibitörlerinin dikkate değer olduğu anlaşılmıştır. Bu alanda yoğun araştırmalar yapıldıktan yıllar sonra yeni ilaçların geliştirilmesi, yeni teşhis araçları veya yaşam bilimlerinin temel süreçlerinin daha derinlemesine anlaşılması için ilginç fırsatlar sunmaya devam edecektir.

(Supuran ve ark. 2003). Yeni etken maddelerin geliştirilmesi amacı ile nanoteknolojinin temeli olan nanopartiküller üzerinden bazı çalışmalar yapılmıştır.

Nanoteknoloji günümüzde hızla gelişmekte olan araştırma alanların başında gelir. Yapılan araştırmalardaki en önemli gelişmeler hastalıkların teşhis ve tedavisinde değerlendirebileceğimiz sistemlerdir. Nanomalzeme olarak tanımlanan nanopartiküller boyutları 100 nm ve altında kalan özellikle biyoteknolojik ve tıp alanında kullanılmaktadır. Çeşitli sentezleme yöntemleri ile elde edilen nanopartiküller gen tedavisi ve kanser tedavisi gibi çeşitli hastalıklarda imkanlar sağlamaktadır (Denktaş ve ark., 2011; Gürmen ve Ebin, 2008).

Bu tez kapsamındaki çalışmalarda ise tasarlanan grafen, grafen oksit ve grafen oksitin metal türevlerinin (**1p**, **2p** ve **3p**), insan eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz enzimi I ve II (hCA I-II) üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

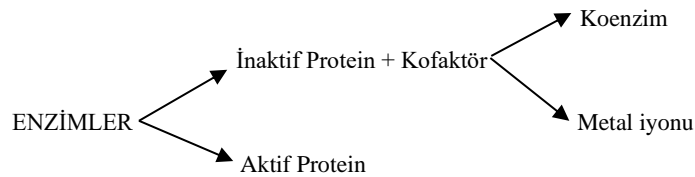
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler

Enzimler biyolojik katalizörlerdir. Canlı hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızını herhangi bir değişime uğramadan arttıran enzimler makromoleküller tarafından yönetilir. Metabolizma, enzimler olmadan oldukça yavaş çalışır. Enzimle katalizlenen reaksiyonların reaktanları “substrat” olarak adlandırılır. Her enzim belirli ürün veya ürünleri üretmek için belirli bir substrat veya substratlar üzerinde aktivite göstererek karakter bakımından oldukça spesifiktir (Palmer ve Bonner, 2007; Purich, 2010a; Pondis, 2016). Yüksek afinite ve yüksek katalitik verime sahip olan enzimler yaşamı destekleyen ve vücuttaki tüm biyokimyasal süreçleri hızlandıran birçok kimyasal reaksiyon için gereklidir (Kunamneni ve ark., 2018).

Bütün enzimler protein yapıdadır. Bununla birlikte, kofaktör olarak adlandırılan protein olmayan bileşenler birçok enzim proteini katalitik olarak aktivite eder. Bir enzimin inaktif protein bileşeni apoenzim; holoenzim, kofaktör dahil olmak üzere aktif enzim olarak adlandırılır. Kofaktör bir koenzim olarak bilindiğinde organik bir molekül veya bir metal iyonu olabilir (Şekil 2.1.).

Şematik olarak özetlenecek ise:



Şekil 2.1. Enzim diyagramı (Palmer ve Bonner, 2011)

Enzimler isimlendirilirken reaksiyonun substratına (örneğin; üreaz, glikozidaz) ve yapılan işin tanımına (örneğin; adenil siklaz, laktat dehidrojenaz) “-az” eki eklenir. Ancak bazı enzimler ilgili enzimatik reaksiyon hakkında hiçbir bilgi vermeyen orijinal isimlerini korur (tripsin, pepsin) (Ergen, 2015). Enzimler bir EC numarası ile sistematik olarak tanımlanmıştır. Bu kod (EC), enzimleri sınıflandırmak için kullanılan dört seviyeli bir tanımlamadır. İlk seviye altı farklı sınıfa karşılık gelir. Oksidoredüktazlar, yükseltgeme/indirgeme reaksiyonlarını katalize eder; transferazlar, bir kimyasal grubu, örneğin bir metil veya glikozil parçasını transfer eder; hidrolazlar, kimyasal bağların hidrolizi yapar; liyazlar kimyasal bağları oksidasyon veya hidrolizden başka yollarla da ayırır; izomerazlar, izomerler arasındaki geometrik ve yapısal değişiklikleri katalize eder ve son olarak ligazlar bir nükleosit trifosfat molekülünün ilişkili hidrolizi ile iki bileşiği birleştirir. Bu EC sınıfları ayrıca, ayrılmış veya oluşan kimyasal bağ, reaksiyon merkezi, transfer edilen kimyasal grup ve kataliz için kullanılan kofaktör gibi çeşitli kriterler ile alt sınıflara ve alt alt sınıflara (sırasıyla ikinci ve üçüncü seviye) ayrılmıştır. Son sınıflandırma seviyesi substrat spesifitesini tanımlar (Cuesta ve ark., 2015; Roskoski, 2015).

Enzim katalizi birçok kimyasal ve fiziksel faktörden etkilenir. Kimyasal faktörler; düşük moleküler ağırlıklı maddeler (protonlar, metaller ve diğer inorganik iyonlar, tampon iyonları, çeşitli organik moleküller, doğal ve sentetik enzim aktivatörleri, inhibitörleri ve stabilizatörleri) ve makromoleküler bileşenlerdir (proteinler, polisakkaritler, biyomembranlar ve diğer polielektrolitler). Fiziksel faktörler; pH, sıcaklık, basınç, iyonik güç, çözücü polaritesi, immobilizasyon, substrat sekestrasyonu ve moleküler gruplardır (Purich, 2010b; Bowden, 1976). Enzim aktivitesini etkileyen kimyasal bileşikler enzim aktivitesini azaltarak veya ortadan kaldırarak protein yapısındaki kritik bölgelere ters veya geri dönüşümsüz bağlanabilir (Talens-Perales ve ark., 2016). Tüm enzimler pH’ dan etkilenir. Pepsin ve alkalın fosfataz gibi birkaç istisna dışında enzimler sadece uygun pH değerlerindeki sulu çözeltilerde aktiftir. Sıcaklık değişimi enzim reaksiyonlarını etkiler ve yönetilmediğinde gözlemlerde hatalara neden olabilir. Hemen hemen tüm

enzimler fizyolojik sıcaklıkların çok üzerinde ısıtılırsa denatüre olur (Bowden, 1976).

Enzimler üzerinde en çok araştırma yapılan önemli konulardan biri, enzim aktivitesinin inhibisyonudur. Enzim inhibisyonu enzim aktivitesinin deneysel ve doğal yöntemler ile düzenlenmesidir. İnhibisyona sebep olan inhibitörler ise enzim katalizli reaksiyonların hızını azaltan maddeler şeklinde tanımlanabilir. Bazı inhibitörler bir substrat veya kofaktör üzerinde hareket ederken bazıları direkt bir enzimle birleşir (Keha ve Küfrevioğlu, 2005; Palmer, 2014; Bhagavan ve Ha, 2015).

Vücutta enzim inhibisyonu ile kontrol edilen bazı süreçler; hemostaz, fibrinozis, kompleman aktivasyonu, bağ dokusu devri ve inflamatuvar reaksiyonlardır. Enzim inhibitörleri, geri dönüşümsüz ve tersinir olarak sınıflandırılır. Geri dönüşümsüz inhibisyon genellikle bir inhibitör ve enzim arasında stabil bir kimyasal bağın oluşmasını içerir. İnhibe edilmiş enzimin rejenerasyonu imkansızdır. Geri dönüşümsüz enzim inhibitörleri (metotreksat, çoğu monoamin oksidaz inhibitörleri) uzun bir etki süresine sahiptir. Tersinir inhibitörler kovalent olmayan bir şekilde bağlanır. Rekabetçi, rekabetsiz, rekabetçi olmayan ve karışık tiplere ayrılan tersinir inhibisyonda, enzimin faaliyet gösterdiği sistemden inhibitör çıkarıldığında enzimin aktivitesi tamamen geri yüklenir. İnhibitör (I) ve enzim (E) arasında denge vardır (Calvey, 2004; Bhgavan ve Ha., 2011).

2.1.1. Enzim kinetiği

1800'lerin ortasından sonlarına kadar reaktant konsantrasyonlarının kimyasal reaksiyonun hızı üzerindeki etkisini yöneten yasaların çoğu biliniyordu. Bununla birlikte, enzim katalizli reaksiyonlar her zaman bu basit hız yasalarını takip etmedi. 1902'de Victor Henri, enzim katalizli bir reaksiyon için ilk faydalı denklemi önermiştir. Henri' nin denklemi enzimlerin bilinen özelliklerini hesaba katmıştır. Bu özellikler bir enzim-substrat kompleksinin katılımına işaret ediyordu. Michaelis ve Menten, Van Slyke ve Cullen ve Briggs ve Haldane gibi isimler Henri'nin

denklemini doğrulayıp zamanla geliştirdiler (Segel, 2013). Rekabetçi inhibisyonda inhibitör genel olarak substratın yapısal bir analogudur ve aktif bölgede bağlama için substrat ile rekabet eder. Bu, iki reaksiyonla mümkündür (2.1, 2.2) (Bhagavan ve Ha, 2015).



Bu reaksiyonlar enzimin tüketilmediğini, bunun yerine bir geri dönüşüm katalizörünün olduğunu kabul eder. İlk aşama serbest bir E kompleksi oluşturmak için serbest enzimin (E) ve substratın (S) hızlı bir şekilde dengelenmesidir. Bunu, ES (enzim substrat kompleksi)'nin E + P'ye hız sınırlayıcı ayrışması takip eder. Burada P oluşan ürünü ifade eder. E, S ve ES arasındaki hızlı denge reaksiyon boyunca korunur. k_1 , k_2 ve k_3 hız sabitleridir (Segel, 2013; Liu, 2017).

İnhibitör sabiti olarak bilinen K_i , enzim inhibitör kompleksinin ayrışması için denge sabiti denklem (2.3) ile verilmiştir.

$$K_i = [E][I]/[EI] \quad (2.3)$$

Dolayısıyla, K_i , bir enzim için inhibitör afinitesinin ölçüsüdür. Benzer şekilde K_s , bir substratın enzim için afinitesinin ölçüsüdür.

Rekabetçi inhibitör ortamında reaksiyon hızını substrat ve inhibitör konsantrasyonları ile ilişkilendiren modifiye Michaelis-Menten denklemi (2.4) aşağıdaki gibidir (Bhagavan ve Ha, 2015).

$$V = (V_{\max}[S]) / (K_m(1 + [I]/K_i) + [S]) \quad (2.4)$$

Bu denklemde V (başlangıç hızı), reaksiyonun belirli bir substrat konsantrasyonunda ilerlediği hızdır; V_{\max} , enzimin ulaştığı maksimum hızdır (doymuş substrat

konsantrasyonlarında); [S], substrat konsantrasyonu ve K_m , Michaelis–Menten sabitidir. Değeri, maksimum reaksiyon hızının yarıya düştüğü zamanki substrat konsantrasyonuna karşılık gelir (Perales ve ark., 2016). Bu ilişkide K_m , inhibitör konsantrasyonunu ([I]) ve inhibitör sabitini ($1 + [I]/K_i$) içeren bir terimle çarpılır. $K_{m(app)}$ olarak da bilinen “ K_m ” $>K_m$ ’ dir çünkü substrat konsantrasyonu ve [I] aktif bölgedeki bağlanma için yarışır. Bu nedenle yarı maksimum hızı elde etmek için daha yüksek bir S konsantrasyonuna ihtiyaç duyulur (Bhagavan ve Ha., 2015). Ayrıca V_{max} ve K_m ’ nin belirlenmesini kolaylaştırmak için denklem (1)’ in birtakım lineer dönüşümleri önerilmiştir. Lineweaver – Burk ve Eadie – Hofstee tarafından farklı denklemler yaygın olarak kullanılmıştır (2.5, 2.6) (Theng, 2012).

$$1/V = (K_m/V_{max}) (1/(S)) + (1/V_{max}) \quad (2.5, \text{Lineweaver – Burk})$$

$$V = (V_{max} - K_m) (v/(S)) \quad (2.6, \text{Eadie – Hofstee})$$

Lineweaver-Burk grafiği, geri dönüşümlü inhibisyon tiplerini ayırt etmek için teşhis açısından faydalıdır. Rekabetçi inhibisyon için [S] ve [I] çizgileri herhangi bir [I]’ de koordinat üzerinde aynı noktada kesişir ancak apsilerde farklı eğimler oluşurken ($K_{m(app)}$ farklılıkları nedeniyle) V_{max} sabittir. Tablo 2.1., rekabetçi ve diğer inhibisyon türleri için görünen K_m için cebirsel ifadeleri göstermektedir.

Tablo 2.1. Rekabetçi inhibisyonun K_m ve V_{max} üzerine etkileri (Michaelis-Menten kinetik parametreleri) (Bhagavan ve Ha., 2015)

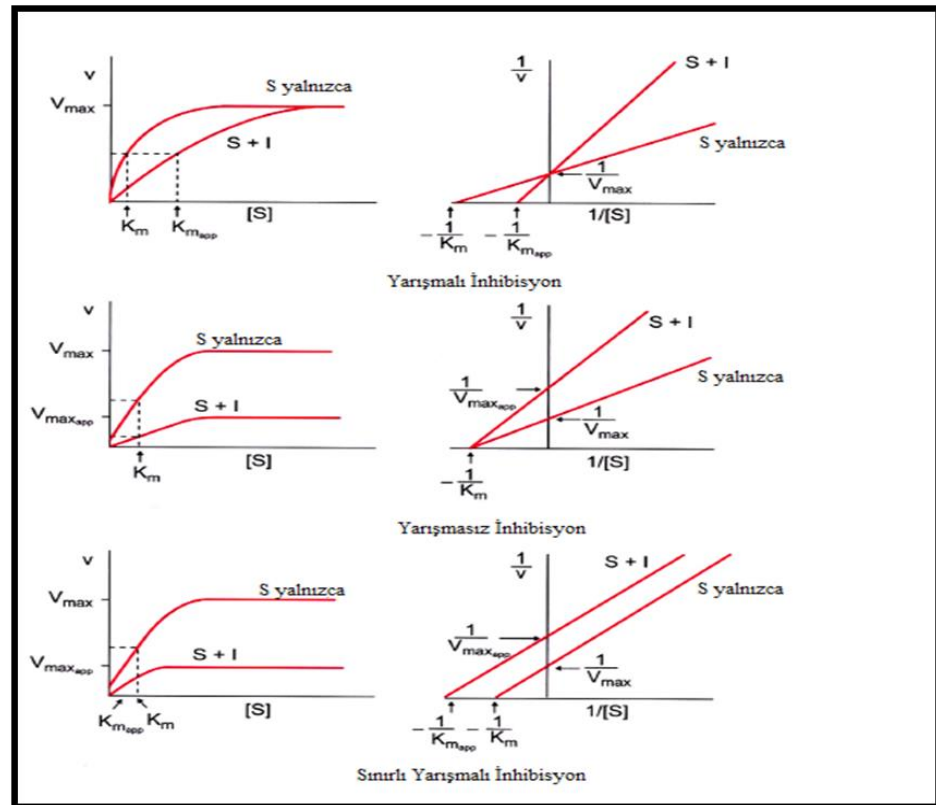
İnhibitör Tipi	V_{max}	K_m
Yarışmalı	Yok ($V_{max(app)}=V_{max}$)	$K_{m(app)}=K_m(1+1/K_i)$
Yarışmasız	$V_{max(app)}=V_{max}/(1+1/K_i)$	Yok ($K_{m(app)} = K_m$)
Sınırlı yarışmalı	$V_{max(app)}=V_{max}/(1+1/K_i)$	$K_{m(app)} = K_m(1+1/K_i)$

Not: $K_i = [E] [I]/[EI]$ ya da $[ES] [I]/[ESI]$. Sınırlı yarışmalı inhibisyonda E ve ES’ ye eşit derecede iyi bağlanır.

Karışık inhibisyonda inhibitör, E veya ES' ye bağlanır. Bununla birlikte, aktivite üzerindeki inhibitör etki K_m ve V_{max} için farklılık gösterir ve bu nedenle iki K_i değeri gözlenir: İnhibitörün E' ye bağlanma için denge sabiti K_i , ES' ye bağlanma için denge sabiti K_i' dir.

Yarışmasız inhibisyonda inhibitör, substrat ile yapısal benzerlik göstermez ve enzime substrat bağlama bölgesinden farklı bir bölgede bağlanır. İnhibitör ve substrat arasında rekabet yoktur.

Sınırlı yarışmalı inhibisyonda inhibitör, bir enzim-substrat inhibitör kompleksi oluşturmak için sadece ES ile birleşir. Sınırlı yarışmalı inhibitöre sahip çift-karşılıklı çizit paralel çizgiler verir ancak hem x hem de y eksenindeki kesişmeler inhibitörün varlığı ile değişir (Şekil 2.2). Görünen V_{max} ve K_m , $(1 + [I]/K_i)$ faktörüne bölünür (Tablo 2.1.) (Bhagavan ve Ha, 2015).



Şekil 2.2. Klasik tersinir enzim inhibisyonu tiplerinin, substrat konsantrasyonuna karşı hız grafikleri veya 1/substrat konsantrasyonuna karşı 1/hız grafikleri üzerindeki etkilerinden belirlenmesi (Lineweaver-Burk çift karşılıklı çizit). Karışık inhibisyon daha karmaşık davranışlar gösterir ve Lineweaver-Burk çizitlerinin kesişme noktaları veya paralellikleri görülmez (Bhagavan ve Ha., 2015).

2.2. Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidraz (CA, 4.2.1.1), karbon dioksitin bikarbonat ve protonlara hızlı dönüşümünü katalize eden ve biyomineralizasyon işleminde rol oynayan bir metaloenzimdir (Şekil 2.3.). Biyomineralizasyon işleminde söz konusu mineral yapılar sırasıyla omurgasızlarda ve omurgalılarda kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat kristalleridir. Bu enzim, karbon dioksitin hidrasyonunu/dehidrasyonunu katalize eden çok işlevli bir enzimdir. CA'nın bitkiler ve hayvanlar alemindeki moleküler özellikleri benzerdir. Bu enzim kırmızı kan hücresinde karbon dioksitin vücuttan taşınmasını kolaylaştırmak için gereklidir. Karbonik anhidraz reaksiyon hızını büyük oranda artırır, bu enzimin farklı formlarının tipik katalitik hızları saniyede 10^4 ila 10^6 arasında değişmektedir. Çoğu karbonik anhidrazın aktif bölgesi bir çinko içerir. CA'lar canlı yaşamında basit ama gerekli bir reaksiyonu katalize eder (Şekil 2.3.). Bu reaksiyon; vücut sıvıları, kemik erimesi, tümörjenisite ve omurgalılarda diğer fizyolojik işlemlerin üretimi için pH regülasyonu, su ve iyon taşınmasında, göz, merkezi sinir sistemi (MSS), iç kulak ve diğer sistemler üzerinde organizmanın homeostazı için önemlidir. Bazı bakterilerde, bitkilerde ve alglerde fotosentetik işlemlerde rol oynar (Çoban ve ark., 2007; De Simone ve Supuran, 2012; Angeli ve ark., 2018; Hanff ve ark., 2018).



Şekil 2.3. Karbondioksitin (CO₂) hidrasyonu ve dehidrasyonu (Çoban ve ark., 2007)

CA'nın başlangıçta keşfedildiği memeli eritrositlerinin katalitik aktivitelerinde farklılık gösteren iki ayrı izozim (CAI ve CAII) içerdiği görülmüştür. Günümüzde, omurgalılarda 16 izoform bilinmektedir ve hepsi α sınıfına aittir. CA formları hücre altı lokalizasyonlarda farklılık göstermek üzere; CA I, II, III, IV, V (VA ve VB), VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV şeklinde sıralanabilir (Guler ve ark., 2016).

CO₂'nin bikarbonata geri dönüşümlü hidrasyonu ve fizyolojik reaksiyonların yanısıra, α -CA' lar, çeşitli reaksiyonları katalize eder (Tablo 2.2.): CO₂'nin bikarbonata hidrasyonu (reaksiyon 1), siyanatın karbamik aside ve siyanamidin üreye hidrasyonu (reaksiyon 2,3), gem-diollere aldehid hidrasyonu (reaksiyon 4),

karboksilik veya sülfonik asit hidrolizi (reaksiyon 5,6) ve daha az incelenen hidrolitik işlemler (reaksiyon 7-9)' dir (Supuran ve ark., 2003; Supuran, 2008).

Tablo 2.2. α -CA' lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Supuran, 2008)

Reaksiyon no	Reaksiyonlar
1	$O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
2	$O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
3	$HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$
4	$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$
5	$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$
6	$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
7	$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar=2,4-Dinitrofenil)
8	$PhCH_2OCOCI + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9	$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (Re=Me; Ph)

Günümüzde CA'ların yedi farklı gen ailesi bilinmektedir. İlk keşfedilen sınıf olan α -CA' lar; bitkilerde, yeşil alglerde, diatomlarda, siyanobakterilerde ve hayvanlarda bulunur ve hem protein yapısında hem de amino asit diziliminde diğer tüm CA sınıflarından farklıdır. α -CA'ların protein yapısı yedi adet periferik α -helis ile çevrili on β -dizisinden oluşan merkezi bir tabaka tarafından yönetilir (Di Mario ve ark., 2018).

İkincil olarak keşfedilen β -CA ezim ailesi, bitkilerde, alglerde, bakterilerde, mayada, arke türlerde, solucanlarda ve böceklerde tanımlanırken; memelilerde tanımlanmamıştır. Diğer CA sınıflarının aksine, β -CA'lar, yapısal ve işlevsel çeşitliliğin olduğu ve allosterik düzenlemeyi sergileyen tek CA'dır (Suhanovsky ve

ark., 2015). β -CA monomeri, α -CA'lardan farklıdır çünkü esas olarak dört paralel β -telinden oluşan ve merkezi bir β -tabakasını çevreleyen α -helislerden oluşur. P-CA monomerleri; iki sistein tortusu, bir histidin tortusu ve bir su molekülü tarafından koordine edilen bir çinko atomundan oluşan iki aktif bölge oluşturmak için dimere oligomerize olur. Bu dimerler, tetramerler ve oktamerler oluşturmak için etkileşime girebilir. ε -CA'lar siyanobakterilerde bulunur ve günümüzde oldukça değiştirilmiş bir β -CA olarak kabul edilir.

γ -CA'lar, arkelerde ve bazı bakterilerde bulunur. Arkebakteriyel γ -CA, üç histidin tortusu ve bir su molekülü ile koordine edilen bir çinko aktif bölgeye sahiptir. γ -CA aktif bölgesini oluşturmak için bir monomer iki çinko koordine eden histidin kalıntısı sağlarken; ikinci bir monomer üçüncü çinko koordine eden histidin kalıntısını sağlar. Karasal bitkilerde, γ -CA'lar ve γ -CA benzeri CA'ların mitokondri kompleksi I'in bir parçası olduğu gösterilmiştir. İki γ -CA geninin bozulması, kompleks I'in kaybına neden olur. Yeşil algler ve diatomlar, mitokondriye lokalize edilmiş γ -CA'lara sahiptir (Kisker ve ark., 1996; Di Mario ve ark., 2018).

δ -CA'lar ve ζ -CA'lar bugüne kadar sadece diatomlarda ve kokkolitlerde raporlanmıştır. δ -CA, 1997 yılında bildirilirken; ζ -CA, birkaç yıl sonra bildirildi. Bugüne kadar bu CA'lar, diğer alglerde, hatta pennate diatomlarında bulunmamıştır. ζ -CA'nın farklı bir özelliği, Zn dışında başka metal (Cd metali) bulundurmasıdır.

Karbonik anhidrazın bir homoloji modelini olan ve 2015 yılında protozoa parazit Plasmodium falciparum'da keşfedilen η -CA'ların yapısı henüz çözülmedi ancak Zn koordinasyon paterninin α -CA'lar ile uzaktan ilişkili olduğu bildirilmiştir. θ -CA'lar, en son keşfedilen CA gen ailesidir. Phaeodactylum tricorutum, klorofit, C. reinhardtii ve siyanobakteriyel Klorothece' de bulunur (De Simone ve ark., 2015; Iqbal ve ark., 2017; Di Mario, 2018).

Karbonik anhidraz inhibitörleri (CAI'ler) ve karbonik anhidraz aktivatörleri (CAA'ler), fizyolojik ve patolojik açıdan oldukça önemlidirler. CAI'lar, enzim aktivitesini baskılayan bir kimyasal madde veya farmasötik sınıfı iken; CAA'ler, katalitik süreci

hızlandıran moleküllerdir. Bunlar, hastalıkların birçok klinik kullanımına sahiptirler. Dolayısıyla, CAI'ler ve CAA'ler potansiyel tedavi edici hedefler olarak görülmektedir (Topal ve ark., 2016; Akkemik ve ark., 2017; Efe, 2017).

2.2.1. Karbonik anhidraz enziminin izoformları

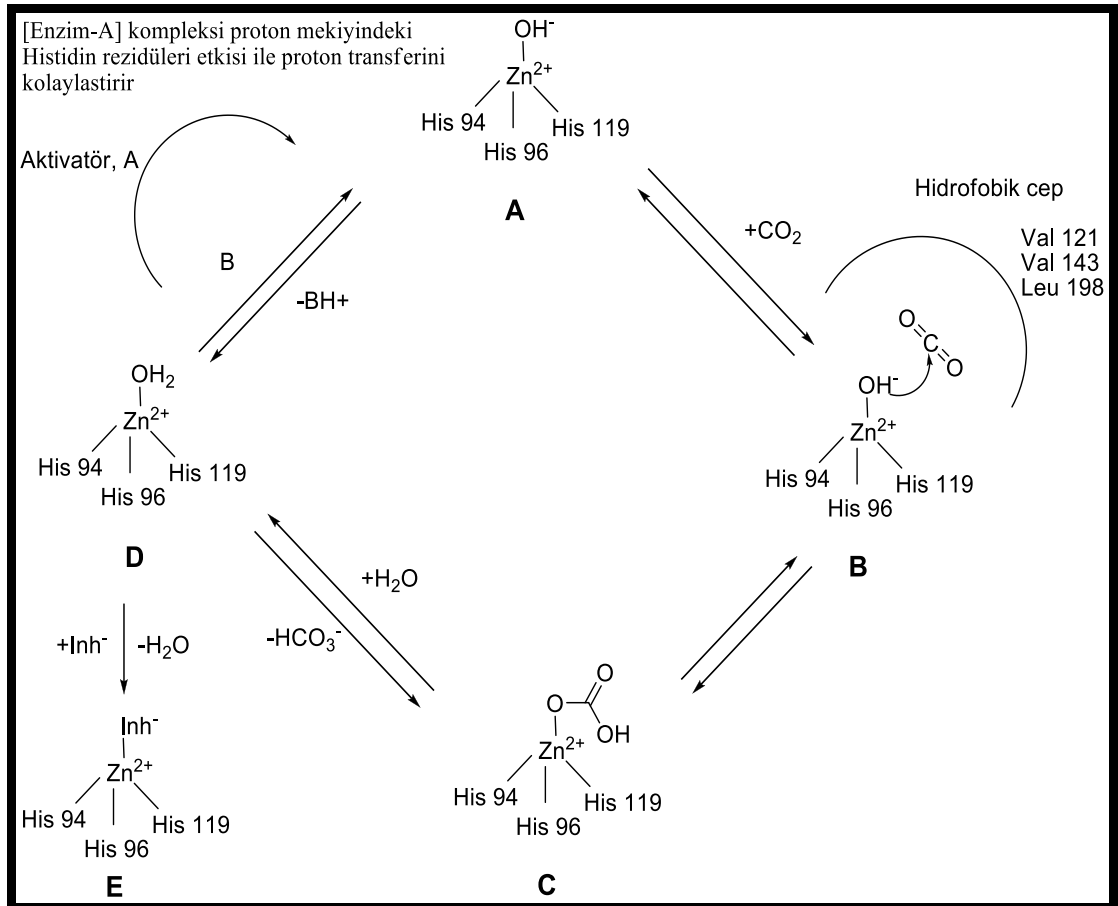
2.2.1.1. Karbonik anhidraz I (CA I)

Tanımlanmış ilk CA izoformu olan CA I, insan kırmızı kan hücrelerinde en çok bulunan proteinlerden biridir. CA I, birincil transkriptinin 261 kalıntı içerdiği 260 kalıntıdan oluşan 30 kDa'lık tek zincirli izoenzimdir. Katalitik aktivitesi olmayan apoenzimin işlevsel olması için Zn (II) iyon kofaktörüne ihtiyaç duyulur. Çinko kofaktör, üç histidin tortusunun (yani His94, His96 ve His119) koordinasyonunda tutulduğu, huni şeklindeki bir katalitik cebin dibine derin bir şekilde gömülür. Zn (II) iyonunun tetrahedral koordinasyon kabuğu, bir su molekülü/hidroksit iyonu ile tamamlanır ve His3-Zn²⁺-OH türevi, Lindskog ve arkadaşları tarafından önerilen klasik CA "çinko hidroksit mekanizması"na göre, CO₂'nin hidrasyonu için aktif türler olarak görev yapar. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, CA I'de mevcut X-ışını kristalografik yapısı görülmüştür. CA I diğer sitosolik izoformlar II, III, VII ve XIII ile en yakın davranışlar göstermiştir ve stabilite, katalitik verimlilik ve inhibitör bağlama özellikleri açısından farklılıkların hem dizilimde hem de yapıdaki küçük ama anlamlı farklardan kaynaklanmaktadır (Pala ve ark., 2015; Waheed ve Sly, 2017).

Sitozolik CA I eritrositlerde çokça bulunmasının yanısıra böbrek, gastrointestinal sistem (özellikle kolon), akciğerler, beyin ve gözler gibi vücudun diğer kısımlarında da bulunur. Ayrıca CA I'in kırmızı kan hücrelerinde tükenmesi, eritrositlerin normal işlevini etkilemese bile, CA, normal insan eritrosit farklılaşmasının erken bir spesifik belirteci olduğu bulunmuştur. Verimli CA II izoformundan daha yaygın olması ve daha az aktif olmasına rağmen CA I; antireflü savunması, gaz alışverişi, iyon taşınımı ve asit/baz homeostazının solunması ve düzenlenmesi de dahil olmak üzere

farklı biyolojik fonksiyonlar için bir CA II temsilcisi gibi gözükmetedir (Hassan ve ark., 2013; Pala ve ark., 2015).

CA I spesifik ligandların (inhibitörler/aktivatörler) geliştirilmesi, yeni potansiyel ilaçların gelişimini teşvik eder. CA I, onu diğer izoformlardan, özellikle CA II'den ayıran özel bir davranış sergiler. Literatür verileri; halojenürler, siyanür, siyanat, tiyosiyanat, vb. gibi anyonların genel olarak CA II'ye göre daha seçici olduklarını göstermektedir. CA aktivatörleri CO_2 'nin hidrasyonunu hızlandırabilir. İlk keşfedilen CA aktivatörlerinden biri, yaklaşık $2 \mu\text{M}$ 'lik bir aktivasyon sabiti (K_a) ile güçlü bir CA I aktive edici özellik gösteren histamindir ancak CA II izoformu için K_a , sadece $125 \mu\text{M}$ 'dir (Temperini ve ark., 2006; De Simone ve Supuran, 2012; Pala ve ark., 2015). Şekil 2.4.'te CA'nın çeşitli mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2.4. α -CA'ların katalitik (fizyolojik reaksiyon için), inhibisyon (çinko bağlayıcılarla) ve aktivasyon mekanizması (hCA I'in aktif bölgesindeki çinko ile etkileşen amino asitlerin numaralandırması) (Supuran, 2016).

CA I' in bugüne kadar ilaç keşfi sürecinde bazı sorunlarla karşılaşmıştır. Bunlar: CA I' in yavaş katalitik aktivitesi, ana inhibitör sınıflarına düşük duyarlılığı ve CA' ya karşı seçicilik ile ilişkili yapısal belirleyicileri uygun hale getirmenin zorluğudur (Temperini ve ark., 2006; De Simone ve Supuran, 2012; Pala ve ark., 2015).

2.2.1.2. Karbonik anhidraz II (CA II)

İnsan karbonik anhidraz II (hCA II) izoenzimi, moleküler ağırlığı 29,3 kDa olan bir çinko enzimidir. Çoğunlukla, pH 9,25 °C'de 10⁶/saniye turnover sayısı ile CO₂ + H₂O ↔ HCO₃⁻ + H⁺ reaksiyonunu katalize ettiği kırmızı kan hücrelerinde bulunur (Eriksson ve ark., 1988).

Sitozolik metaloenzim insan karbonik anhidraz II'nin kristal yapısı, altında katalitik olarak gerekli bir çinko iyonu bulunan kabaca küresel bir aktif alan boşluğunu ortaya çıkarır: Katalitik CO₂' lerin hidrasyonunun difüzyon kontrolü sınırının yakınında olduğu yer burasıdır. Fizyolojik pH'da çinko, üç histidin tortusu (His-94, His-96 ve His-119) tarafından koordine edilir ve hidroksit iyonu bir tetrahedral koordinasyon polihedronunu (çok yüzlü yapı) tamamlar (Nair ve Christianson, 1991; Lindskog, 1997).

CA II neredeyse tüm hücrelerde bulunur. Başlıca fonksiyonları arasında; antireflü savunması, kemik rezorpsiyonu (kemikte madde kaybı), sulu humor (göz iç sıvısı) üretimi, sperm motilitesi (sperm hareketliliği), idrar asidifikasyonu, koloni uyarıcı faktör sekresyonu (CSF salgılanması), gaz alışverişi ve CO₂'ye nazal kemosensitivite (burun kemoterapi duyarlılığı) yer alır (Hassan ve ark., 2013).

hCA II, inhibitörlerle etkileşim için en çok araştırılan izoformdur ve şimdiye kadar bildirilen en kinetik, spektroskopik ve kristalografik çalışmaların hCA II ile yapıldığı belirtilmiştir. Ayrıca bugüne kadar bildirilen tüm yeni CA inhibitör sınıfları (CAI), ilk önce bu izoform ile çalışırken keşfedilmiştir. Normalde anyonların zayıf hCA II inhibitörleri olduğu belirtilmiştir ancak bu araştırmalar önemlidir çünkü yeni güçlü CAI sınıflarının keşfedilmesine yol açmıştır. Diğer hCA II inhibitör sınıfları;

fenolleri, poliaminleri, sülfokumarinleri ve kumarinleri ve bunların türevlerini içerir. CA II'nin güçlü inhibisyon özelliği, yeni bir etki mekanizması ile antiglokoma ilaçlarına, etkin diüretiklere, akut dağ hastalığı (AMS)'na karşı ajanlara, antikonvülzanlara ve antitümör etkin maddelerine yol açabilir.

CA'ların aktivatör (CAAs) çalışmaları, hCA II ile yapılmıştır. Bütün memeli CA izoformları; çoğu aminler, amino asitler ve oligopeptitler olan çeşitli aktivatör sınıflarıyla aktivasyonları araştırılmış ve karbonik anhidraz aktivatörü (CAA) mekanizması 4-X-ışını kristalografik ve kinetik çalışması ile anlaşılmıştır. CA'lar tarafından katalize edilen CO₂ hidrasyon reaksiyonu için hız belirleme aşaması, enzimin çinko hidroksit türlerinin üretilmesiyle Zn (II) iyonuna bağlı sudan reaksiyon ortamına proton transfer reaksiyonudur. Birçok CA izoformunda bu sürece, proton transfer süreçlerine katılabilen aktif bir kalıntı destek olur, örneğin bir histidin kalıntısı aktif bölgenin ortasına yerleştirilir. hCA II ve birkaç insan izoformu için bu kalıntı; His4, His3, His10 ve His15 kalıntıları dahil olmak üzere His64'tür (Xiao ve ark., 2011; Supuran ve ark., 2015; Supuran, 2016).

2.2.1.3. Karbonik anhidraz enziminin diğer izoformları (CA III-XIV)

CA izoformlarından CA III, CA VII ve CA XIII sitozolik; CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV membrana bağlı; CA V (CA VA ve CA VB) mitokondrial ve CA VI salgı izoformudur (De Simone ve Supuran, 2012).

CA III, 25 ° C'de yaklaşık 8,10³ 1/sn'lik bir maksimum CO₂ hidrasyon devir hızı ile düşük katalitik aktiviteli (CA I ve II'ye göre) bir izoenzimdir. Sülfonamidlerin inhibisyonuna diğer CA izoenzimlerine göre daha az duyarlıdır. Esas olarak yavaş kasılma, kırmızı kas liflerinde meydana gelir; burada ana çözünür proteindir ve CO₂'nin doku kılcal damarlarına difüzyonunu kolaylaştırmada rol oynar. Ayrıca adipositlerde bu izoenzim yüksek konsantrasyonda bulunur. CA I ve CA II'nin aksine, CA III'ün 4-nitrofenil asetat hidrolaz aktivitesi neredeyse yoktur. Öte yandan, CA III'ün fosfataz aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Lindskog, 1997; Guler ve ark., 2015).

CA IV, kılcal damar sistemi ile ilişkilidir ancak alveoler epiteli ile ilişkili değildir (Henry ve Swenson, 2000). CA IV yüksek oranda aktif CA izoenzimidir. Göz iç sıvısı içerisinde bikarbonat iyonu (HCO_3^-) oluşumunu katalize ederek göz iç basıncını (GİB) düzenler (Esposito ve ark., 2000). Farklı doku dağılımlarına sahip hCA V'in iki izoformu, yani hCA VA ve hCA VB, vardır. hCA VA, esas olarak karaciğerde (hepatositler), iskelet kası ve böbreklerde bulunur. hCA VB çok daha geniş bir doku dağılımına sahiptir ve karaciğerde yokken pankreasta, böbreklerde, tükürük bezlerinde, omurilikte, kalpte ve iskelet kasında bulunur. İlaç şirketleri hCA V enzimlerine obezite tedavisi için yeni ilaç hedefleri olarak ilgi göstermiştir. pH ve iyon akışı kontrolünde rol oynar. CA V, ayrıca ürejenizde (ürepoezi olarak da bilinen amino asit metabolizmasından ve amonyağından üre üretimi) ve glukoneogenezde (karbonhidrat olmayan glikoz üretimi) rol oynar (Akdemir ve Akdemir, 2015).

CA VI; tükürük salgısı, gözyaşı, süt, *von Ebner* ve meme bezlerinden ekspres edilir. pH düzenleme, antireflü savunması, kanserojenlerden korunma ve tat alma başlıca fonksiyonları arasındadır. Merkezi sinir sistemi'nde bulunan CA VII, beyin omurilik sıvısı üretiminde rol oynar (Hassan ve ark. 2013).

CA IX; insanlarda ve bazı hayvanlarda bulunan izoenzimidir ve normal mide, bağırsakta ve safra mukozasında tespit edilmiştir. Karbonik anhidrazların işlevi genellikle asit-baz dengesi, solunum ve sıvı salgılanması ile ilişkilidir. CA IX ekspresyonunun artması ve bazı kolorektal (kalın bağırsak) tümörlerde gözlenen anormal lokalizasyonu, fonksiyonel olarak patogeneze (hastalık gelişimi/oluşumu) rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar CA IX'ın bir teşhis biyobelirteç olarak kullanılmasını önermiştir (Wingo ve ark., 2001).

CA XII; kolon, böbrek, prostat, bağırsak ve aktive olmuş lenfositler, belirli kanser türleri, göğüs, akciğer, göz, erkek akıntı kanalları ve üreme epitelinde ekspres edilir. pH düzenlenmesi, göz iç sıvısı üretimi, HCO_3^- emilimi, H^+ salgılanması ve testis sıvılarının konsantrasyonu ve asidifikasyonu şeklinde görevleri vardır. Tümör hücreleri ile ilişkili olan bu izoenzim, tümör hücreleri pH'lerini hem laktik asit

üretimi hem de hücre dışı katalitik alanlara sahip CO₂ hidrasyonu ile azaltır. CA XIII ise timüs, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kalın bağırsağın kolon bölümü ve testislerden eksprese edilir. Başlıca fonksiyonları; böbrek, mide-bağırsak ve üreme bölgelerindeki asit-baz dengesinin korunması ve pH regülasyonudur (Carta ve ark., 2009; Hassan ve ark., 2013).

CA VIII başlangıçta beyinde, özellikle Purkinje hücrelerinde tanımlandı ancak ekspresyonu; karaciğer, akciğer, kalp, bağırsak, timus ve böbrekler gibi organlarda yapılmıştır. CAX ve XI beyinde baskın olarak bulunur. CA XI'ın ayrıca gastrointestinal stromal tümörlerde aşırı eksprese edildiği ve çoğalmalarının teşviki gözlenmiştir. Serebellumdaki (beyincik) CA VIII'in güçlü ekspresyonu beyin fonksiyonunda rol oynadığını göstermiştir. CA VIII'in akciğer ve kalın bağırsak epitel hücrelerinde hücre çoğalmasında ve karsinogenezinde rol oynadığını gözlenmiştir (Supuran ve Capasso, 2015).

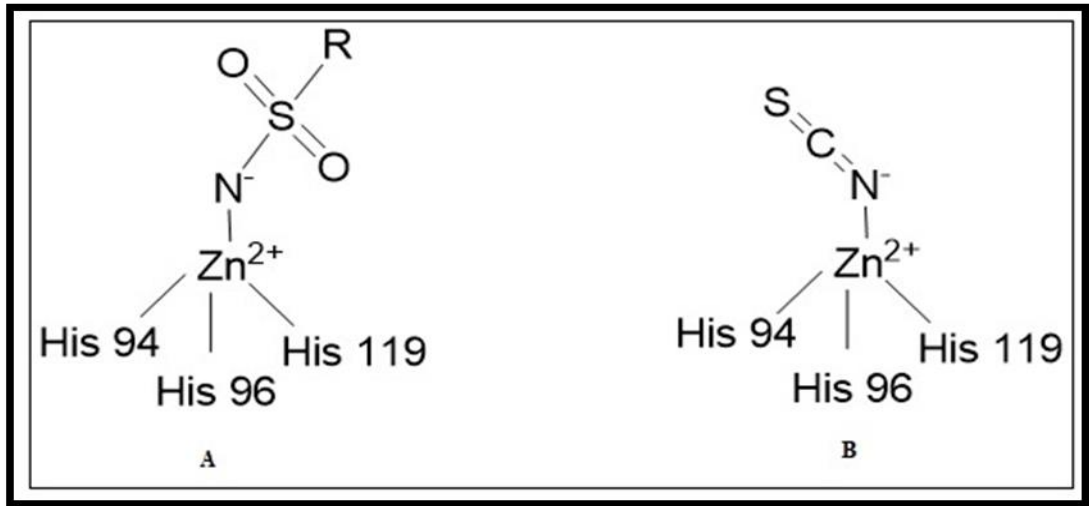
CA XIV, memeli α -CA ailesinin en son bulunan üyelerinden biridir. Hücre dışı bir CA izoformudur. Beyinde, kalpte, iskelet kasında ve karaciğerde oldukça fazla ekspresyon edilmiştir. Ayrıca düşük bir seviyede hCA XIV'in gözler, kolon, ince bağırsak, idrar kesesi, kemik osteoklastları (kemik hücreleri) ve omurilikte eksprese edilmiştir. İnhibitörler ve aktivatörler tarafından katalitik aktivite ve onun modülasyonu çalışmaları literatürde mevcuttur ve bu transmembran izozimi hedef alan spesifik bileşiklerin rasyonel ilaç tasarımı için iyi bir temel sağlar (Winum, 2015).

2.2.2. Karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri (CAI'ler)

Karbonik anhidraz inhibitörleri temelde iki ana sınıfa ayrılır: metal kompleks anyonları ve enzim Zn (II) iyonuna, protein olmayan çinko ligandı süstitüe veya metal koordinasyon küresine ekleyerek trigonal-bipiramidal türler üreten süstitüe olmayan sülfonamidlerdir (Supuran ve ark., 2003). Organik ve inorganik anyonlar, CAI'lerin önemli sınıflarından birini temsil eder. Anyon inhibitörleri hem birçok fizyolojik süreçte temel olan bu enzimlerin inhibisyon/katalitik mekanizmalarını

anlamak için hem de ve CA'ların dahil olduğu çeşitli hastalıkların yönetimi için klinik uygulamalara sahip yeni inhibitör tipleri tasarlamakta önemlidir (De Simone ve Supuran, 2012).

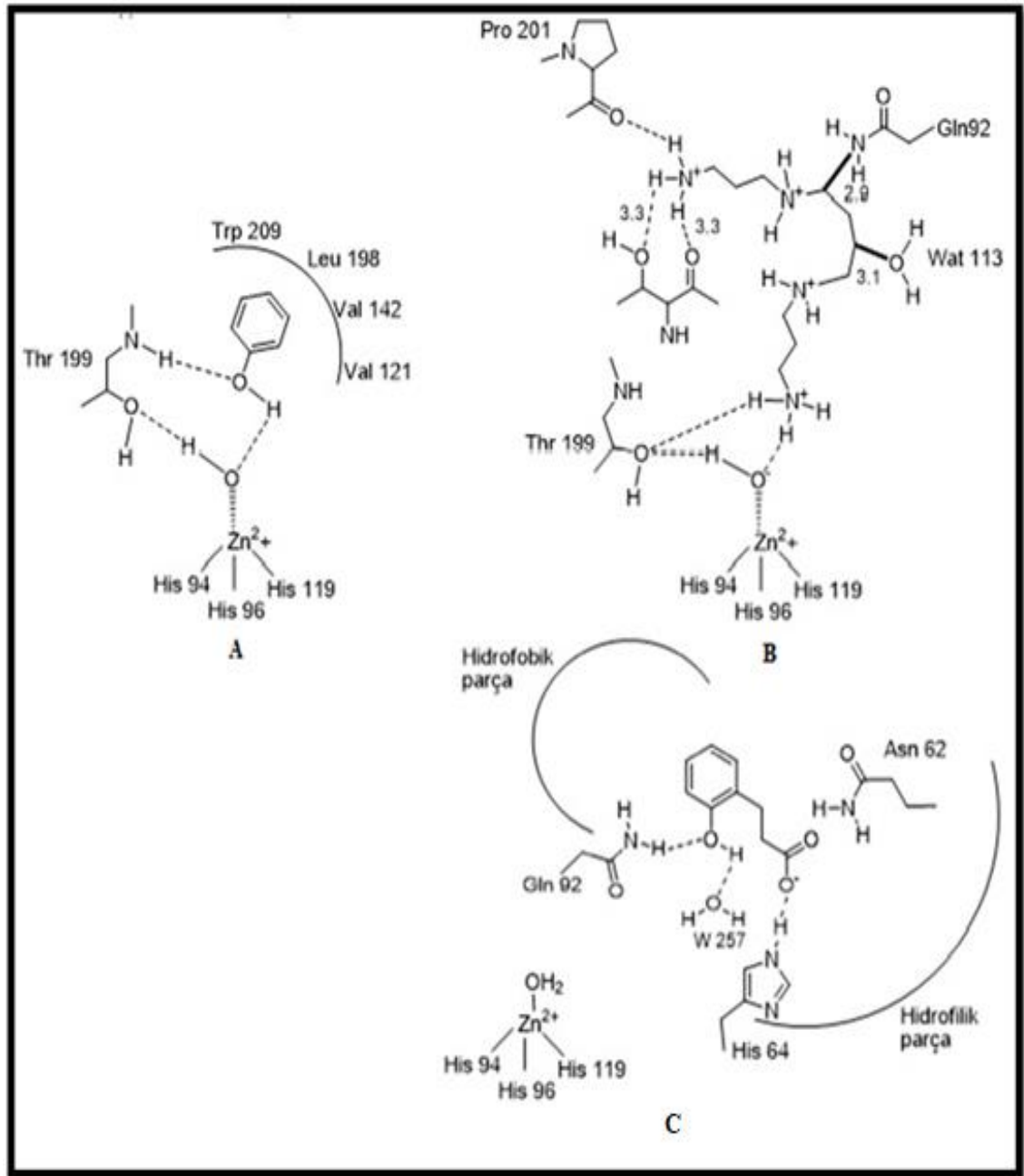
CAI'nın önemli bir diğer sınıfı olan ve topikal veya sistemik olarak uygulanan sülfonamidler, çeşitli hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Asetazolamid gibi sistemik sülfonamid CAI'leri, etkili antiglokom etken maddeleridir ancak bazı yan etkileri dolayısı ile kullanımları sınırlıdır. CAI'lerin gözlere topikal dozlaması, dorzolamid ve brinzolamid gibi suda çözünür ilaçlar ile mümkündür. Serbest bir amino grubuna sahip olan sülfonamidler, kolaylıkla türevlenebilir ve geniş bir biyomedikal uygulama alanına sahiptir. Özellikle son yıllarda primer sülfonamidler (RSO_2NH_2), kanser tedavisinde kullanılarak CAI'ler arasında önemli rol oynamaktadır. Antikonvülzan ve antiobezite faktörleri olarak da klinik kullanımları mevcuttur (Supuran, 2010; Efe, 2017). Şekil 2.5.'de sülfonamidler ve anyonik inhibitörler tarafından inhibe edilen karbonik anhidraz enziminin inhibisyon mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Sülfonamidler (A) ve anyonik (B) inhibitörler tarafından inhibe edilen CA enziminin inhibisyon mekanizması (Supuran ve ark., 2004).

Yukarıda anlatılan inhibitörler dışında bazı inhibitörler de mevcuttur: fenoller, poliaminler ve kumarinler sayılabilir. Fenoller, aktif bölgeden çinko ile koordine edilmiş su molekülüne/hidroksit iyonuna iki hidrojen bağı ile bağlanır. Poliaminlerin

fenollerden bağlanma farkı, Zn (II)'ye koordine edilmiş su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanmasıdır. Kumarinler ve tiyomumarinler ise Zn (II)'ye bağlı olmayan bir inhibisyon mekanizmasına sahip ve aktif bölgeye girişi tıkayan aktifleştirici maddeler ile aynı aktif alanda bağlanırlar (Şekil, 2.6., Supuran, 2010; Durdağı, 2011).



Şekil 2.6. İnhibitorlerin (Fenol (A), spermin (B) ve kumarin ve trans-2-hidroksisinamik asit (C) ler) bağlanma modelleri (Efe, 2017).

Son yıllarda tümör ile ilişkili izoformları CA IX ve XII'yi spesifik olarak hedef alan bileşiklerin elde edilmesi için çeşitli yaklaşımlar bildirilmiştir. Bunlar; floresan sülfonamidler, pozitif veya negatif yüklü bileşikler, hipoksi ile aktive olabilen bileşikler, şeker içeren sülfonamidler/sülfamat/sülfamitler ve CAI'lerle kaplı nanopartiküllerdir. Bunların arasında şeker yaklaşımı kullanılarak elde edilen bileşiklerin ikisinin de çok güçlü inhibisyona sahip olması nedeniyle en umut verici ve en çok araştırılan yöntemdir (Supuran, 2010).

Sonuç olarak CA enzimleri ve bu enzimin inhibitörlerinin dikkate değer olduğu, bu alanda uzun yıllar süren yoğun araştırmalardan sonra yeni ilaçlar, yeni tanı araçları ve yaşam bilimlerinin temel süreçlerinin daha iyi anlaşılması ve geliştirilmesi için fırsatlar sunmaya devam edecektir (Supuran ve ark., 2003).

2.3. Nanoteknoloji

2.3.1. Nanoteknolojinin tarihçesi

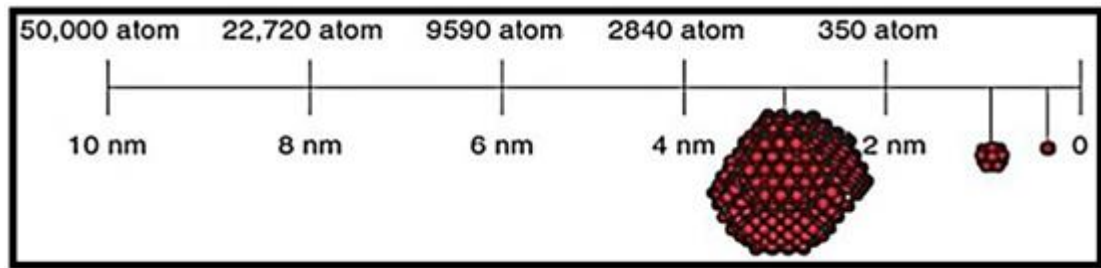
Nanoteknoloji; atomsal, moleküler yapılar düzeyinde fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesi, benzersiz olayların yeni uygulamalara olanak sağladığı 1 ila 100 nm arasındaki boyutlardaki maddenin anlaşılması ve kontrolü olarak tanımlanmaktadır (Hulla ve ark., 2015; Tunca, 2015).

“Nanometre” kavramı ilk kez kimya alanındaki 1925 Nobel ödülü kazanmış Richard Zsigmondy tarafından ileri sürülmüştür. Modern nanoteknoloji, fizik alanındaki 1965 Nobel Ödülü sahibi Richard Feynman'ın beyin çocuğuydu. 1959'da Caltech'teki Amerikan Fiziksel Toplum toplantısı sırasında atomik seviyede madde manipülasyonu kavramını tanıttığı, “There's Plenty of Room at the Bottom” (Altında bol oda var) konulu bir konferans sundu. Bu yeni fikir, yeni düşünme biçimlerini gösterdi ve Feynman'ın hipotezleri o zamandan beri doğrulandı ve dolayısıyla Feynman, modern nanoteknolojinin babası olarak kabul edilir. 21. yüzyılın başında ortaya çıkan nanobilim ve nanoteknoloji alanları oldukça ilgi gördü. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Feynman'ın yapısı ve maddenin atom düzeyinde

manipülasyon kavramı, ulusal bilim önceliklerini şekillendirmede önemli bir rol oynadı. Başkan George W. Bush, 21. Yüzyıl Nanoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Yasası'nı kanunla imzaladı. Mevzuat nanoteknoloji araştırmalarını ulusal bir öncelik haline getirdi ve Ulusal Teknoloji Girişimi'ni (NNI) oluşturdu (Hansen ve ark., 2008; Toumey, 2008; Choi ve Mody, 2009; Hulla ve ark., 2015). Günümüzde nanoteknolojik devrim, inşaat endüstrisi de dahil olmak üzere çeşitli bilim, mühendislik ve ticari sektörlerde çığır açan bir etki yaratmaktadır (Lee ve ark., 2010).

2.3.2. Nanoteknolojinin faydaları ve uygulama alanları

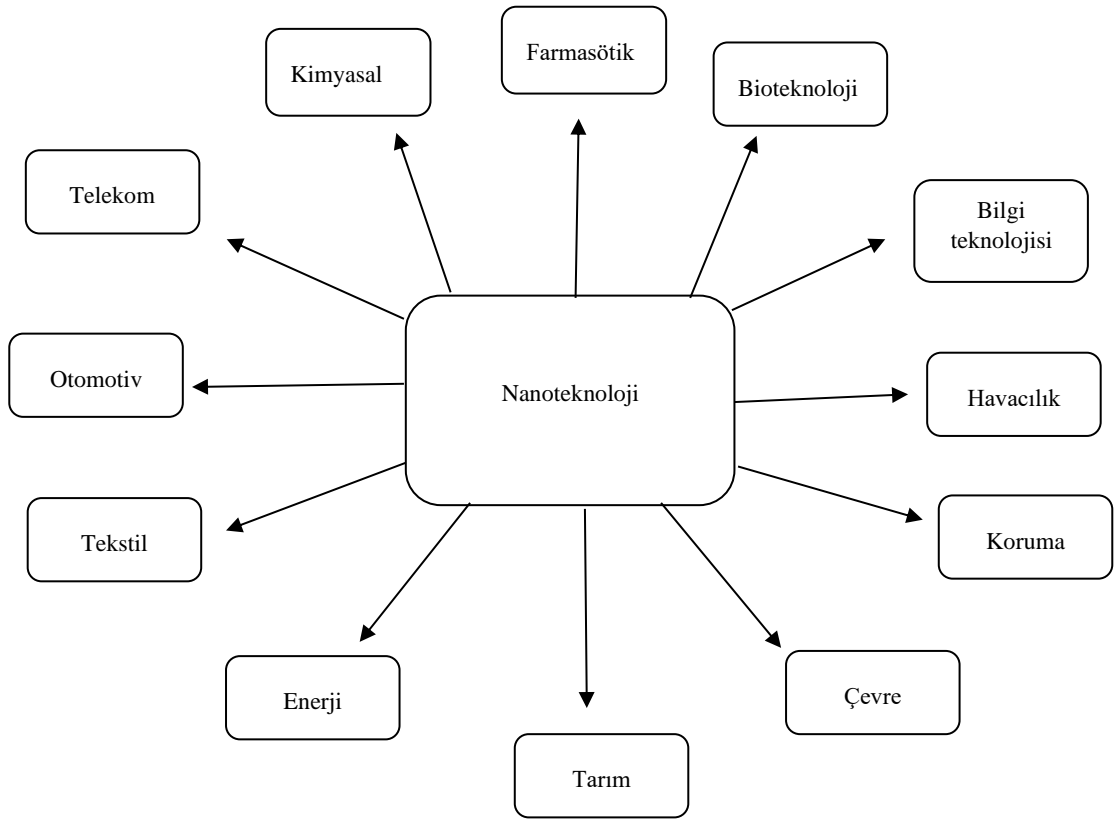
Yunanca ön eki “Nano”, “cüce” kelimesinden türetilmiştir. Mikrondan 1000 kat daha küçük olan, 10^{-9} boyutunda, küçülme anlamına gelir. Nanometre (nm) ölçeği, tipik olarak en az bir boyutta bir mikrometrenin onda birinden küçük ya da $10A^{\circ}$ 'ye eşdeğer veya bir metrenin milyarda biri ya da üç ila beş atom olarak tanımlanır. Bununla birlikte, nano ölçek terimi bazen 1 nm'den küçük malzemeler için bile kullanılır. Ayrıca 1 nm, insan saçı çapından 10^{-9} m veya 10,000 kat daha azdır. Şekil 2.7., çeşitli mikro ölçekli ve nano ölçekli nesnelere için boyut aralıklarını göstermektedir.



Şekil 2.7. Nano ölçekli maddelerin boyut aralıklarının karşılaştırılması (Nasrollahzadeh ve ark., 2019)

Eşsiz olguların yeni uygulamalara olanak tanıyan, kabaca “1-100 nm boyutlarında maddenin anlaşılması ve kontrolü” olarak adlandırılan nanoteknoloji, nano ölçekte morfolojik özelliklere sahip çalışma materyalleri nedeni ile nanomalzemeler alanında faydalı özelliklere sahip nanomalzemelere uygulanır. Bilim temelli bir yaklaşım ile türetilen nanobilim ve nanoteknoloji çok küçük nesnelere ve sistemlere uygulanır (Michelson, 2008; Nasrollahzadeh ve ark., 2019).

Nanoteknoloji; elektronikten gıdaya, kozmetik ürünlere ve ilaçlara kadar potansiyel uygulamalarla hızla büyüyen bir alan haline gelmiştir (Şekil 2.8.). Kimya, fizik, biyoloji ve mühendislik alanındaki araştırmalar nanoteknoloji alanının gelişmesini ve araştırılmasını sağlar. Tarım ve gıda sektöründeki uygulamalar, nanoteknolojinin kozmetiklerde, ilaç dağıtımında ve eczacılıkta, mikroelektronikte ve havacılıkta kullanılmasına kıyasla nispeten yenidir. Mikroelektronik, havacılık ve eczacılık gibi bazı endüstriler, nano ölçekli boyutta ticari ürünler üretmeye başlamıştır. Gıda endüstrisi, uygulamalarını keşfetmeye yeni başlasa da nanoteknoloji büyük bir potansiyel sergiliyor (Ahmad, 2012).



Şekil 2.8. Nanoteknolojinin potansiyel uygulama alanları (Nimesh, 2013)

Bölgelerin ve ulusların refahını yeniden tanımlayabilen, ekonomik bir lokomotif olarak tanımlanan nanoteknoloji, özellikle gelişmekte olan ekonomilerin kırsal kesimde karşı karşıya kaldığı bazı acil sorunlara (enerji üretimi ve depolanması, içme

suyunun sağlanması, tarımsal üretimin iyileştirilmesi ve depolanması ve tıp ve sağlık sektörü ihtiyaçları) çözüm sağlayabilir (Romig ve ark., 2007).

Nanoteknoloji, kullanılabilir enerjinin mevcut yetersizliği ve aradaki farkın daha da kötüleşmesi eğilimi olarak açıkça ifade edilebilecek enerji sorununa çeşitli yollarla (yenilenebilir enerji, yakıt hücreleri, enerji depolama, enerji transferi, enerji verimliliği, kaynak çıkarma ve yerel üretim) katkıda bulunma fırsatına sahiptir.

Nanoteknoloji sağlık alanında; teşhis, terapi ve cerrahlik adımlarında etkisini göstermektedir. Birçok teşhis teknolojisi, nanoteknolojinin katkılarından faydalanmaktadır. Nanoparçacıklara dayanan üstün kontrast ajanları, doku görüntüleme bir artış olduğunu göstermiştir. Terapide en göze çarpan gelişme, uyumsuz moleküllerin hedeflerine daha etkili bir şekilde teslim edilmesini sağlayan ve işlevsel olarak zenginleştirilmiş nanoyapılı ilaç ambalajlarının oluşturulması olmuştur. Nano yapıli kaplamaların sağladığı kontrollü ilaç yıkama kabiliyetine sahip implantlar da gösterilmiştir. Cerrahlikta minyatür cihazlar, ameliyatı daha az invazif hale getiriyor. Bununla birlikte temel cerrahi araçlarının, mikro ölçeğin altında minyatürleştirilmeleri muhtemel değildir ancak bunların kullanımı fizyolojik parametrelerin durum izlenmesinde ultra-sürtünmeli kaplamalar ve yerleşik sensörler gibi nano ölçekli özellikler ile artırılabilir (Ramsden, 2016).

Nanoteknoloji tekstil endüstrisinde çok yönlü uygulamalara sahiptir. Leke direnci, alev geciktirici, kırışıklık direnci, nem yönetimi, antibakteriler, antistatik ve UV koruması ve boyanabilirlik gibi birçok alanda iyileştirme yapabilmektedir. Bir tekstilin içine nanoparçacıkların eklenmesi; büzülme, kuvvet ve elektrik ve ısıli iletkenlik dahil olmak üzere birçok özelliği etkileyebilir (Mishra ve Militky, 2019).

Dünya genelinde gıda sektöründe nanoteknolojinin kullanımı; üretim, işleme, paketlenme ve güvenlik dahil olmak üzere birçok gıda alanını etkileme potansiyeline sahiptir. Gıda ürünlerinin nano ve mikro yapıları; gıdanın yapısı, korunması, dönüşümü ve imhası, gıda maddesinin fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Augustin ve Oliver, 2012).

Nanoteknoloji kozmetik endüstrisi için de ilgi odağıdır. Kozmetik ürünlerde nanopartikül formülasyonlarını kullanmanın en önemli avantajları: Nanopartiküller içinde kapsüllenen doymamış yağ asitleri, vitaminler veya antioksidanlar gibi çeşitli kozmetik bileşenlerin dengesini artırmak; Vitamin ve diğer antioksidanlar gibi belirli bileşenlerin penetrasyonunu arttırmak; UV filtrelerinin cilt üzerindeki yüzey etkinliğini ve toleransını artırmak; Ürünü daha estetik hale getirmektir (Sprando, 2010).

Nanoteknolojinin tarımda uygulama fırsatı oldukça önemlidir. On yılı aşkın sürede tarımdaki uygulamaları üzerine araştırmalar yapan nanoteknoloji bilimini, geleneksel tarım uygulamaları giderek daha yetersiz hale geldiğinden ve ihtiyaçlar karasal ekosistemin taşıma kapasitesini aştığı için, tarımın tüm sektörlerinde keşfetmekten başka seçeneğimiz yoktur (Mukhupadhyay, 2014).

Nanoteknoloji, toplumu olumlu veya olumsuz yönde değiştirme potansiyeline sahiptir. Nanoteknoloji paydaşlarının sosyal hedefe ulaşmak için bazı alanlarda çaba göstermeleri esastır. Yerel/küresel toplulukları teknolojinin uygun kullanımlarına yönlendirmek, toplumları teknolojik risk ve başarısızlıklara karşı uyarmak ve teknolojik bir dünyada sorunları çözmek için; bilinçli, etik kişisel karar verme ve liderlik gibi konularda geliştirme bu esaslar arasında yer alır (Khan, 2014).

Günümüzde nanoteknolojiye askeri alanda büyük yatırımlar yapılmaktadır. Büyük yatırımların başında yer alan Amerika Birleşik Devletleri, askeri araştırma–geliştirme (AR-GE) için küresel harcamaların üçte ikisini oluşturmaktadır. ABD Savunma Bakanlığı tarafından, savaş kıyafetleri ve savaşçılara insan üstü yetenekler kazandıran implantlar öne sürülen kullanımlar arasındadır (Altmann ve Gubbrud, 2004; Murphy, 2017).

Son zamanlarda nanobilim ve nanoteknoloji, su ekosistemlerinin çevresel restorasyonu için; önemli metaller, boyalar, farmakolojikler, fenoller, organik maddeler ve tarım ilacı gibi çeşitli tipik kirleticilerin giderilmesi ile ilgili başarılı

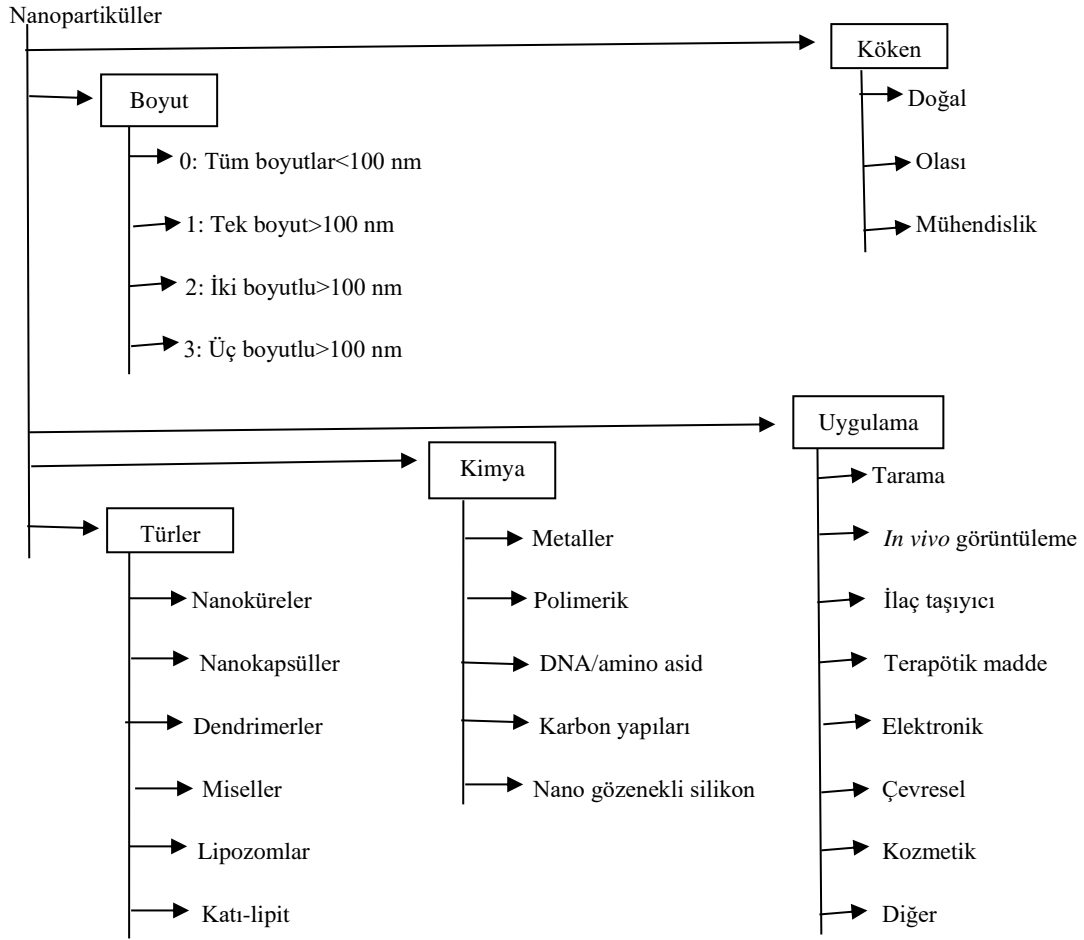
deneyler rapor eden çok sayıda yayınlanmış bildiri ile önemli roller üretmiştir. Sanayileşme ve kentleşmeye bağlı olarak atıksu üretimi ve deşarjı, tüm dünyada artmıştır. Atık su, alıcı su sistemine boşaltılmadan önce çevresel kirletici maddelerin uzaklaştırılması için, acil bir ihtiyaç vardır. Nanoteknoloji, gelişmiş su iyileştirme teknolojilerinde önemli bir yer edinmiştir ve bu alan endüstriyel atık su arıtımındaki gerçek uygulamalara doğru hızla artmaktadır (Gautam ve Chattopadhyaya, 2016). Ayrıca nanoteknoloji, yalnızca kirli suların arıtılması için, yöntemler sağlamakla kalmaz aynı zamanda su kirletici maddelerini algılamak ve izlemek (ticari nano bazlı sensör kitleri ile) için yeterli kapsam sağlar (Baruah ve ark., 2019).

2.3.3. Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10-1000 nm aralığında bir boyutta partikül dispersiyonları veya katı partiküller olarak tanımlanır (Mohanraj ve Chen, 2006). Nanopartiküller; boyutlarına, kökenlerine, kimyalarına, benzer türlerine ve uygulamalarına göre sınıflandırılabilir (Şekil 2.9., Singh, 2016).

NP'lerin avantaj olarak kabul edilen özellikleri ise şu şekilde sıralanabilmektedir: yüksek yüzey/hacim oranı, kuantum boyut etkileri, yüzey atomlarının eşsiz karakterleri ve elektronik yapısının boyut bağımlılığı olarak ön plana çıkmaktadır (Gürmen ve Ebin, 2008).

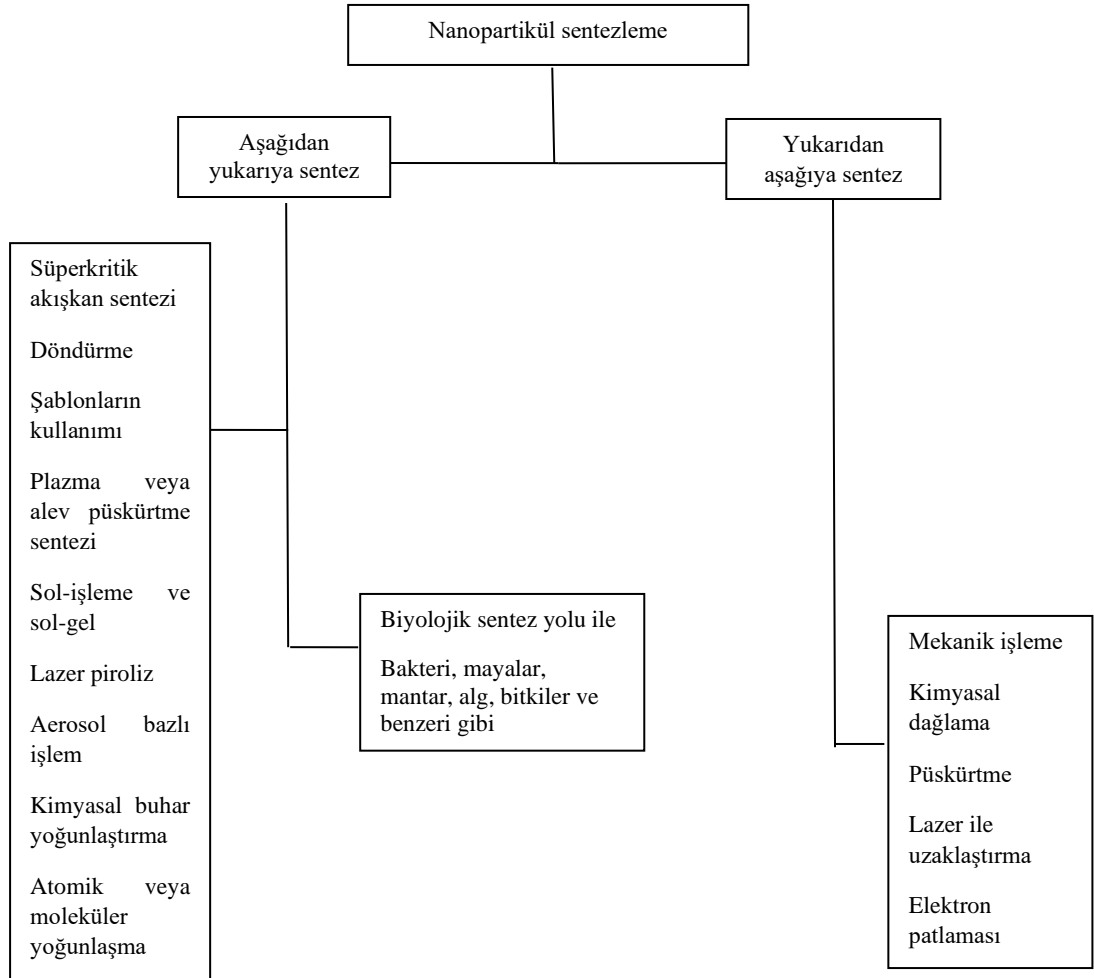
NP'lerin sentezi için çeşitli yöntemler kullanılabilir, bu yöntemler iki ana sınıfa ayrılır: (1) aşağıdan yukarıya yaklaşımı (*Bottom-up approach*) ve (2) yukarıdan aşağıya yaklaşımı (*Top-down approach*) dır (Gürmen ve Ebin, 2008; Khan ve ark., 2017).



Şekil 2.9. Nanopartiküllerin sınıflandırılması (Singh, 2016)

Aşağıdan yukarıya (*bottom-up*) sentez yönteminde, atomlar veya moleküller ile organik veya inorganik yapılar inşa edilir ve atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütürük partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanır (Beykaya ve Çağlar, 2015). Bu yaklaşımın örnekleri, sedimentasyon ve redüksiyon teknikleridir. Sol-jel, yeşil sentez, döndürme ve biyokimyasal sentezi içerir. Bu alanda organizmaların kullanımı, artan başarılar ve nanoparçacıkların oluşum kolaylıkları nedeniyle hızla gelişmektedir. Ayrıca metal nanoparçacıkların biyosentezi; sert, toksik ve pahalı kimyasalların kullanımı olmadan çevre dostu bir yöntemdir (yeşil kimya). Örneğin, kimyasal indirgeme (hidrazin hidrat, sodyum boro-hidrit, DMF ve etilen glikol) ile gümüş nanoparçacıkların üretimi, toksiklik sorununu artıran nanopartiküllerin yüzeylerinde sert kimyasalların emilimine yol açabilir. Nanoparçacık sentezinde kullanılan organizmalar, basit prokaryotik bakteriyel hücrelerden kompleks ökaryotlara kadar çeşitlilik gösterir.

Son derece stabil ve iyi karakterize edilmiş nanopartiküller üretme sürecinde, bazı önemli noktalara (organizmaların seçimi, hücre büyümesi ve enzim aktivitesi için en uygun koşullar ve optimal reaksiyon koşulları) dikkat edilmelidir (Iravani, 2011; Khan ve ark., 2017). Şekil 2.10.'da bu yaklaşımların reaksiyon koşulu ve benimsenmiş protokoller temelinde çeşitli alt sınıfları gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımları ile NP tipik sentetik sentezleme yöntemleri (Iravani, 2011).

Yukarıdan aşağıya (*Top-up*) yaklaşımı, çeşitli yöntemler (makinelere, asitler, kimyasal vb.) kullanılarak nano yapıların üretilmesidir. Bu yaklaşımın sentezleme yöntemlerine; öğütme/frezleme, dağlama, elektro patlatma, püskürtme ve lazer ablasyonu (lazer ile uzaklaştırma) teknikleri örnek verilebilir. Bu tekniklerde ele

alınan kütleli malzeme şekillendirildikten sonra yapısı oluşturulur ve yeniden düzenlenerek istenilen ürün elde edilir (Ates ve Bahceci, 2015; Khan ve ark., 2017).

Nanopartiküllerin karakterizasyonu; morfolojik, yapısal, partikül büyüklüğü ve yüzey alanı gibi özelliklerin incelenmesini ifade eder (Singh, 2016; Khan ve ark., 2017). Nanopartiküllerin ultra ince boyutu, NP'lerin en önemli fonksiyonlarından biridir. Örneğin, daha ince partiküller biyolojik membrandan daha kolay emilmeye uygundur. Nanopartiküllerin geniş spesifik yüzey alanı, nanopartiküllerin yüzey ve iç yapıları kontrolün dışında, morfolojik bakış açısından partiküller ve çevreleri arasındaki kütle ve ısı transferi ile ilgili reaktivite, çözünürlük, sinterleme performansı vb. için önemli bir özelliktir (Yokoyama, 2018). Nanopartiküller genellikle taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi ileri mikroskopik teknikler kullanılarak boyutları, morfolojileri ve yüzey yükleri ile karakterize edilir. Partiküllerin ortalama çapı, boyut dağılımları ve yükleri, fiziksel stabiliteyi ve nanopartiküllerin *in vivo* dağılımını etkiler (Pal ve ark., 2011; Lin ve ark., 2014; Kestens ve ark., 2016).

Nanopartiküller; termal özellikler, elektromanyetik özellikler, optik özellikler ve mekanik özellikler bakımından çeşitli benzersiz özelliklere sahiptir (Yokoyama, 2018). Nanopartiküller, genellikle metallerin ortak elektron tabakasının kalınlığını sınırlayacak kadar küçük oldukları için, belirli optik özelliklere sahiptir. Bu durum, kuantum etkiler yaratır. Altının sarı ve silikonun gri olduğu yaygın bir bilgi olmasına rağmen altın ve silikon nanopartikülleri parlak kırmızı ve siyahtır. Ayrıca altın nanoparçacıkları, 1,064 °C'da eriyen altın levhalardan çok daha düşük bir sıcaklıkta erir. Parçacıklar küçüldükçe, güneş enerjisi emme verimliliği artar (Christan ve ark., 2008; Strambeanu ve ark., 2014). Parçacık yüzeyinde bulunan atomlar ve moleküller nanometre düzeninde etkili olduklarından, malzemenin erime noktası, dökme malzemeninkinden düşer çünkü daha düşük sıcaklıkta daha kolay hareket etme eğilimindedir. Nanopartiküller, birçok elektronik cihaz için hammadde olarak kullanılır. Bu nanopartiküllerin elektriksel özellikleri ve partikül büyüklüğü, ürün performansının iyileştirilmesinde büyük rol oynamaktadır. Nanopartiküller mekanik

açından incelenecek olursa, kristal malzemelerin sertliği genellikle azalan kristal boyutunun azalması ile birlikte arttığı ve metal ve seramik malzemenin yapısını mikronize ederek veya nano aralıkta bunları oluşturarak malzemelerin mekanik mukavemetinin önemli ölçüde arttığı bilinmektedir (Yokoyama, 2018).

2.3.3.1. Nanopartiküllerin toksisitesi

Nanopartiküller, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı insan ve çevre sağlığı üzerinde çeşitli toksik etkiler yaratır (Dreher, 2004; Pandey ve Prajapati, 2017). Çoğunlukla nanopartiküllerin toksisitelerinin belirlenmesinde; nanopartiküllerin boyutları, konsantrasyonu ve hücreler ile olan yüzey etkileşimleri önemli rol oynar (Perihan, 2014).

Mesleki ve çevresel anlamda maruz kalmanın ana yolları; cilt, gastrointestinal (mide-bağırsak) sistemi ve solunum sistemidir. Bu sistemlere, enjeksiyon (ilaçlar) ve nanopartiküller içeren implantlarla ulaşılabilir. Dermal maruz kalma, kozmetiklerde mevcut olan birçok metal nanoparçacık için ana maruz kalma yoludur. Yutma işlevi, tıbbi görüntüleme, terapötikler ve yiyecek amaçlı nanoparçacıklara maruz kalmanın yoludur. Havadaki nanoparçacıklar ise (işyeri veya çevre) vücuda solunum yolu ile girer. Çeşitli yollarla nanopartiküllere maruz kalmak lokal ve hatta sistemik zararlı etkilere yol açar (Singh, 2016; Maskos ve Stauber, 2017). Bazı nanopartiküllerin kanserojen olduğu kanıtlanmış, endüstriyel ve biyolojik yönlerde kullanımlarına sınırlama gelmiştir (Pandey ve Prajapati, 2017).

Nanopartiküller çevreye, bilinçli veya kaza ile atılmaktadır. Çevrede, aerosol ve uçucu nanoparçacıklar atmosfere girer, iyonize ve polar parçacıklar suda çözünür ve hidrofobik parçacıklar çökerek toprağa bağlanır ve buraya yerleşir. Nanoparçacıklar suda yaşayan organizmalara ulaşmalarının potansiyel yolları; solungaç, koku alma organları ve vücut duvarları ile epitelyal sınırlarının içine girerek ya da doğrudan organizma tarafından yutulularak ulaşır. Nanoparçacıkların sucul biyota içerisine

alınması, gıda zincirlerinde biyolojik olarak birikebileceği için bu durum büyük endişe yaratmaktadır (Singh, 2016).

Gelişmiş kontrol sistemleri kullanmak, çeşitli tedbirleri almak ve iyi iş uygulamalarını kullanarak nanomalzemelerin tehlikeli etkileri büyük ölçüde ortadan kaldırılabılır veya en aza indirilebilir (Khan ve Asmatulu, 2013).

2.3.3.2. Nanopartiküllerin uygulama alanları

Nanopartiküller, çeşitli amaçlar için uygulanabilmektedir. Nanoteknolojideki son gelişmeler, tanı ve tedavi uygulamaları için çeşitli nanoparçacık formülasyonlarının geliştirilmesini sağlamıştır. Teşhis nanoparçacıkları, patolojileri görselleştirmeyi ve çeşitli hastalıkların ve hastalık tedavilerinin önemli (pato-) fizyolojik prensiplerinin anlaşılmasını geliştirmeyi amaçlar.

Terapötik nanopartiküller, patolojik alanda farmakolojik olarak aktif etkin maddelerin birikmesini ve salınmasını iyileştirmeyi, terapötik etkinliği arttırmayı ve sağlıklı dokularda lokalizasyonlarını azaltarak yan etkilerin görülme sıklığını ve yoğunluğunu azaltır (Baetke ve ark., 2015).

Nanopartiküller, biyomedikal uygulamalar için son yıllarda en çok araştırma yapılan alanların başında gelir. Onkoloji alanında, nanopartiküller ve özellikle manyetik nanopartiküller; teşhis, ilaç salınımı, gen dağılımı, bioayırma, hipertermi, fototerapi, kemoterapi ve görüntüleme mekanizmaları için incelenmiştir (Ahmed ve ark, 2012).

Nanopartiküllerin tıptaki en yaygın uygulamalarından biri, özellikle antitümör aktivitesine sahip ilaçlar için ilaç taşıyıcılarıdır. İlacın vücutta nasıl salınacağı ve ilacın nano taşıyıcıya nasıl sokulduğu oldukça önemlidir. Kapsülleme, adsorpsiyon, çözünme veya nanotaşıyıcıların yüzeyinde veya içine tutturmak gibi örnekler literatürde verilmiştir (Zhang ve ark., 2008; Pircalabour ve ark, 2019; Zarif ve ark.,

2019). Nanopartiküller, geleneksel tıbbın dezavantajlarının üstesinden gelmeyi sağlar. Bu avantajlar; salınan ilaçlar alana özgü hedeflidir, erken bozulmaya karşı korunumludur ve ilaç salınımı uzun safhada gerçekleşir (Metin ve Özdemir, 2015; Pircalabour ve ark, 2019).

NP'ler, gen tedavisinde eksik veya hastalıklı genlerin yerini almak için dağıtım cihazları olarak kullanılmaktadır. Gen tedavisi için NP'lerin kullanımı; kanser, viral enfeksiyonlar ve bazı kalıtsal hastalıklar gibi hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olsa da, katyonik NP uygulamasının güçlü immünolojik tepkileri gösterdiği bilinmektedir ve bu stratejilerin genel güvenliği ve etkinliği halen araştırılmaktadır (Missaoui ve ark, 2018).

Nano boyutun biouyumluluk özelliği sebebiyle, doku mühendisliği ürünlerinin gelişiminde de önemli rol oynamıştır. Bu alandaki uygulamalar; ilaç kapsülleme, kemik replasmanları, protezler ve implantlar sayılabilir (Salata, 2004; Nasrollahzade ve ark., 2019).

Nanopartiküller, diş hekimliğinin pek çok alanında kullanılmaktadır. Çürük kontrolü ve remineralizasyon, ilaç salımı, kök kanal dezenfeksiyonu, dentin hassasiyetinin giderilmesi, biyofilm oluşumunun önlenmesi, periodontal enfeksiyon gibi alanlarda kullanılmasına rağmen bazı NP'ler oral ve diğer dokular için toksik etki yaratabilir. NP'lerin, uzun süreli toksik, antimikrobiyal, klinik ve fiziksel etkileri, dental alanda daha geniş çapta araştırılmalıdır (Perihan, 2014).

Günümüzde daha birçok alanda karşımıza çıkan nanopartiküllerin, tıp ve sağlık (biomedikal) alanındaki uygulamaları, çare bulunamamış pek çok hastalığın teşhis ve tedavisinde önemli katkılar sağladı ve sağlamaya devam edecektir.

Bu tez çalışmasında, grafen (G), grafen oksit (GO) ve grafen oksitli türevli nanopartiküllerin (1p, 2p ve 3p), insan karbonik anhidraz I ve II üzerinde inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Öncelikle insan eritrositlerinden CAI ve CAII izoenzimleri

afinite jeli (Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonilamid) kullanılarak saflaştırıldı. Kalitatif ve kantitatif protein tayini yapıldı ve SDS-PAGE elektroforezi ile enzimlerin saflığı kontrol edildi. Daha sonra bu enzimlerle kinetik çalışmalar yapıldı. Bileşiklerin (grafen, grafen oksit, 1p, 2p ve 3p) inhibisyon etkisini belirlemek için hCA I ve II'nin esteraz aktivitesi ölçüldü. İnsan karbonik anhidrazların, esteraz aktivitesi üzerinde grafen oksit ve grafen oksit metalli türevlerin (1p, 2p ve 3p), inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren bileşikler için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulunmuştur.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler; Sefaroz-4B, p-nitrofenil asetat, standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin (TEMED), diyaliz torbası ve L-Tirozin Sigma Chemical Company'den; sülfanilamid, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2- merkaptoetanol, brom timol mavisi, hidroklorik asit, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, metanol, aseton, etanol, izoproponal, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250 ve R-250 ve diğer kimyasal maddeler E. Merk. AG'den; karbondioksit gazı piyasadan temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer
pH metre	Crison MM41 Multimeter
Santrifüj	Thermo Scientific
Peristaltik pompa	Gilson Minipuls 3
Karıştırıcı	WiseMix VM-10
Hassas terazi	OHAUS Pioneer
Otomatik pipet	ISOLAB Seti
Güç kaynağı	Consort EV265 Elektrophoresis Power Supply
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-20)	Arçelik Dikey Derin Dondurucu

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanması

1. 0,05 M Tris-SO₄, pH 7,4 (esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 950 mL distile su içerisinde 6,055 g Tris çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

2. *p*-nitrofenilasetat çözeltisi: 1 mL aseton içerisinde 27,2 mg *p*-nitrofenilasetat çözüldükten sonra 49 mL saf suya azar azar katılarak hazırlandı.

3. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄ çözeltisi, pH 8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 950 mL distile suda 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄ çözülerek 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye titre edildi. Daha sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

4. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ çözeltisi, pH 8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 mL distile suda çözüldü. 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye getirildikten sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.

5. 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl çözeltisi, pH 6,3 (kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp pH 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 mL'ye distile su ile tamamlandı.

6. 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ çözeltisi, pH 5,6 (kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g NaClO₄ ve 2,04 g CH₃COONa.3H₂O, 120 mL distile su içerisinde çözüldü. 0,1 N HCl ile pH'sı 5,6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

7. 0,2 M NaHCO₃ çözeltisi, pH 8,8 (Sefaroz-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO₃, 950 mL distile suda çözülerek 0,1 N NaOH ile pH 8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

8. 0,2 M NaHCO₃ çözeltisi, pH 10 (Sefaroz-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO₃, 950 mL distile suda çözülerek 0,1 N NaOH ile pH 10'a titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

9. Sülfanilamid çözeltisi (afinite jeli hazırlanırken kullanılan çözelti): 25 mg sülfanilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldükten sonra 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'daki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katılarak hazırlandı.

10. Coomassie Brilliant Blue çözeltisi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi, 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Çözeltiye % 95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini

Deneyde kullanılacak sağlıklı insan kanı, Ağrı Devlet Hastanesi Kan Merkezi'nden temin edildi ve numune kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

3.2. Metodlar

3.2.1. Protein tayini

Protein tayini, kalitatif protein tayini ve kantitatif protein tayini olmak üzere iki yöntemle yapılmıştır.

Kalitatif protein tayini, Warburg yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu metotta, proteinlerin ihtiva ettiği tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Aynı hacimdeki bütün elüsyonlarda, Sefaroz-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemlerinden

sonra protein tayini yapıldı ve kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometre ile absorbansları 280 nm’de köre karşı okundu.

Kantitatif protein tayininde afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki, hemolizattaki protein miktarları belirlendi. Bu metod, 595 nm’de maksimum absorbans gösteren “Protein-Coomassie Brilliant Blue G-250” kompleksinin oluşumu esasına dayanır. Kompleks bileşenlerinin bağlanması oldukça hızlı gerçekleşir ve çözeltilerde uzun süre kalır. Bu metodun duyarlılığı, 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu yol izlendi: 1 mL’ sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albümin çözeltisinden tüplere; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Distile su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlandı. 4900 µl renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile yeterince karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. 0,1 mL aynı tampon ve 4,9 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kör olarak kullanıldı ve absorbans-µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

3.2.2. Enzim aktivitesi tayini

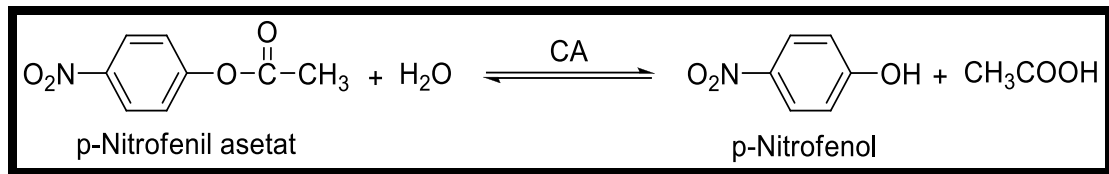
3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini

CA enzimi üzerinde inhibitörlerin etkisini araştırmak için bu metod kullanıldı. Metod, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorbans veren *p*-nitrofenolat veya *p*-nitrofenol’a hidrolize eder ($\epsilon_{348}=5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Şekil 3.1.).

Fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir çünkü 348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi de aynı absorbans değerini göstermektedir. 348 nm dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan kör olarak kullanılmaktadır.

Tayin işlemlerinde şu yol izlenmiştir: 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim kuvartz küvetlere konulduktan 3 dakika sonra 25 °C'de 348 nm'de absorbansı okundu.

Spektrofotometre daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak karışımın 3 dakika sonraki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Böylece 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve *p*-nitrofenilasetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise azaltılan suyun miktarı kadar inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.



Şekil 3.1. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması (Verpoorte et al. 1976)

Deneyde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi günlük hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL distile suya azar azar ilave edildi. Esterin sınırlı çözünürlüğünden bu çözelti 3 mM' dir ve daha derişğini hazırlamak mümkün değildir. Asetonun tercih edilme sebebi ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe etmesidir.

3.2.3. Enzim saflaştırma çalışmaları

3.2.3.1. Hemolizatın hazırlanması

Santrifüj tüplerine alınan insan taze kanı, +4 °C'de 2500xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj uygulamasından sonra tüplerin üst bölümünde kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı. Tüplerin alt bölümünde kalan eritrosit peleti ise 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Taze kana her defasında aynı işlem uygulandı. İşlemler sonucunda elde edilen eritrositler, hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu distile su ile karıştırılarak hemoliz edildi. Eritrosit hücre zarlarını hemolizattan uzaklaştırmak için +4 °C'de 20,000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Hemolizatın üst kısmı damlalıkla alındı ve sonraki

çalışmalarda kullanılmak üzere belirli koşullarda saklandı (Hunaiti *and* Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

3.2.3.2. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hemolizat (pH 8,7) ile katı Tris kolona uygulandı ve kolon, 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,3) tamponu uygulanarak hCA I enzimi, daha sonra, 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi kullanılarak hCA II enzimi elüe edildi (Türkoğlu ve ark., 2017). Elde edilen elüatlar, fraksiyon toplayıcıları ile 5' er mL halinde tüplere konulduktan sonra 280 nm' deki absorbanlarına bakıldı. Kolonun akış hızı ise peristaltik pompa yardımıyla 20 ml/saat'e ayarlandı.

3.2.4. hCA enzimi için IC₅₀ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

CA enzimini elde etmek amacıyla hastaneden alınan insan kan örnekleri saflaştırıldı. IC₅₀ değerlerini belirlenmek için farklı inhibitör konsantrasyonları kullanıldı ve aktivite ölçümleri optimum koşullarda yapıldı. Leneweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten faydalanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. Çalışmada kullanılan grafen, 1p, 2p ve 3p maddeleri 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde etanol ile çözülerek stok çözelti hazırlandı. 10 kat seyreltme yine etanole yapıldı. 100 kat seyreltme işlemi ise saf su ile gerçekleştirildi. Grafen oksit ise saf suda çözülerek stok çözelti ve seyreltme işlemleri gerçekleştirildi.

3.3. Grafen ve Grafen Oksit Türevlerinin Sentezi

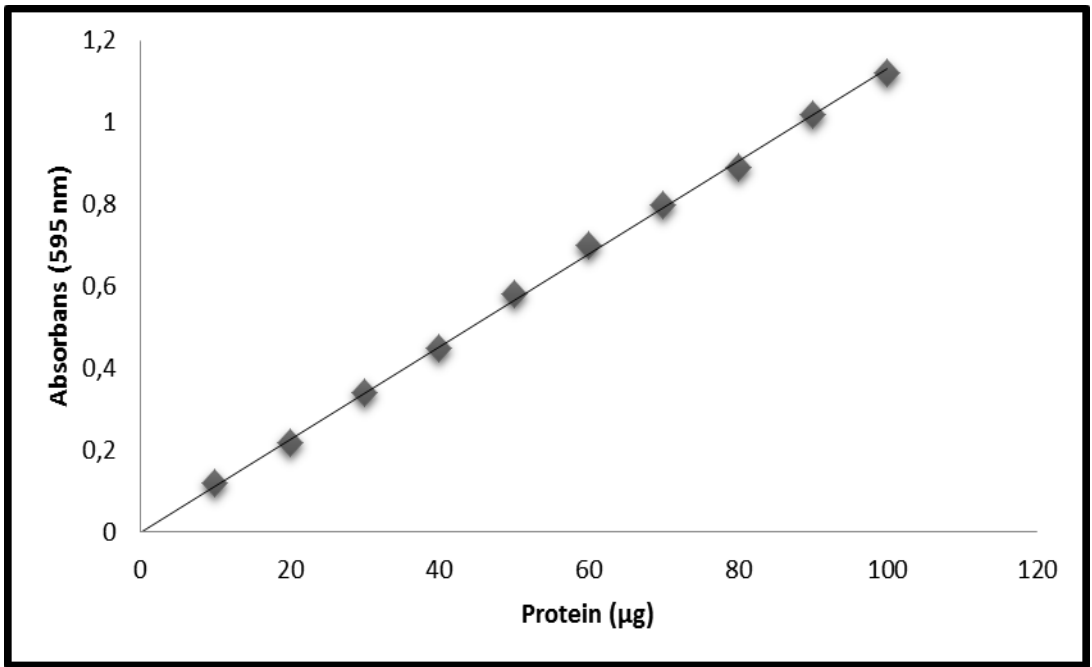
Grafen ve grafen oksit (Batır ve ark., 2017; Batır ve ark., 2018) ile grafen oksitin metal türevleri olan 1p (Co-Ni, otoklavda sentezlenmiş nanopartikül, 2p (Co-Ni nanopartikül) ve 3p (Co-Ni, geri soğutucuda sentezlenmiş nanopartikül) sentezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Gökhan Güven BATIR tarafından Atataürk Üniveristesi, Fen Fakültesi, Kimya

Bölümü, Fizikokimya araştırma laboratuvarında sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemiyle elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini yapıldı. Öncelikle standart grafik hazırlandı. Daha sonra hazırlanan standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1.).

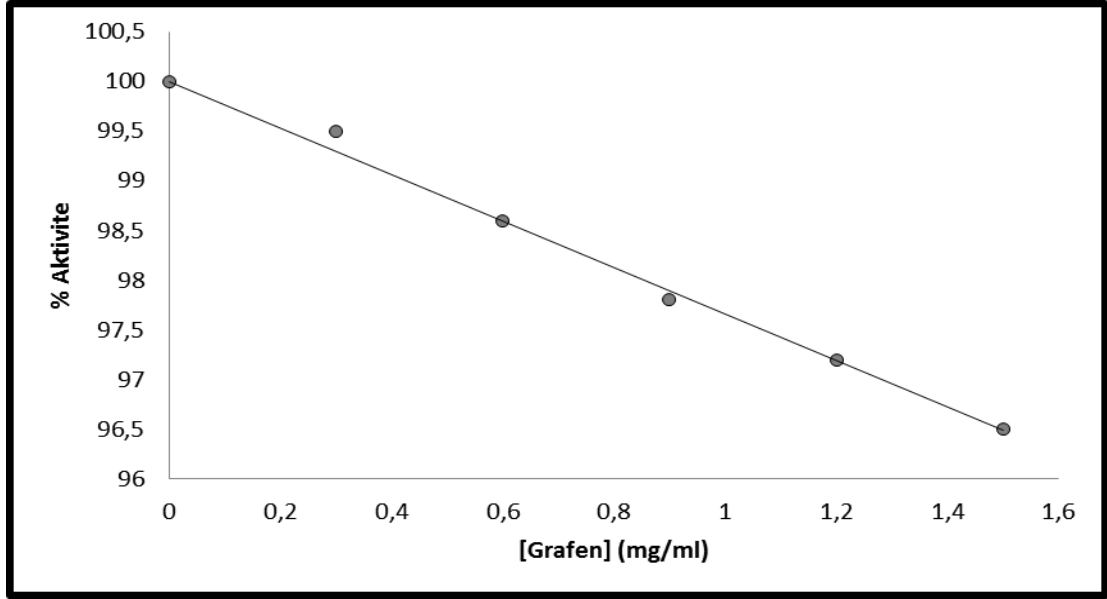


Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.

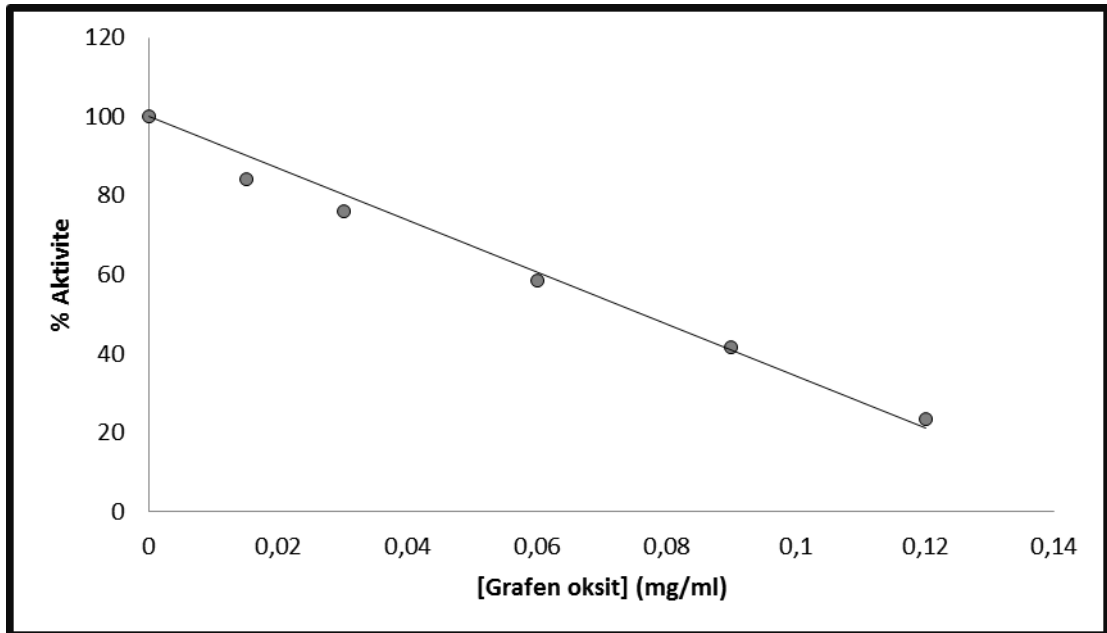
4.2. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine Nanopartiküllerin Etkilerinin Belirlenmesi için Yapılan Çalışmaların Sonuçları

4.2.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren nanopartiküller ile ilgili sonuçlar

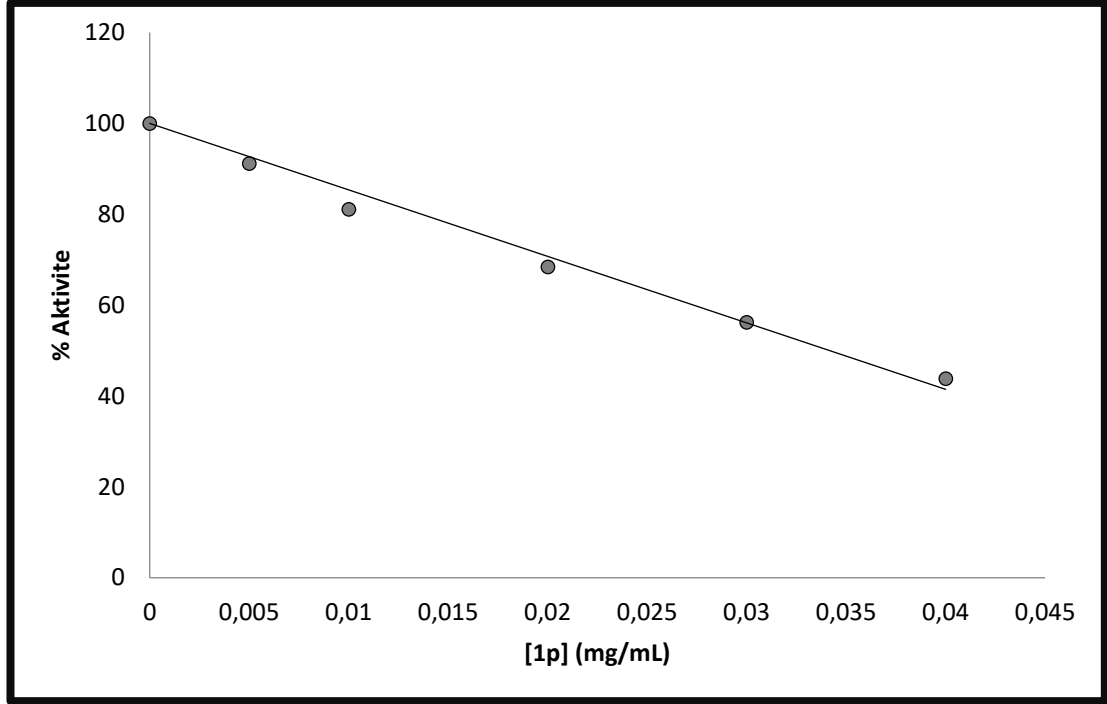
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için 5 farklı nanopartikülün etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivitesi tayini yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir nanopartikül için % aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden % 50 enzim inhibisyonuna sebep olan nanopartikül konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplandı (Şekil 4.2.-4.6.).



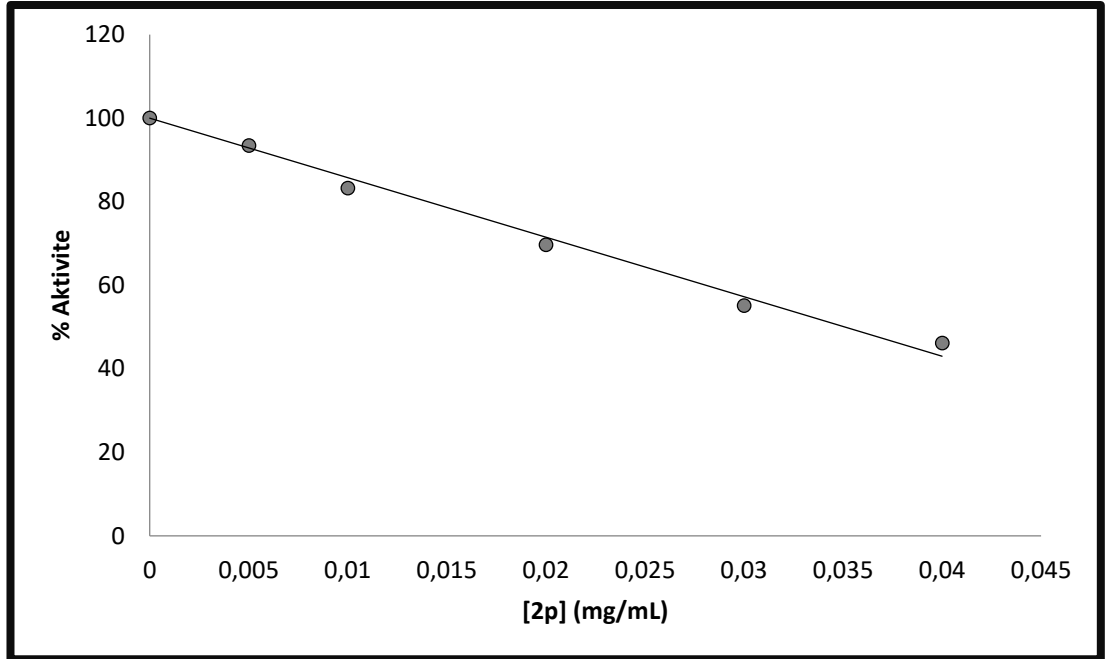
Şekil 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafen] grafiği.



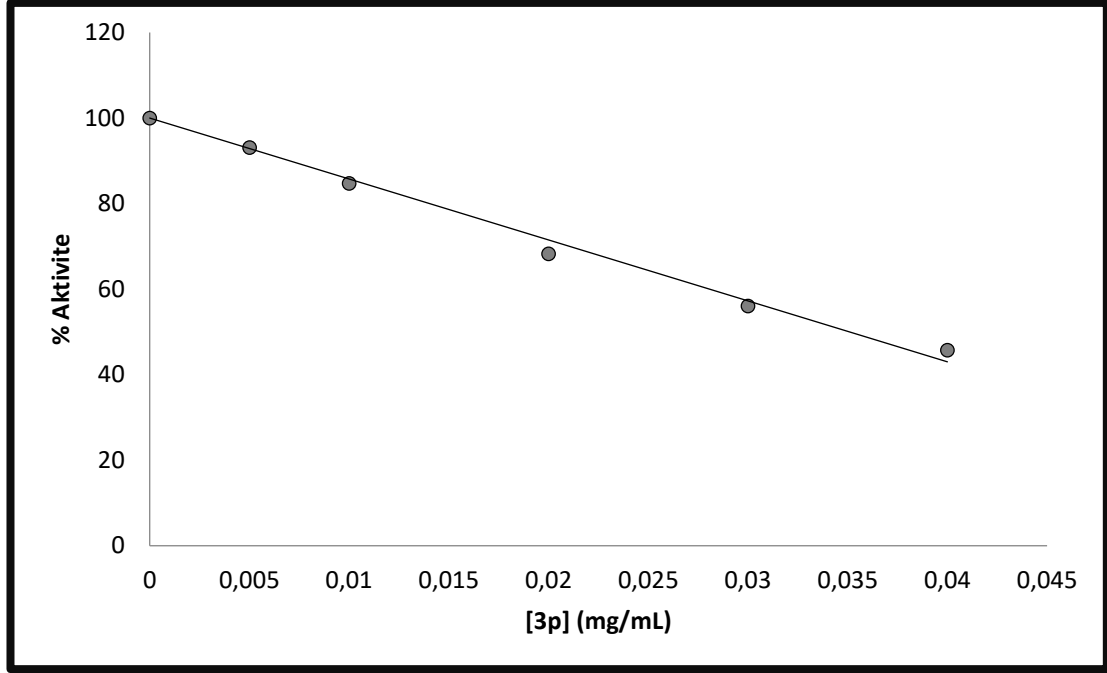
Şekil 4.3. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafen oksitin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafen oksit] grafiği.



Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1p NP'nin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1p] grafiği.



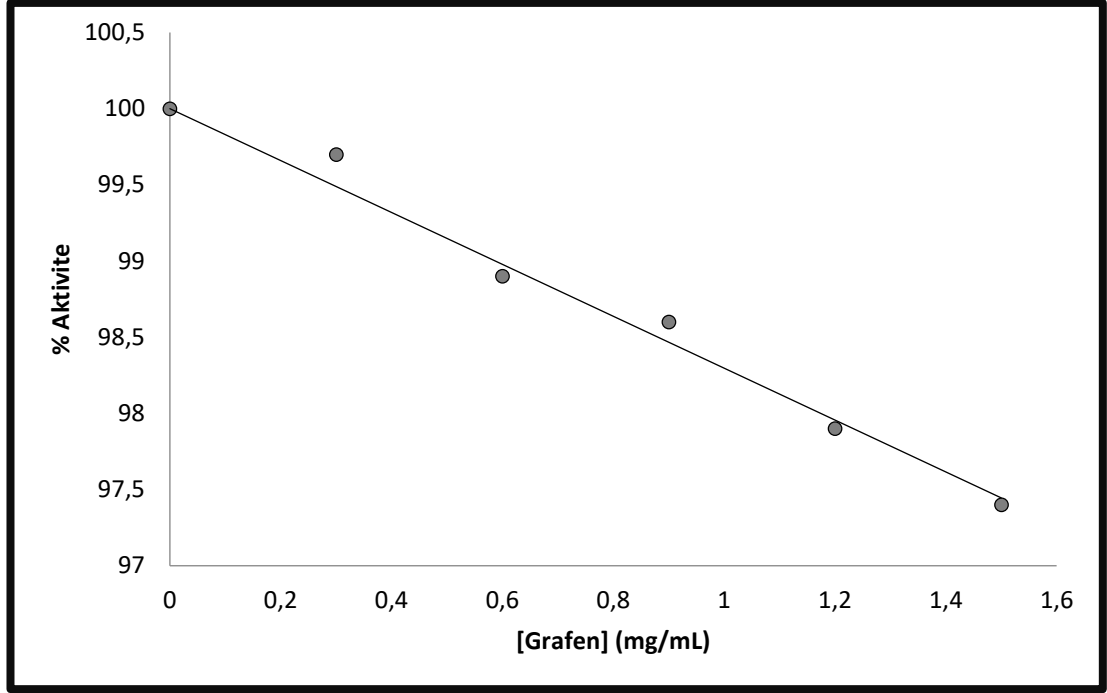
Şekil 4.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2p NP'nin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2p] grafiği.



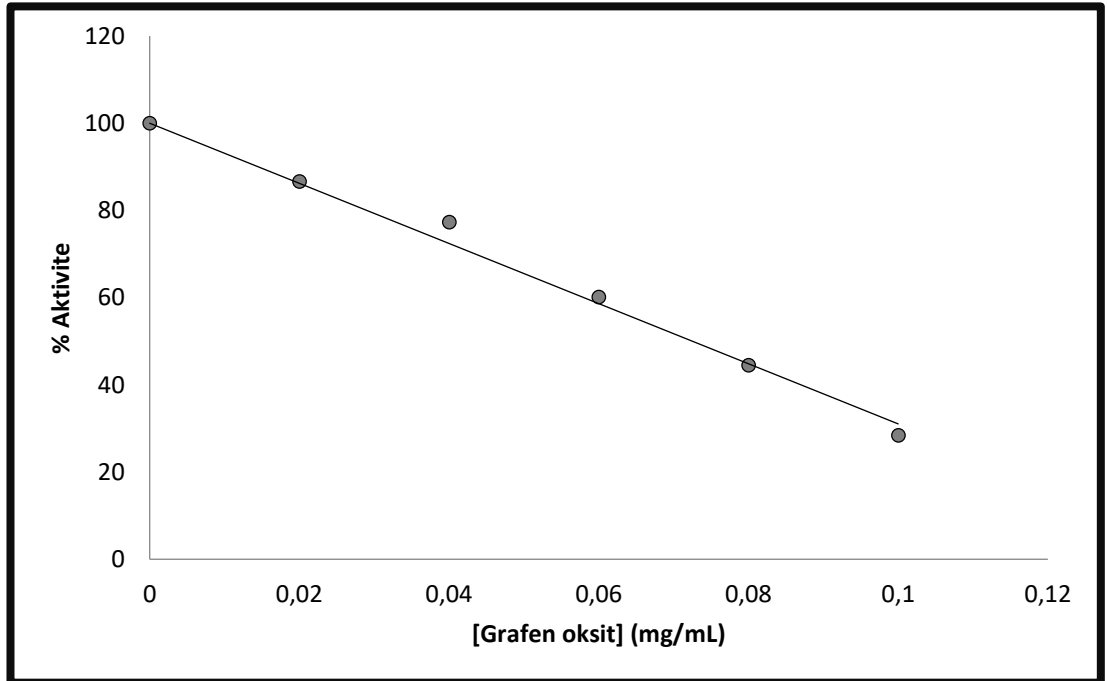
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3p NP'nin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3p] grafiği.

4.2.2. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren nanopartiküller ile ilgili sonuçlar

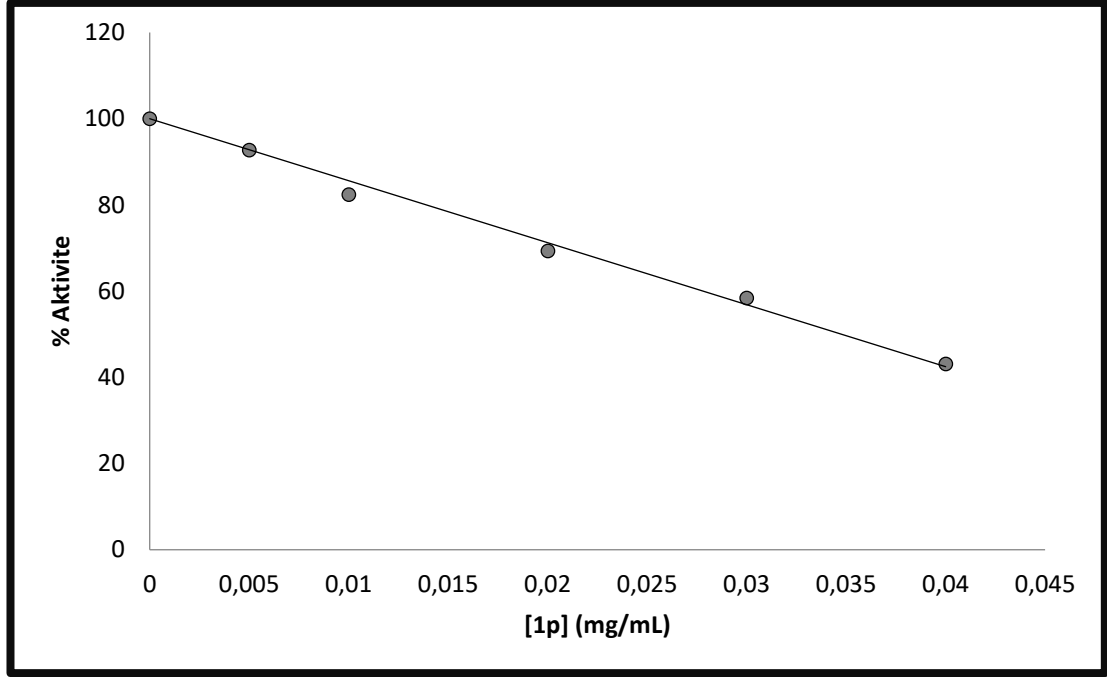
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için 5 farklı nanopartikülün etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir nanopartikül için % aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden % 50 enzim inhibisyonuna sebep olan nanopartikül konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplandı (Şekil 4.7.-4.11.).



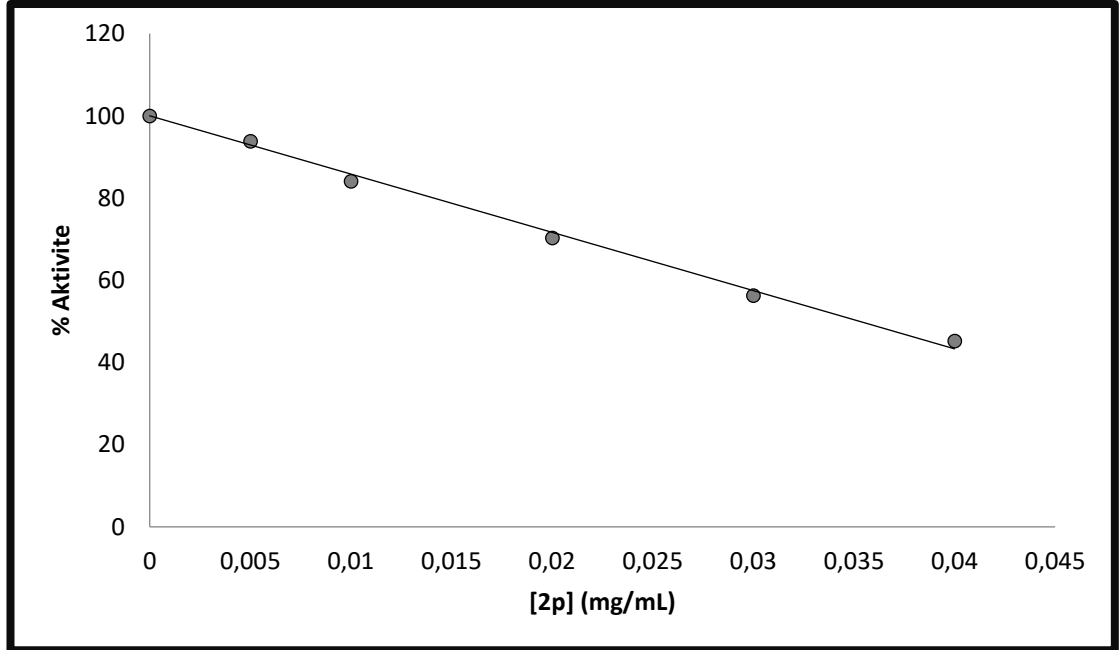
Şekil 4.7. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafenin farklı konsantrasyonlarında IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafen] grafiği.



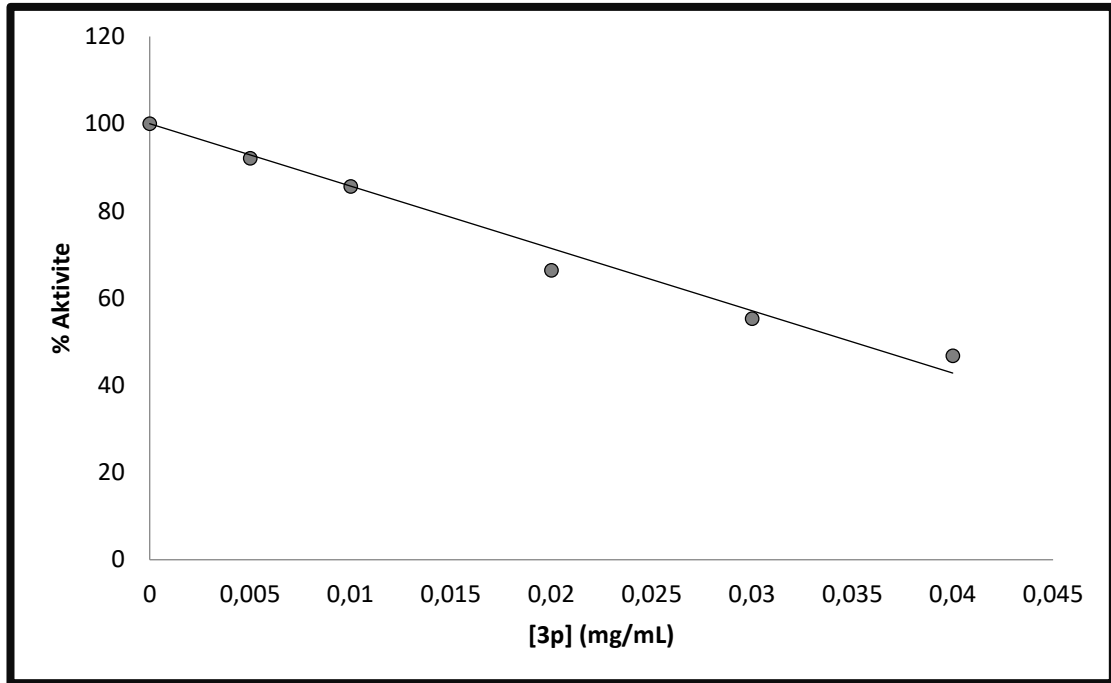
Şekil 4.8. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile grafen oksitin farklı konsantrasyonlarında IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[grafen oksit] grafiği.



Şekil 4.9. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1p NP'nin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1p] grafiği.



Şekil 4.10. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2p NP'nin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2p] grafiği.



Şekil 4.11. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3p NP'nin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3p] grafiği.

4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bazı nanopartiküllerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar

İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin % 50 inhibisyonuna (IC₅₀) sebep olan değerleri hesaplamak için grafen, grafenoksit ve grafenoksitin metal türevlerine (1p, 2p ve 3p) ait % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Grafiklerden elde edilen IC₅₀ değerleri Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. hCA I için nanopartiküllerin esteraz IC₅₀ değerleri

İnhibitör	hCA I için IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
Grafen	>100
Grafen oksit	76,21
1p	34,40
2p	35,09
3p	35,09

Tablo 4.2. hCA II için nanopartiküllerin esteraz IC₅₀ değerleri

İnhibitör	hCA II için IC ₅₀ değerleri (µg/mL)
Grafen	>100
Grafen oksit	72,51
1p	34,76
2p	35,28
3p	34,97

4.2.4. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırma basamakları sonuçları

İnsan kanından elde edilen hemolizatin, Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid kolonuna uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar tablo 4.3.'te verilmiştir.

Tablo 4.3. İnsan eritrositlerinden hCA I-II izoenzimlerinin Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması basamakları.

Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	12	14,92	118	179,04	1416	7,908	100	1
hCA I	6	0,21	146	1,26	876	695,24	61,86	87,91
hCA II	4	0,05	162	0,20	648	3240	45,76	409,71

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbonik anhidrazlar (CA, EC 4.2.1.1), difüzyon sınırına yaklaşan, 10^6 s^{-1} 'in üzerinde turnover sayısı (kcat) elde eden, en hızlı enzimlerden bazılarıdır. CA'lar, bikarbonat iyonları (HCO_3^-) ve protonlar üretmek için tersinir CO_2 hidrasyonunu katalize eder. Ökaryotlar, bakteriler ve Archaea dahil olmak üzere birçok organizmanın yaşam döngüsünde yer alan CA'lar; biyolojik, farmasötik ve biyoteknolojik öneme sahiptir (Supuran, 2012; Fredslunda ve ark., 2018).

Karbonik anhidrazlar tarafından katalize edilen reaksiyonlar önemli prosesler içerir. Bunlar; gaz değişimi, metabolize doku ve akciğerler arasında CO_2 ve bikarbonatın taşınması, pH ve CO_2 homeostazı, farklı doku ve organlarda elektrolit salgılanması, glukoneogenezde biyosentetik reaksiyonlar, lipogenez ve üreagenez, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon ve tümörijenite şeklinde sıralanabilir (Akin ve ark., 2019; Lolak ve ark., 2019).

Karbonik anhidraz inhibitörleri son derece aktif bir alandır. Son zamanlarda bildirilen çok sayıda yeni CAI sınıfı vardır. Bunlar; kumarinler, sülfokumarinler, poliaminler, ditiyokarbamatlar, ksantanlar, fenoller, vs dir. Yeni CAI'lerin bazıları henüz klinik kullanımda değildir ancak birçoğu için, örneğin anti-iskemik veya antinöropatik ağrı ilaçları gibi, farmakolojik uygulamalar keşfedilmiştir (Supuran, 2016). İnsan karbonik anhidraz inhibitörleri çeşitli terapötik uygulamalara sahiptir: İnsan CA II, IV ve XII inhibitörleri, diüretik olarak ve glokomda kullanılır. hCA II ve VII inhibitörleri, anti-epileptik ilaçlar olarak kullanılırken bazı antitümör ve anti-enflamatuar CAI'ler, hCA IX ve XII izoformlarını hedef alır (El-Azab ve ark., 2019).

Stiti ve arkadaşlarının (2008) çalışmasında, hedef CA izoformunun hücre dışı lokalizasyonu ve nanomalzemelerin genellikle membran sızdırmazlığı gösterdiği gerçeği göz önüne alınarak tümörle ilişkili izoformun (CA IX) hCA I ve II üzerindeki inhibisyonu için mükemmel CA IX inhibe edici özellik ve seçicilik gösteren CAI kaplı Au NP'lerin sentezi yapılmıştır. Sonuç olarak GNP-1 bileşiğinin, CA IX'i aşırı eksprese eden tümörlerin hem görüntüleme hem de tedavi amaçlı araştırılması önerilmiştir.

Ma ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında, gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) glukoz oksidaz enzimini inhibe ettiği belirlenmiştir. Mackormek ve arkadaşlarının (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise silisyum ve altın nanopartiküllerin laktata dehidrogenaz (LDH) enzimi üzerindeki inhibisyon kapasitesi belirlenmiştir. 199,4 ile 1008,6 nm büyüklüğündeki parçacıkların LDH enzimi üzerinde % 1,1 ile % 34 oranında farklı değerlerde inhibe ettikleri belirlenmiştir.

Kulthong ve arkadaşları (2012) tarafından ratlar üzerinde yapılan *in vivo* bir çalışmada gümüş nanopartiküllerin rat serum ALT, AST ve ALP enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Gümüş nanopartiküller, 50-1000 mg/kg/gün konsantrasyon aralığında denenmiş ve bazı dozlardaki inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Aynı çalışmada *in vitro* olarak da stokrom P izoenzimleri üzerinde (CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E1 ve CYP3A) inhibisyon kapasitesi belirlenmiştir. Bu deneme sonucunda bazı izoenzimlerde IC₅₀ değeri 23 µg/mL, 28 µg/mL olarak belirlenirken bazıları için ise IC₅₀>100 µg/mL olarak ifade edilmiştir.

Liu ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, altın ve gümüş nanopartiküllerin; aztreonam (ATM), klavulanik asid (CA), tazobactam (TZB) ve sulbactam (SUL) maddelerinin konjugatlarının β-laktamaz inhibisyonu etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Ghosh ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, 86-126 nm aralığında boyutlara sahip bakır nanopartiküllerin (CuNPs), antidiyabetik ve antioksidan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, domuz ve fare panreas amilaz enzimi üzerinde sırası ile

38,70 ± 1,45 % ve 34,72 ± 1,22 % inhibisyon belirlenmiştir. Ayrıca fare intestinal α -glukozidaz enzimi üzerinde 90,67 ± 0,33 % inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında ise çalışılan grafen, grafen oksit ve garafenoksit metalli nanaopartiküllerin (1p, 2p ve 3p) hCA I-II'ye karşı inhibisyon potansiyelleri araştırılmıştır. Bu bileşikler arasında grafen hariç diğer bileşiklerin, belirli konsantrasyon seviyesindeki hCA'ya karşı inhibisyon göstermiş, hCA I ve hCA II'yi inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Tablo 5.1.'de hCA I ve hCA II'nin % 50 inhibisyonuna sebep olan nanopartiküllerin konsantrasyonları hesaplanarak daha iyi karşılaştırmak için gösterilmiştir.

Tablo 5.1. hCA I ve hCA II için nanopartiküllerin esteraz IC₅₀ değerleri

İnhibitör	hCA I için IC₅₀ değerleri (µg/mL)	hCA II için IC₅₀ değerleri (µg/mL)
Grafen	>100	>100
Grafen oksit	76,21	72,51
1p	34,40	34,76
2p	35,09	35,28
3p	35,09	34,97

hCA I için IC₅₀ değeri 100-34,40 µg/mL arasında değişmektedir ve nanopartiküller arasında grafen>100 µg/mL IC₅₀ değeri ile en zayıf inhibitör etkisi gösterirken 1p bileşiği, 34,40 µg/mL IC₅₀ değeri ile değeri ile en kuvvetli inhibitör özelliğine sahiptir. Benzer şekilde, hCA II için IC₅₀ değerleri 100-34,76 µg/mL arasında değişmekte ve yine grafen>100 µg/mL ile IC₅₀ değeri ile en zayıf inhibitör etkisi gösterirken 1p bileşiği, 34,76 µg/mL IC₅₀ değeri ile en kuvvetli inhibitör özelliğine sahiptir. Sonuçlar özetlenecek olur ise hCA için en güçlü inhibitör etkisi gösteren bileşikten en zayıf inhibisyon etkisi gösteren bileşik arasındaki sıralamalar hCA I için 1p>2p=3p>grafen oksit>grafen iken hCA II için bu sıralama 1p>3p>2p>grafen

oksit>grafen şeklindedir. Bu tez çalışmasında kullanılan CA enzimi üzerindeki NP inhibitörleri daha önce çalışılmamış olduğundan bu çalışma özgünlüğü ile bir ilki temsil etmektedir ve dolayısıyla literatürdeki çalışmalarla kıyaslama yoluna gidilememiştir. Ancak farklı enzimler üzerinde yapılan NP çalışmaları ile kıyaslandığında kullandığımız inhibitörler, NP' ler, grafen hariç kuvvetli inhibitör özelliği göstermiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında grafen hariç diğer bileşiklerin, hCA I ve II izoformları üzerindeki inhibisyonu, toksikoloji ve tıpta olduğu gibi yeni buluşlarda ve ilaç tasarımında önemli bir rol oynayacağı öngörülmüştür. Ayrıca yeni innhibitör sınıflarının tanımlanması, anlaşılmayan durumlar için yeni teröpatik seçeneklere ve yeni farmakolojik etken maddelerine duyulan ihtiyaca cevap vereceği düşünülmektedir. Ancak NP'lerin hızlı artışının doğal sonucunda NP'ler, çevreye salınmakta ve hava, su ve toprak ortamına geçiş yapar (Ünşar ve Perendeci, 2016). Canlıların nanopartiküllere doğrudan veya dolaylı maruz kalması sonucunda nanopartiküllerin canlılar üzerinde toksik etkiler oluşturduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir (Berk ve Akkurt, 2012). Yang ve arkadaşları (2012) yaptığı bir çalışmada, grafen ve türevlerinin biyolojik sistemlere toksikliğinin yanı sıra *in vitro* / *in vivo* davranışını da etkileyebileceğini kabul eder.

Jia ve arkadaşlarının (2019) yaptığı bir çalışmada, insan hücreleri ve bakteri sistemleri üzerindeki farklı G ve GO boyutlarının karşılaştırmalı toksisitesi araştırılmıştır. Sonuçta, düşük konsantrasyonlardaki küçük boyutlu malzemelerin, orta ve büyük G ve GO boyutlarına kıyasla hücre canlılığını azaltmak ve DNA hasarını artırmak için daha toksik bir potansiyel olduğu kanıtlandı. GO; hücrelerde yüksek DNA hasarı, RecA bakterilerinde genotoksisite ve ayrıca hücrelerde ve zebra balıklarında ilgili genlerin ekspresyonunu bozarken G, Tox2 bakterileri üzerinde hücre canlılığı ve akut toksisite üzerinde daha belirgin etkiler göstermiştir. Grafen familyası nanometaryallerin (GFN' ler) çeşitli alanlardaki hızlı ve yaygın uygulamaları, çevresel kirlenme olasılığını ve doğrudan insan maruz kalma olasılığını artırarak güvenlik endişelerini daha önce dile getirmiştir. Yüksek konsantrasyonlu (50 mg/L) maruz kalma, *in vivo* ve *in vitro* modellerde toksisite

göstermiştir. Uzun süreli maruz kalma durumunda ise insan ve çevre sağlığına karşı güvenli değildir.

Sood ve arkadaşlarının (2019) yaptığı bir çalışmada, *Drosophila melanogaster* üzerinde grafen oksit (GO) ve çinko oksit (ZnO) NP'lerin toksisitesini karşılaştırmaktadır. GO, kimyasal ZnO ve yeşil ZnO NP'ler sentezlendi ve sitotoksik ve nörotoksik davranışları için karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Yeşil ZnO en az sitotoksik bulundu, kimyasal ZnO ise en fazla hücre hasarına neden oldu. GO'nun orta sitotoksositeye sahip olduğu bulundu. Bununla birlikte, nörotoksosite ile farklı bir eğilim gözlemlendi; Yeşil ZnO'nun nöromusküler koordinasyonu en fazla etkilediği, GO'nun ise en az etkili olduğu bildirildi.

Grafen familyası materyallerinin (GFM' ler) ekotoksosite etkileri hakkındaki mevcut bilgileri güncelleyen bir çalışmada, GMF' lerin artan kullanımı ile birlikte imalat, nakliye, kullanım ve imha sırasında çevreye salınacaktır. Sulara, çökeltilere ve topraklara bırakıldıktan sonra, çeşitli fizikokimyasal ve biyolojik faktörlerle etkileşime girecek, bu nedenle ekosistem düzeyinde etkileri olan çevreye önemli olumsuz etkilere neden olabileceği öngörülmüştür (Marchi ve ark., 2018).

Li ve arkadaşlarının (2019) yaptığı bir çalışmada, anammox bazlı ekimsiz yeraltı akışlı sulak alanların, grafen oksitler (GO) ve gümüş (Ag) NP farklı konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalması altında incelenmiştir. Sonuçta anammox işleminin anahtar enzimlerinin, GO ve Ag NP maruziyeti altında bir dereceye kadar azaldığı görülmüştür. Toplam azotun (TN) giderilmesi, GO ilavesi ile arttı ve fonksiyonel anammox bakterileri *C. Anammoxoglobus* belirgin bir artış gösterdi. Reaktif oksijen türleri konsantrasyonlarında bir artış olmasına rağmen GO hücre bütünlüğüne önemli bir hasara yol açmadı. TN uzaklaştırılması, hücre biyogenezine ve onarımına bağlı fonksiyon geni için, 1 mg/L Ag NP'lerin maruziyeti altında açıkça etkilenmeyecektir; 10 mg/L Ag NP' lerin eklenmesi, ekimsiz yeraltı akışlı sulak alanlarda TN uzaklaştırılması üzerinde, bazı türlerin anammox yeteneğine sahip olmaları için inhibe edici bir etkiye sahip olacaktır.

Grafenin günlük yaşamda kullandığımız cihazların bir parçası olma ihtimalleri yüksek olduğundan toksisite çalışmalarının ilerlemesi beklenmektedir. Grafen toksisitesinin gerçekçi dozaj seviyelerinde, çoklu organizmalarda ve hayvanlarda dikkatle incelenmesi, bu harika malzeme için sağlık ve iş güvenliği standartlarının tasarlanması hayati öneme sahiptir (Kumar ve Pattammattel, 2017).

NP'lerin toksisite mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da olası mekanizmalar; hücre zarının parçalanması, protein oksidasyonu, DNA yapısının bozulması, hücre içi enerji üretiminin kesilmesi, reaktif oksijen türlerinin oluşması ve toksik bileşenlerin salınımı şeklinde sıralanabilir (Ünşar ve Perendeci, 2016). 2002 yılından sonra artan sayıda çalışma, çeşitli patolojilerden muzdarip hastaların hastalıklı dokularında nanopartikül varlığını göstermektedir. Karaciğer, KOAH, kalp yetmezliği, solunum sıkıntısı sendromu, akciğer kanseri, amfizem, zatürre, aşırı duyarlı zatürre ve pnömokonyoz hastaların akciğerlerinde çeşitli nanopartiküllerin mevcut olduğu görülmüştür. Benzer şekilde astım hastalarında, kan hastalıkları olan hastalarda, crohn hastalığı ve kolon kanseri olan hastaların kolon biyopsilerinde çeşitli nanopartiküller görülmüştür. Hava kirliliğine maruz kalan beyin hastalarında ve Alzheimer hastalığı olanlarda manyetik nanopartiküller tespit edilmiştir (Buzea ve Pacheo, 2019).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde NP'lerde toksikolojik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. NP'lerin fiziko-kimyasal ve yapısal özellikleri ile bunların hücresel reaktiviteleri ve çeşitli organ ve dokulardaki etkileşimleri arasındaki ilişkiyi anlamak oldukça önemlidir (Missaoui ve ark., 2018). Literatürde çevreye salınan NP'lerin bitki ve hayvan türlerinde biyotik birikim ve toksik etkileri gösterilmiş olmakla birlikte çevre ile ilişkili tehlikeleri azaltmak ve NP'lere maruz kalmanın nasıl minimum düzeye indirileceğini belirlemek için risk değerlendirme araçlarının geliştirilmesi kritik öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

- Ahmad, M. U. 2012. Nanotechnology: Emerging Interest, Opportunities, and Challenges. İçinde: Lipids in Nanotechnology. 1nd ed., Academic Press and AOCS Press, USA, 1-14.
- Ahmed, N., Fessi, H., Elaissari, A. 2012. Theranostic Applications of Nanoparticles in Cancer. *Drug Discov. Today*, 17(17-18): 928-934.
- Akdemir, A., Akdemir, Ö. G. 2015. The Structure, Physiological Role, and Potential Medicinal Applications of Carbonic Anhydrase V. İçinde: Carbonic Anhydrase as Biocatalysts. 1nd ed., Elsevier, Italy, 125-138.
- Akin, S., Ayaloğlu, H., Gultekin, E., Colak, A., Bekircan, O., Akatin, M. Y. 2019. Synthesis of 1,2,4-triazole-5-on Derivatives and Determination of Carbonic Anhydrase II Isoenzyme Inhibition Effects. *Bioorg. Chem.*, 83: 170-179.
- Akkemik, E., Çalışır, Ü., Çiçek, B. 2017. İnsan Karbonik Anhidraz I, II İzoenzim Aktiviteleri Üzerine Bazı Tiyocrown Eterlerin Etkisi. *BAUN Fen Bil. Enst. Dergisi*, 19(2): 192-199.
- Altmann, J., Gubbrud, M. 2004. Anticipating Military Nanotechnology. *IEEE Technol. Soc. Mag.*, 23(4): 33-40.
- Angeli, A. Tanini, D., Capperucci, A., Supuran, C. T. 2018. First Evaluation of Organotellurium Derivatives as Carbonic Anhydrase I, II, IV, VII and IX Inhibitors. *Bioorg. Chem.*, 76: 268-272.
- Ates, H., Bahceci, E. 2015. Nano Malzemeler için Üretim Yöntemleri. *Gazi Uni. J. Sci.*, 3(2): 483-499.
- Augustin, M. A, Oliver, C. M. 2012. An Overview of The Development and Applications of Nanoscale Materials in the Food Industry. İçinde: Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries. 1nd ed., Woodhead Publishing, USA, 3-39.
- Baetke, S. C., Lammers, T., Kiessling, F. 2015. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Int. J. Rad.*, 88(1054): 1-25.
- Baruah. A., Chaudhary, V., Malik, R., Tomer, V. K. 2019. Nanotechnology Based Solutions for Wastewater Treatment. İçinde: Nanotechnology in Water and Wastewater Treatment. 1nd ed., Elsevier, Malaysia, 337-368.

- Berk, S., Akkurt, İ. 2012. Nanopartikül: Geleceğin Korkulu Rüyası. *Tuberk Toraks*, 60(2): 180-184.
- Batır, G. G., Arik, M., Caldıran, Z., Turut, A., Aydoğan, S. 2018. Synthesis and Characterization of Reduced GrapheneOxide/Rhodamine 101 (rGO-Rh101) Nanocomposites and Their Heterojunction Performance in rGO-Rh101/p-Si Device Configuration. *J. Electron. Mater.*, 47(1): 329-336.
- Batır, G. G., Gedikli, S., Arik, M. 2017. Pyronin B-Graphene Oxide-Based Turn-On Fluorescent Sensors for Fe³⁺ in an Aqueous Medium: Synthesis and Living Cell Application. *ChemistrySelect*, 2: 10889-10894.
- Bhagavan, N. V., Ha, C. E. 2015. Enzymes and Enzym Regulation. İçinde: *Essentials of Medical Biochemistry*. 2nd ed., Academic Press, USA, 63-84.
- Bowden, A. C. 1976. Effects of pH and Temperature on Enzymes. İçinde: *Principles of Enzyme Kinetics*. 1nd ed., Butterworth-Heinemann, Britain, 101-115.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254.
- Buzea, C., Pacheco, I. 2019. 28-Toxicity of Nanoparticles. İçinde: *Nanotechnology in Eco-Efficient Construction*. 2nd ed., Woodhead Publishing, Canada, 705-754.
- Calvey, N. 2004. Enzymes. *Surgery (Oxford)*, 22(2): 48a-48b.
- Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A., Vullo, D. 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Diazenylbenzenesulfonamides are Potent and Selective Inhibitors of the Tumor-Associated Isozymes IX and XII over the Cytosolic Isoforms I and II. *Bioorg. Med. Chem.*, 17: 7093-7099.
- Choi, H., Mody, C. C. M. 2009. The Long History of Molecular Electronics: Microelectronics Origins of Nanotechnology. *SSS*, 39(11): 12-50.
- Christan, P., Der Kammer, F. V., Baalousha, M., Hoffman, T. 2008. Nanoparticles: Structure, Properties, Preparation and Behaviour in Environmental Media. *Ecotoxicol.*, 17: 326-343.
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N., Thornton, J. M. 2015. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys. J.*, 109(6): 1082-1086.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, I., Ekinçi, D. 2007. Morphine Inhibits Erythrocyte Carbonic Anhydrase *in Vitro* and *in Vivo*. *Biol. Pharm. Bull.*, 30(12): 2257-2261.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinçi, D. 2008. The Effect of Ethanol on Carbonic Anhydrase Isoenzymes: *in Vivo* and *in Vitro* Studies. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 23(2): 266-270.

- Denkbaşı, E. B., Göktürk, G. I., Bayram, C., Kavaz, D., Pala, B. B., Çamak, S., Karahilaloğlu, S., Şam, M., Poor, I. O., Topal, M., Şener, G. 2011. Her Yönüyle Nano¹. Nanobülten, 13: 1-73.
- De Simone, G., Di Fiore, A., Capasso, C., Supuran, C. T. 2015. The Zinc Coordination Pattern in the η -Carbonic Anhydrase from *Plasmodium Falciparum* is Different from All Other Carbonic Anhydrase Genetic Families. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 25: 1385-1389.
- De Simone, G., Supuran, C. T. 2012. (In)organic Anions as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Inorg. Biochem.*, 111: 117-129.
- Dreher, K. L. 2004. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicological Highlight*, 77: 3-5.
- Durdağı, S., Şentürk, M., Ekinci, D., Balaydın, H. T., Göksu, S., Küfrevioğlu, Ö. İ., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T. 2011. Kinetic and Docking Studies of Phenol-Based Inhibitors of Carbonic Anhydrase Isoforms I, II, IX and XII Evidence a New Binding Mode within the Enzyme Active Site. *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 1381–1389.
- Efe, A. 2017. İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I-II) Üzerine 4-Metilbenzen Sülfonamid Türevlerinin İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi. Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- El-Azab, A. S., Abdel-Aziz, A. A. M., Bua, S., Nocentini, A., El-Gendy, M., Mohamed, M. A., Shower, T. Z., Al Saif, N. A., Supuran, C. T. 2019. Synthesis of Benzenesulfonamides Linked to Quinazoline Scaffolds as Novel Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Chem.*, 87: 78-90.
- Ergen, A. 2015. Enzimler. İçinde: Lippincott. 5. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, 53-68.
- Eriksson, A. E., Jones, T. A., Liljas, A. 1993. Refined Structure of Human Carbonic Anhydrase II at 2.0 Å Resolution. *Proteins*, 4: 274–282.
- Ferry, J. G. 2010. The γ Class of Carbonic Anhydrases. *B. B. A.*, 1804: 374-381.
- Fredslunda, F., Borchert, M. S., Poulsen, L. C. N., Bennike, M., Perner, M., Streit, W. R., Leggio, L. L. 2018. Structure of a Hyperthermostable Carbonic Anhydrase Identified from an Active Hydrothermal Vent Chimney. *Enzym. Microb. Tech.*, 114: 48-54.
- Gautam, R. K., Chattopadhyaya, M. C. 2016. Chapter 1-Nanotechnology for Water Cleanup. *Nanomaterials for Wastewater Remediation*, 1-18.
- Ghosh, S., More, P., Nitnavarel, R., Jagtap, S., Chippalkattil, R., Derle, A., Kitture, R., Asok, A., Kale, S., Singh, S., Shaikh, M. L., Ramanamurthy, B., Bellare, J.,

- Chopade, B. A. 2015. Antidiabetic and Antioxidant Properties of Copper Nanoparticles Synthesized by Medicinal Plant *Dioscorea Bulbifera*. *J. Nanomed Nanotechnol.*, S6: 1-9.
- Guler, O. O., Capasso, C. and Supuran, C. T., 2016. A Magnificent Enzyme Superfamily: Carbonic Anhydrases, Their Purification and Characterization. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 31(5): 689-694.
- Gürmen, S., Ebin, B. 2008. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri-1. *Metalurji Dergisi*, 31-38.
- Hanff, E., Zinke, M., Böhmer, A., Niebuhr, J., Maassen, M., Endeward, V., Maassen, N., Tsikas, D. 2018. GC-MS Determination of Nitrous Anhydrase Activity of Bovine and Human Carbonic Anhydrase II and IV. *Anal. Biochem.*, 550, 132-136.
- Hansen, S. F., Maynard, A. Baun, A. Tickner, J. A. 2008. Late Lessons from Early Warnings for Nanotechnology. *Nature Nanotechnology*, 3, 444.
- Hassan, Md. I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F. Sly, W. S. 2013. Structure, Function and Applications of Carbonic Anhydrase Isozymes. *Bioorg. Med. Chem.*, 21: 1570-1582.
- Hulla, j. E. Sahu, S. C. Hayes, A. W. 2015. Nanotechnology: History and Future. *H. E. T.*, 34(12): 1318-1321.
- Hunaiti, A. A., Soud, M. 2000. Effect of Lead Concentration on the Level of Glutathione, Glutathione S-transferase, Reductase and Peroksidase in Human Blood. *Sci. Total Environ.*, 248 (1): 45-50.
- Irivani, S. 2011. Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Plants. *Green Chemistry*, 13: 2638-2650.
- Iqbal, S., Saleem, M., Azim, M. K., Taha, M., Salar, U., Khan, K. M., Perveen, S., Choudhary, M. I., 2017. Carbohydrazones as New Class of Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis, Kinetics, and Ligand Docking Studies. *Bioorg. Chem.*, 72: 89–101.
- Jia, P. P., Sun, T., Junaid, M., Yang, L., Ma, Y. B., Cui, Z. S., Wei, D. P., Shi, H. F., Pei, D. S. 2019. Nanotoxicity of Different Sizes of Graphene (G) and Graphene Oxide (GO) *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Pollution*, 247: 595-606.
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2012. *Biyokimya*, 1. Baskı. Aktif Yayınevi, 1-645.
- Kestens, V., Roebben, G., Herrmann, J., Jämting, A., Coleman, V., Minelli, C., Clifford, C., De Temmerman, P. J., Mast, J., Junjie, L., Babick, F., Cölfen, H., Emons, H. 2016. Challenges in the Size Analysis of a Silica Nanoparticle Mixture as Sandicate Certified Reference Material. *Journal of Nanoparticle Research*, 18, 171-193.

- Khan, I., Saeed, K., Khan, I. 2017. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian J. Chem.*, xx: 1-24.
- Khan, K. S. 2014. Ethics and Nanotechnology. *IEEE International Symposium on Ethics in Science, Technology and Engineering, USA*, 1-14.
- Khan, W. S., Asmatulu, R. 2013. Fundamentals of Safety. İçinde: *Nanotechnology Safety*. 1st ed. Elsevier, USA, 17-30.
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G., Rees, D. C. 1996. A Left-Handed Beta-Helix Revealed by the Crystal Structure of a Carbonic Anhydrase from the Archaeon *Methanosarcina Thermophile*. *EMBO J.*, 15(10): 2323-2330.
- Kulthong, K., Manirattanachote, R., Kobayashi, Y., Fukami, T., Yokoi, T. 2012. Effects of Silver Nanoparticles on Rat Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Activity. *Xenobiotica*, 42(9): 854-862.
- Kummar, C. V., Pattammattel, A. 2017. Nanotoxicity of Graphene. İçinde: *Introduction of Graphene*. 1st ed. Elsevier, USA, 187-206.
- Kunamneni, A., Ogaugwu, C., Goli, D. 2018. Enzymes as Therapeutic agents. İçinde: *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. 1st ed., Academic Press, France, 301-312.
- Lee, J., Mahendra, S., Alvarez, P. J. J. 2010. Nanomaterials in the Construction Industry: A Review of Their Applications and Environmental Health and Safety Considerations. *ACS Nano*, 4(7): 3580-3590.
- Li, H., Chi, Z., Yan, B. 2019. Long-Term Impacts of Graphene Oxide and Ag Nanoparticles on Anammox Process: Performance, Microbial Community and Toxic Mechanism. *J. Environ. Sci-China*, 79: 239-247.
- Lindskog, S. 1997. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74(1): 1-20.
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., Sridhar, R. 2014. Techniques for Physicochemical Characterization of Nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4): 711-726.
- Liu, R., Teo, W., Tan, S., Feng, H., Padmanabhan, P., Xing, B. 2010. Metallic Nanoparticles Bioassay for *Enterobacter Cloacae* P99 β -lactamase Activity and Inhibitor Screening. *Analyst*, 135: 1031-1036.
- Liu, S. 2017. Interactive Enzyme and Molecular Regulation. İçinde: *Bioprocess Engineering*. 2nd ed., Elsevier, USA, 535-628.
- Lolak, N., Akocak, S., Bua, S., Sanku, R. K. K., Supuran, C. T. 2019. Discovery of New Ureido Benzenesulfonamides Incorporating 1,3,5-triazine Moieties as Carbonic Anhydrase I, II, IX and XII Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 27(28): 1588-1594.

- Maccormack, T. J., Clark, R. J., Dang, M. K. M., Ma, G., Kelly, J. A., Veinot, J. G. C., Goss, G. G. 2012. Inhibition of Enzyme Activity by Nanomaterials: Potential Mechanisms and Implications for Nanotoxicity Testing. *Nanotoxicol.*, 6: 514-525.
- Marchi, L. D., Pretti, C., Gabriel, B., Margues, P. A. A. P., Freitas, R., Neto, V. 2018. An Overview of Graphene Materials: Properties, Applications and Toxicity on Aquatic Environments. *Sci. Total Environ.*, 631-632: 1440-1456.
- Maskos, M, Stauber, R. H. 2011. Characterization of Nanoparticles in Biological Environments. *İçinde: Comprehensive Biomaterials*. 3rd ed., Elsevier, Oxford, 329-333.
- Ma, S., Mu, J., Qu, Y., Jiang, L. 2009. Effect of Refluxed Silver Nanoparticles on Inhibition and Enhancement of Enzymatic Activity of Glucose Oxidase. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.*, 345 (1-3): 101-105.
- Metin, Z. G., Özdemir, L. 2015. Nanoteknolojinin Sağlık Alanında Kullanımı ve Hemşirenin Sorumlulukları. *Anadolu Hemşirilik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*, 18(3): 235-244.
- Michelson, E. S. 2008. Globalization at the nano frontier: The future of Nanotechnology policy in the United States, China, and India. *Technology in Society*, 30, 405-410.
- Misrah, R., Militky, J. 2019. Nanoparticles and Textile Technology. *Nanotechnology in Textiles*. 2019, 181-217.
- Missaoui, W. N., Arnold, R. D., Cummings, B. S. 2018. Toxicological Status of Nanoparticles: What We Know and What We don't Know. *Chemico-Biological Interactions*, 295(1): 1-12.
- Mohanraj, V., Chen, Y. 2006. Nanoparticles. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1): 561-573.
- Mukhopadhyay, S. S. 2014. Nanotechnology in Agriculture: Prospects and Constraints. *Nanotechnology, Science and Application*, 7, 63-71.
- Murphy, P., Munshi, D., Kurian, P. A., Lakhtakia, A., Bartlett, R. V., Chakraborty, M. 2017. Nanotechnology, Society, and Environment. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 5: 443-476.
- Nair, S. K., Christianson, D. W. 1991. Structural Properties of Human Carbonic Anhydrase II at pH 9.5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181(2): 579-584.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., Issaabadi, Z. 2019. An Introduction to Nanotechnology. *Interface Sci. And Technology*, 28, 1-27.
- Nimesh, S. 2013. 1- Nanotechnology: An Introduction. *İçinde: Gene Therapy*. 1nd ed., Woodhead Publishing, India, 1-12.

- Pala, N., Cadoni, R., Sechi, M. 2015. Carbonic Anhydrase I. İçinde: Carbonic Anhydrases as Biocatalysts. 1nd ed., Elsevier, Italy, 31-49.
- Palmer, T., Bonner, P. L. 2011. An Introduction Enzymes. İçinde: Enzymes. 2nd ed., Woodhead Publishing, Britain, 2-13.
- Palmer, T., Bonner, P. L. 2014. Enzyme Inhibition. İçinde: Enzyme. 2nd ed., Woodhead Publishing, Britain, 126-152.
- Palmer, T., Bonner, P. L. 2007. Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry, 2nd ed. Woodhead Publishing, 1-432.
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., Manavalan, R. 2011. Nanoparticle: An Overview of Preparation and Characterization. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 01(06): 228-234.
- Pandey, R. K., Prajapati, V. K. 2018. Molecular and Immunological Toxic Effects of Nanoparticles. Int. J. Biol. Macromol., 107(A): 1278-1293.
- Perales, D. T., Navarro, J. M., Polaina, J., 2015. Enzymes: Function and Characteristics. İçinde: Encyclopedia of Food and Healthy. 1nd ed., Elsevier, Spain, 532-538.
- Perihan, O. 2014. Dış Hekimliğinde Kullanılan Nanopartiküller, Kullanım Alanları ve Biyouyumluluk. Atatürk Üniv. Dış. Hek. Fak. Derg., 24(1): 125-133.
- Pircalabour, G. G., Bleotu, C., Curiutu, C., Mihaescu, G., Chifiriuc, M. G. 2019. Nanodrug Delivery System in Cancer. İçinde: Biomedical Applications of Nanoparticles. 1rd ed., William Andrew, Romania, 31-62.
- Pondis, H. G. 2016. Measurement of Enzyme. İçinde: Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms. 1nd ed., Academic Press, London, 64-70.
- Purich, D. L. 2010a. An Introduction to Enzyme Science. İçinde: Enzyme Kinetics: Catalysis & Control. 16nd ed., Elsevier, Florida, 1-51.
- Purich, D. L. 2010b. Factors Influencing Enzyme Activity. İçinde: Enzyme Kinetics: Catalysis & Control. 16nd ed., Elsevier, Florida, 379-484.
- Ramsden, J. J. 2016. The Impact of Nanotechnology. Nanotechnology, 279-304.
- Romig, A. D., Baker, A. B., Johannes, J., Zipperian, T., Eijkel, K., Kirchhoft, B., Mani, H. S., Rao, C. N. R., Walsh, S. 2007. An introduction to nanotechnology policy: Opportunities and constraints for emerging and established economies. Technological Forecasting and Social Change, 74(9): 1634-1642.
- Roskoski, R. 2015. Principles of Enzymes. İçinde: Reference Module in Biomedical Sciences. 2nd ed., Elsevier, USA, 1-5.

- Salata, O. V. 2004. Applications of Nanoparticles in Biology and Medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(3): 1-6.
- Segel, H. I. 1968. *Biochemical Calculations*, John Wiley and Sons Incorporated, 1-403.
- Segel, I. H. 2013. Enzyme Kinetics. İçinde: Reference Module in Biomedical Sciences. 2nd ed., Elsevier, USA, 216-220.
- Shekh, A. Y., Krishnamurthi, K., Mudliar, S. N., Yadav, R. R., Fulke, A. B., Devi, S. S., Chakrabarti, T. 2012. Recent Advancements in Carbonic Anhydrase–Driven Processes for CO₂ Sequestration: Minireview. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.*, 42: 1419-1440.
- Singh, A. K. 2016. Engineered Nanoparticles. İçinde: Chapter-1 Introduction to Nanoparticles and Nanotoxicology. Academic Press, USA, 1-18.
- Sood, K., Kaur, J., Singh, H., Arya, S. K., Khatri, M. 2019. Comparative Toxicity Evaluation of Graphene Oxide (GO) and Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on *Drosophila Melanogaster*. *Toxicology Reports*, 6: 768-781.
- Sprando, R. L. 2010. Application of Nanotechnology in Cosmetics. *Pharm Res*, 27: 1746- 1749.
- Strambeanu, N., Demetrovici, L., Dragos, D., Lungu, M. 2014. Nanoparticles: Definition, Classification and General Physical Properties. İçinde: Nanoparticles' Promises and Risks. Springer, Switzerland, 3-8.
- Supuran, C. T., Capasso, C. 2015. Acatalytic Carbonic Anhydrases (CAs VIII, X, XI). İçinde: Carbonic Anhydrase as Biocatalysts. 1nd ed., Elsevier, Italy, 239-246.
- Supuran, C. T., Capasso, C., De Simone, G. 2015. Carbonic Anhydrase II as Target for Drug Design. İçinde: Carbonic Anydrases as Biocatalysts. 1nd ed., Elsevier, Italy, 51-90.
- Supuran, C. T. 2010. Carbonic Anhydrase Inhibition/Activation: Trip of a Scientist Around the World in the Search of Novel Chemotypes and Drug Targets. *Curr. Pharm. Design*, 16: 3233-3245.
- Supuran, C. T. 2008. Carbonic Anhydrases-Overview. *Curr. Pharm. Design.*, 14: 603-614.
- Supuran, C. T. 2016. Drug Interaction Considerations in the Therapeutic Use of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 12: 423-31.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A. 2003. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 23(2): 146-189.

- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J. 2004. Carbonic anhydrase: Its Inhibitors and Activators. IV. Series, CRC Press, 1-363 p.
- Supuran, C. T. 2016. Structure and Function of Carbonic Anhydrases. *Biochem. J.*, 473(14): 2023-2032.
- Supuran, C. T. 2012. Structure-Based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 27(6): 759-772.
- Talens-Perales, D., Marin-Navarro, J., Polaina, J. 2016. Enzymes: Functions and Characteristic. İçinde: *Encyclopedia of Food And Healthy*. 1nd ed., Academic Press, Spain, 532-538.
- Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C. T. 2006. Carbonic Anhydrase Activators: The First X-ray Crystallographic Study of an Adduct of Isoform I. *Sci. Direct.*, 16, 5152-5156.
- Theng, B. K. G. 2012. Proteins and Enzymes. *Developments in Clay Sci.*, 4: 245-318.
- Topal, F., Gulcin, I., Dastan, A., Guney, M. 2017. Novel Eugenol Derivatives: Potent Acetylcholinesterase and Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Int. J. Biol. Macromol.*, 94(B): 845-851.
- Toumey, C. 2008. Reading Feynman Into Nanotechnology: A Text for a New Science. *Techné*, 12(3): 133-168.
- Tunca, E. Ü. 2015. Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu. *Ordu Üniv. Bil. Tek. Derg.*, 5(2): 23-34.
- Türkoğlu, E. A., Şentürk, M., Supuran, C. T., Ekinci, D. 2017. Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Some Uracil Derivatives. *J. Enzym. Inh. Med. Chem.*, 32(1): 74-77.
- Ünşar, E. K., Perendeci, N. A. 2016. Nanopartiküllerin Çevresel Akıbetleri ve Anaerobik Parçalanma Prosesine Etkileri. *Pamukkale Üniv. Müh. Bilim Derg.*, 22(6): 503-512.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. and Edsall, J. T. 1967. Esterease Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *J. Biol. Chem.*, 242(18): 4221-4229.
- Yang, K., Li, Y., Tan, X., Peng, R., Liu, Z. 2012. Behavior and Toxicity of Graphene and Its Functionalized Derivatives in Biological Systems. *Small*, 261: 1-12.
- Yokohama, T. 2018. Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. İçinde: *Nanoparticle Technology Handbook*. 3rd ed., Elsevier, Japan, 3-47.
- Zarif, M. E., Florea, D. A., Grumezescu, A. M. 2019. Introduction to Cancer Nanotherapeutics. İçinde: *Biomedical Applications of Nanoparticles*. 1rd ed., William Andrew, Romania, 1-29.

- Zhang, L., Gu, F. X., Wang, A. Z., Langer, R. S., Farokhzad, O. C. 2008. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* Banner, 83(5): 761-769.
- Xiao, Z., Duan, R., Cui, W., Zhang, Y., Zhang, S., Chen, F., Zhang, Y., Liu, J., Zhang, D., Meng, Y., Wang, L., Wang, H. 2011. Synthesis and Evaluation of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 19(10): 3221-3228.
- Waheed, A., Sly, W. S. 2017. Carbonic Anhydrase XII Functions in Health and Disease. *Gene*, 623(5): 33-40.
- Wingo, T., Tu, C., Laipis, P. J., Silverman, D. N. 2001. The Catalytic Properties of Human Carbonic Anhydrase IX. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288: 666-669.
- Winum, J. Y. 2015. Carbonic Anhydrase XIV: Structure, Functions, and Potential Medical Applications. *İçinde: Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*. 1st ed., Elsevier, Italy, 221-237.

ÖZGEÇMİŞ

Asiye BULMUŞ, 12.09.1988' de Ağrı' da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ağrı' da tamamladı. 2008 yılında başladığı Cumhuriyet Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü' nü 2013 yılında bitirdi. 2013 yılında Sakarya Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü' nde yüksek lisans eğitime başladı. 2015 yılında Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı' nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2017 yılında tamamlamıştır.