

YENİ PROTON TRANSFER BİLEŞİKLERİNİN
ANTİGLOKOM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Burcu ÇINAR

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Mayıs-2010

YENİ PROTON TRANSFER BİLEŞİKLERİNİN ANTİGLOKOM AKTİVİTESİNİN
İNCELENMESİ

Burcu ÇINAR

Dumlupınar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Mayıs-2010

KABUL VE ONAY SAYFASI

Burcu ÇINAR'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Yeni Proton Transfer Bileşiklerinin Antiglokom Aktivitesinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

..... / / 2010

Üye :

Üye :

Üye :

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2010 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YENİ PROTON TRANSFER BİLEŞİKLERİNİN ANTİGLOKOM AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Burcu ÇINAR

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2010

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Bu çalışmada karbonik anhidraz izoenzimlerinin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve daha önce sentezlenen bileşiklerin; glokom tedavisinde rolü olan HCA I ve HCA II enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Önce insan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimleri afinite jeli kullanılarak (Sephrose-4B-L-tirozin-sülfonilamid) saflaştırılmış ve daha sonra bu enzimlerle kinetik çalışmalar yapılmıştır.

Daha sonra Hsba ve serbest ligandlardan (en ve amp) sentezlenen yeni bileşiklerin (1 ve 2) insan eritrosit CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalandı. HCA'nın hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerinde Hsba, 1 ve 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için %aktivite-[I] grafikleri çizilerek I_{50} değerleri bulunmuştur. CO_2 -Hidrataz aktivitesine göre inhibisyon gösteren Hsba, 1 ve 2 bileşiklerinin I_{50} değerleri (enzimli reaksiyon süresini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); HCA I için sırasıyla 0.45 μM , 0.15 μM ve 0.32 μM ve HCA II için 0.40 μM , 0.06 μM ve 0.15 μM bulundu. Esteraz aktivitesine göre ise; HCA I için sırasıyla 3.2 μM , 0.13 μM ve 0.8 μM , HCA II için 18 μM , 0.14 μM ve 0.1 μM I_{50} değerleri bulundu.

Anahtar Kelimeler: Glokom, Karbonik Anhidraz, Sülfonamidler.

EXAMINATION OF ANTIGLAUCOMA ACTIVITY ON NOVEL PROTON TRANSFER COMPOUNDS

Burcu ÇINAR

Chemistry, M. S. Thesis, 2010

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

In this study, the effects of purification of carbonic anhydrase enzyme from human erythrocyte and previously synthesized compounds on HCA I and HCA II that carry out roles on the treatment of glaucoma were investigated in vitro.

First, erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (HCA I, HCA II) from human erythrocyte were separately purified by using affinity chromatography and then kinetic investigations were held with these enzymes.

Later inhibition effects of newly synthesized compounds (1 and 2) from Hsba and free ligands (en and amp) on human erythrocyte HCA enzymes were investigated in vitro. During the examinations, hydrates and esterase activities were utilized to determine carbonic anhydrase activities. It was observed that (Hsba, 1 and 2) compounds showed inhibition effects on HCA hydratase and esterase activity. I_{50} values were determined by drawing %activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For CO_2 -hydratase activity of compounds (Hsba), (1), (2) showed inhibition effects of 0.45 μM , 0.15 μM and 0.32 μM for HCA I, and 0.40 μM , 0.06 μM and 0.15 μM with I_{50} for HCA II, respectively (with an inhibitor concentration that would drop enzymed reaction time %50). As for esterase activity of p-nitrophenyl acetate, compounds (Hsba), (1), (2) had inhibition effects of 3.2 μM , 0.13 μM and 0.8 μM for HCA I and 18 μM , 0.14 μM ve 0.1 μM for HCA II with I_{50} .

Key Words: Glaucoma, Carbonic Anhydrase, Sulfonamides.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm, Kimya Bölümünün değerli öğretim elemanlarına , yüksek lisans arkadaşlarıma, analizlerin yapımı sırasında yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Cengiz YENİKAYA'ya ve Yrd.Doç. Dr. Doğan YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca yanımda olup beni her zaman destekleyen, bugünlere gelmem için her türlü fedakarlığı yapan canım aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Burcu ÇINAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ (E.C. 4.2.1.1)	11
2.1. Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	11
2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	12
2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları	12
2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	13
2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Metabolizmadaki Yeri.....	15
2.6. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	16
2.7. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması	21
2.7.1. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri	21
2.7.1.1. Asetazolamid	21
2.7.1.2. Metazolomid	21
2.7.1.3. Diklorfenamid.....	21
2.8.2 Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri	22
2.8.2.1. Dorzolamid	22
2.8.2.2 Brinzolamid	22
2.9. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Kullanım Alanları.....	22
2.9.1. Diüretikler olarak CAİ'ler	23
2.9.2. Göz bozukluklarının tedavisinde kullanılan CAİ'ler	23
2.9.3. Potansiyel antiobezite ilaçları olarak CAİ'ler	25
2.9.4. Kanser tedavisinde kullanılan CAİ'ler.....	26
2.9.5. Osteoporoz tedavisinde kullanılan potansiyel ilaçlar olarak CAİ'ler	27
2.10. Omurgasız CA'lar ve Onların İnhibisyonu	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	30

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	30
3.4. Yöntemler	32
3.4.1. Protein tayini	32
3.4.1.1. Kalitatif protein tayini	32
3.4.1.2. Coomassie Blue yöntemi ile protein tayini	32
3.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	33
3.4.2.1. CO ₂ -Hidrataz aktivitesi tayini	35
3.4.2.2. Esteraz aktivitesi tayini	34
3.4.3. Afinite jelinin hazırlanması	35
3.4.3.1. Sepharose-4B Matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı	35
3.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması	37
3.4.4.1. Hemolizat eldesi	37
3.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu	37
3.4.4.3. Diyaliz işlemi	37
3.5. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	39
3.5.1. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi	39
3.5.2. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin in vitro olarak incelenmesi	39
3.5.3. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkilerinin K _i sabitleriyle bulunması	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Afinite Kromatografisi ile hCA I ve hCA II İzoenzimlerin Saflaştırılması	41
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi	43
4.2.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi	43
4.2.2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin in vitro olarak incelenmesi	50
4.3. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K _i Sabitlerinin Bulunması	57
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	65
KAYNAKLAR DİZİNİ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Lasamidin kimyasal yapısı.....	1
1.2. Lasamidin kristallografik yapısı. Proton atlamasından önce ve sonraki lasamid dimeri.....	2
1.3. Furosemidin kimyasal formülü.....	3
1.4. Furosemidin kristallografik yapısı.....	3
1.5. Diklorfenamidin kimyasal formülü.....	5
1.6. Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.....	9
1.7. Afinite kromatografisinde uzantı kolunun şematik gösterimi (L: Ligand; M: molekül).....	10
2.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119).	13
2.2. CA enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi.....	14
2.3. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi.....	16
2.4. Karbonik Anhidraz İnhibitorlerinin yapısı.....	17
2.5. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması.....	20
2.6. Glokom hastalığına yakalanmış farklı göz örnekleri.....	24
2.7. (1) bileşiğinin molekül yapısı ve atom etiketleme planı.....	28
2.8. (2) bileşiğinin molekül yapısı ve atom etiketleme planı.....	29
3.1. Afinite Jelinin Hazırlanması.....	36
3.2. Diyaliz işleminin uygulanması.....	38
4.1a. HCA I enziminin elüsyon grafiği.....	41

Şekiller Dizini (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1b. HCA II enziminin elusyon grafiği.....	41
4.2. Bradford yöntemi kullanılarak hazırlanan standart grafik.	43
4.3. İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin etkisi. .	44
4.4. İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.....	45
4.5. İnsan eritrosit CAI enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.....	46
4.6. İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin etkisi.	47
4.7. İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.	48
4.8. İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.	49
4.9. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin etkisi....	50
4.10. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.	51
4.11. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.	52
4.12. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin etkisi. .	53
4.13. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.	54
4.14. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.	55
4.15. İnsan eritrosit CA I enzimi üzerinde (HSBA) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği. ..	58
4.16. İnsan eritrosit CA I enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.	59
4.17. İnsan eritrosit CA I enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.	60
4.18. İnsan eritrosit CA II enzimi üzerinde (HSBA) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği. .	61
4.19. İnsan eritrosit CA II enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	62
4.20. İnsan eritrosit CA II enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri.	11
2.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar.	12
2.3. Bazı ilaçların inhibisyon etkileri.	18
3.1. Çalışmada kullanılan maddeler.	33
3.2. Esteraz aktivitesinde kullanılan maddeler.	34
4.1. İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	44
4.2. İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	45
4.3. İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	46
4.4. İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	47
4.5. İnsan eritrosit HCA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	48
4.6. İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	49
4.7. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiklerinin in vitro inhibisyon sonuçları.	50
4.8. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	51
4.9. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.	52
4.10. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiklerinin in vitro sonuçları.	53
4.11. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiklerinin in vitro inhibisyon sonuçları.	54
4.12. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiklerinin in vitro inhibisyon sonuçları.	55

Çizelgeler Dizini (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.13. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro CO ₂ -hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.	56
4.14. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.	56
4.15. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (HSBA) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i sonuçları.	58
4.16. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K _i sonuçları.	59
4.17. İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i sonuçları.	60
4.18. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (HSBA) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i sonuçları.	61
4.19. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K _i sonuçları.	62
4.20. İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K _i sonuçları.	63
4.21. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit insan eritrosit CAI ve CAII enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon sonuçları.	64
5.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.	66
5.2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
nM	Nanomolar
K	Kelvin
Å	Angstrom

Açıklama

Kısaltmalar

HCA	Karbonik anhidraz enzimi
E. C	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ES	Enzim-substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
E. U	Enzim ünitesi
HCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
HCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
GIB	Yüksek göz içi basıncı
Tris	Trihidroksimetilaminometan
FSE	Furosemid
IV	Damar yolu (intravenous)
IM	Kas içine (intramuscular)

Açıklama

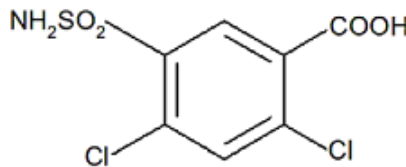
1. GİRİŞ

Lasamid (2,4-diklor-5-sülfamoil benzoik asit), furosemid (4-kloro-N-furfuril-5-sülfamoil antranilik asit) üretiminde kullanılan kimyasal bir maddedir. Lasamidin üretim aşamasından önce 2,4-diklorbenzoik asit klorosülfonik asit ile reaksiyona girerek 2,4-diklor-5-sülfamoil benzoik asiti oluşturur. Bu reaksiyondan ilk önce 2,4-diklor-5-klorosülfamoil benzoik asit, daha sonra da 2,4-dikloro-5-sülfamoil benzoik asit yani lasamid elde edilir. Bu reaksiyonlar kapalı bir sistemde gerçekleştirilir. Lasamid zar filtreli basınç kullanılarak ayrıştırılır [1].

Lasamidler aktif ilaç katkı maddeleridir yani kullanıma hazır etkin maddeler sınıfındadırlar. Lasamidler, hem diüretik (antihipertansif) hem de antiviral ilaçların aktif farmakolojik içeriğini oluştururlar.

270.09 molekül ağırlığında olan lasamid; beyaz kristal şeklindedir ve farelerde düşük oral ve dermal toksisite gösterir.

Sülfamoil benzoik asit sülfamoil diüretiklerinin ve antihipertansiflerinin bir parçasıdır. Bir sülfonamid türevi olan 2,4-dikloro-5-sülfamoil benzoik asit (lasamid) hem diüretik (antihipertansif) hemde antiviral ilaçların Aktif Farmakotik İçeriğidir (AFI) (Şekil 1.1). Lasamid; gözde, solunum sisteminde ve deride tahriş ve tahribata sebep olabilir. Fakat Ekoloji Toksikoloji ve Analitik Merkezi'nin (CETA) toksisite testlerine göre, zararlı bir madde olarak sınıflandırılmamaktadır [2].



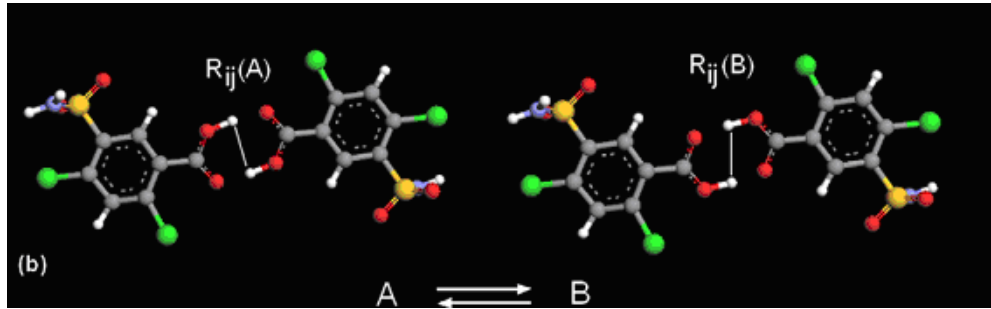
Şekil 1.1 Lasamidin kimyasal yapısı.

Bu alanda yapılan son çalışmalar lasamidin biyolojik olarak ortadan kaldırılamadığını belirtmektedir, ayrıca lasamidin üretim süreci; alerjik burun iltihabı ve astıma neden olabileceğinden ötürü bazıları tarafından tehlikeli olarak kabul edilmektedir. Fakat lasamid tümör hücrelerinde radyasyonel ve kimyasal duyarlılığa sebep olmakta ve bu işlem PXR/SXR (Pregnane X Alıcıları/Steroid and Xenobiyotik Alıcıları) nükleer alıcılarının aşırı salınımına

neden olmaktadır. Lasamidin bu özellikleri onu son zamanlarda daha fazla çalışılmasına neden olmuştur [1].

Lasamidin kimyasal, fiziksel ve toksikolojik özellikleri henüz tam olarak incelenmemiştir. Bu alandaki çalışmalarda sadece lasamidin fiziko-kimyasal özellikleri ile ilgili sınırlı bilgilere ulaşılabilmektedir. Örneğin lasamidin erime noktasının 503-507 K aralığında olduğu ve ateş altında toksik dumanların emisyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir. Notronografik ve X-ışını çalışmalarından elde edilen verilere göre [3] anhidroz lasamid P1 alan grubundaki triklinik sistemde temel hücredeki iki molekül ile birlikte kristalize olur. Bu olay benzer şekilde 4-klorbenzoik asitte de (4Cl-BAC-h6) görülmektedir [3]. Kristalize olan moleküller benzoik asit BAC-h6 ve furosemidirler.

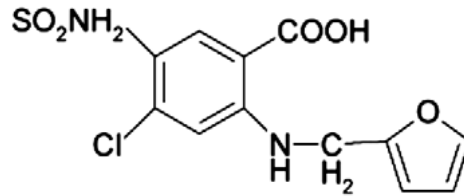
Kristalografik verilerden elde edilen bulgulara göre, lasamid OH gruplarının ortamda bulunmasının yardımıyla, iki molekül arasındaki hidrojen bağları ile bağlanmış simetrik dimerler oluşturur (Şekil 1.2). Dimerdeki bu hidrojen bağları $O - H \dots O$ kısa ve doğrusaldır ($O-H \dots O = 2.52 \text{ \AA}$ ve $\angle OHO = 168^\circ$). Bu doğrular BAC-h6'da bulunanlardan biraz daha kısa ve güçlüdürler [2] (Şekil 1.2).



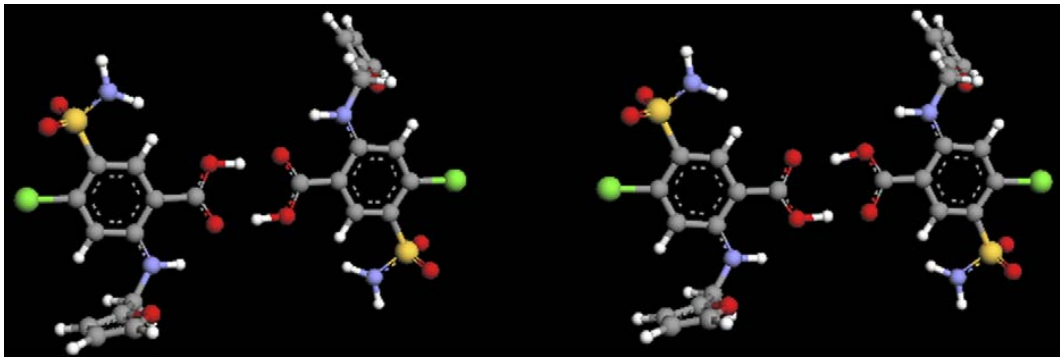
Şekil 1.2 Lasamidin kristallografik yapısı. Proton atlamasından önce ve sonraki lasamid dimeri.

Lasamidlerden sentezlenen furosemidlerin serbestleşme mekanizmasının üç tip hareketten oluştuğu bilinmektedir. Bunlar (a) proton transferi, Arrhenius tipi ve kuantum tünellemesi, (b) NH_2 atlamaları ve (c) izotropik yuvarlanma benzeri hareketlerdir [2]. Lasamid ile furosemidlerin serbestleşme mekanizmalarının benzerlikleri konusunda çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda, H NMR spektroskopisi ve DFT hesaplamaları kullanılmıştır.

Furosemidler hipertansiyon, anafilaktik şok, ödem, renal hastalıklar, kalp yetmezliği ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan diüretiklerdir. Furosemidlerin kimyasal formülü ve kristalografik yapısı sırasıyla Şekil 1.3 ve 1.4'te verilmiştir.



Şekil 1.3 Furosemidlerin kimyasal formülü.



Şekil 1.4 Furosemidlerin kristalografik yapısı.

Furosemidlerin moleküler dinamikleri hakkında henüz detaylı çalışmalar yapılmamıştır. Furosemidlerle ilgili çalışmalar neticesinde onun polimorfik yapısı bulunmuş ve erime noktası tesbit edilmiştir. Bu konudaki çalışmalar furosemidlerin, ölçüm yöntemi ile değişmekle birlikte, 479 ile 491 K lerde eridiğini göstermektedir. Furosemidlerin yapısı ve onlardaki yüksek erime noktası, FSE'lerin moleküller arası güçlü etkileşimlerin olduğunun birer kanıtıdır.

Lasamid ve furosemidin her ikisinin yapısında da SO_2NH_2 parçacığı bulunur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, her iki bileşiğinde, sulfonamid antibiyotiklerine alerjisi olan hastalar için yüksek alerji riski taşımadığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca lasamid ve furosemid antibiyotik olmayan sülfonamidler olarak tanımlanmaktadırlar. Sülfonamid antibiyotiklerine alerjisi olan 969 hastanın %10'u furosemid ve lasamid'e karşı da alerjik

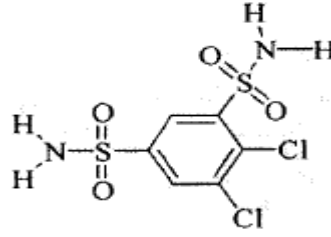
belirtiler göstermişlerdir. Diğer yandan bu tür ilaçlara alerjisi olmayan 19,257 hastanın yalnızca % 1.6'sı bu iki ajana karşı alerjik belirtiler göstermişlerdir. Bu sonuçlar penisilin ile karşılaştırılmış ve her iki grup içinde (sülfonamidlere alerjisi olan ve olmayan hastalar) daha yüksek risk oranları bulunmuştur. Bu bilgiler ışığında Strom ve arkadaşları lasamid ve furosemidin sülfonamid antibiyotiklerine alerjisi olan hastalar için yüksek alerji riski taşımadığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Johnson ve arkadaşları furosemid ile diğer sülfonamid ilaçları arasındaki karşılıklı reaktiviteden bahsedilen yalnızca bir hastalık raporu bulunduğunu bildirmektedirler [1].

Furosemid, kıvrım diüretikleri içinde üstünlükleri nedeniyle fazla tercih edilen güçlü bir diüretiktir. Diğerlerine göre ototoksik etkisi, gastrointestinal yan etkisi ve alkaloz yapma eğilimi daha azdır. Akut akciğer ödemi veya akut böbrek yetmezliği gibi acil durumlarda IV yoldan kullanılır. Gerekirse oral ve IM olarak da verilebilir. İndometasin ve aspirin, furosemidin diüretik ve natriüretik etkinliğini azaltır [4].

Diüretik ilaçlar, böbreklerin değişik bölgelerinde etkili olurlar. Furosemid henle kıvrımı üzerine etkili olan aynı zamanda kıvrım diüretikleri diye adlandırılan karbonik anhidraz inhibitörleri grubundadır. Bumetanid, etakrinik asit ve civalı diüretikler ile birlikte henle kulpunun çıkan kısmına etki eden en güçlü diüretiklerden biridir. Furosemid, ayrıca hiperkalseminin tedavisinde, ödemli hastalarda, akut sol kalp yetmezliğinin tedavisinde, akciğer ödemi tedavisinde, akut böbrek yetmezliği ve hipertansiyon tedavisinde de kullanılır [4, 5].

Furosemidin hiponatremi, hipokalemi, hipokloremik alkaloz ve hipotansiyon, hiperürisemi, hiperglisemi ve geçici sağırılık gibi yan etkilerinin olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca, furosemid gut ve diyabet olgularında kontrendikedir.

Diklorfenamid (4.5-diklor-1.5 disülfamoil benzen): Bu ilaç in vitro asetazolamidden 30 kat daha fazla etkilidir. Diklorfenamidin yapısı Şekil 1.5'de verilmiştir. Lotti ve ark. tavşanlarda %10'luk diklorfenamid tuzu kullanarak al fakemotripsinle oluşturulan oküler hipertansiyonda basınçta -5.7 mmHg'lik bir azalma göstermişlerdir. Diklorfenamidin serbest asiti oküler penetrasyonunun zayıf olmasından dolayı etkili değildir ve normal gözlerde cevap alınamamaktadır. Diklorfenamid tuzunun tekrarlanan uygulamalarında muhtemelen yüksek pH'ya bağlı yan etkiler görülmektedir. Bu ilacın topikal formu insan için uygun görülmemektedir [6].



Şekil 1.5 Diklorfenamidin kimyasal formülü.

Diklorfenamid, diğer CAİ'ler olan metazolamid ve etoksazolamid gibi topikal uygulamalarda çok az absorbe edilirler ve GİB'ı düşürmede etkisiz oldukları belirtilmektedir. Diklorfenamid ile ilgili yapılan bir çalışma da Yaman ve ark. Hipokalemik periyodik paralizi (HPP) tedavisinde diklorfenamidin asetazolamide göre daha etkili olabileceğini belirtmişlerdir [7]. HPP, otozomal dominant geçişli olmasına rağmen sporadik olarak da görülen, hipokalemiye bağlı kas güçsüzlüğü atakları ile seyreden nadir bir hastalıktır. Diklorfenamid bu atakları önlemek için kullanılabilecek asetazolamidden daha çok tesir gösteren karbonik anhidraz inhibitörüdür. Diklorfenamidin kullanılan ortalama dozu 100 mg/gün dür. Yaman ve ark., diklorfenamidin asetazolamid etkin olmayınca kullanılabileceğini belirtmektedirler [7].

Laboratuvarlar birçok önemli kimyasal reaksiyonların kimyagerler tarafından gerçekleştirildiği ve buradan çıkan sonuçların insanlığa sunulduğu önemli yerlerdir. Bunun gibi her canlı vücudunda da milyonlarca laboratuvarın varlığı dikkate değerdir. Hücre ve hücrelerden oluşmuş canlılar durup dinlenmeden reaksiyonların gerçekleştiği kimyasal laboratuvarlardır. Bu laboratuvarlarda görev alan kimyagerler ise enzim olarak adlandırılan biyo-makromoleküllerdir. Biyokimya tarihinde en fazla yer alan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir [8].

Enzimler canlı hücreler tarafından oluşturulan ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmadan %100 lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Örneğin, karbondioksit'in (CO₂) su ile reaksiyona girmesiyle karbonik asit meydana gelir. Fizyolojik pH'da meydana gelen karbonik asitin bir kısmı hemen bikarbonat iyonuna dönüşmektedir. İyonizasyon süreci enzim gerektirmez ve asit özelliğine bağlıdır. Canlı vücudunda ise bikarbonat iyonu oluşması karbonik anhidraz enziminin katalizörlüğünde meydana gelir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç bütün enzimler protein yapısındadır.

Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile tanımlanır. Turnover sayısı birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim, $40.000.000 \text{ s}^{-1}$ ile katalazdır [9].

Genel olarak enzimlerin özellikleri şu şekilde açıklanabilir;

1. Enzimlerin büyük çoğunluğu protein yapısındadırlar.
2. Benzer tür reaksiyonlar enzimler tarafından defalarca gerçekleştirilebilir.
3. Bir enzim daima tek çeşit veya aynı tip reaksiyonları katalizler.
4. Katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjisini azaltırlar.
5. Enzimler gerçekleşecek reaksiyonun çabuk dengeye gelmesini sağlarlar.
6. Enzimler canlı ortamda olduğu gibi cansız ortamda da görev alırlar.

Enzimler substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre son derece spesifiktirler. Genellikle bir enzim sadece bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı oldukça spesifiktirler, hatta bazı enzimlerin substrat özgüllükleri mutlaklıdır.

Birçok biyo-katalizörün stereospesifiklik özelliği de vardır. Bazı enzimler substrat molekülünün D-formunu ürüne çevirirlerken, bazıları da L-formunu ürüne dönüştüren tepkimeyi katalizlemektedirler. Ayrıca, aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen fakat farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimler de vardır. Bu tip enzimler izoenzim olarak adlandırılır. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktörlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri değişiktir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildiği gibi, bir hücrenin farklı subsellüler fraksiyonlarında da görülebilirler. İzoenzimlere örnek olarak bu tez kapsamında çalışılan karbonik anhidraz verilebilir [10].

Enzimleri saflaştırmak oldukça zor bir süreçtir. Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu meydana gelen ürün veya enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir. Enzimlerin aktivitesi üzerinde etkili olan faktörler arasında, substrat konsantrasyonu, enzim konsantrasyonu, pH, sıcaklık, allosterik etkiler, iyonik şiddet, hormonlar, inhibitör veya aktivatörler sayılabilir. Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri mevcuttur. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite azalır.

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem in vivo hem de in vitro olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayı inhibisyon olarak adlandırılır. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, çoğunlukla küçük mol kütlelerine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, canlı sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bu nedenle enzim inhibisyonu büyük bir önem arz etmektedir. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu şekilde gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının araştırılmasında da inhibisyon olayından faydalanılır [11].

Enzimatik inhibisyon iki grupta incelenir;

- a) Dönüşümsüz inhibisyon
- b) Dönüşümlü inhibisyon

Dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks meydana getirir. Dönüşümsüz inhibisyonunda V_{max} (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır, K_m ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun tersine dönüşümlü inhibisyonunda enzim ile inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

- 1. Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- 2. Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- 3. Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit şekli yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenir. Ancak substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri sabit kalırken, K_m değeri artar.

Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda etkiyebilir. Bu durum bağlanmanın enzimin farklı bölgesine olduğunu gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini azaltarak gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma yoktur. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri düşerken,

KM değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör aynı bölgelere bağlanmadığından, enzimin iki farklı inaktif kompleksi oluşur: EI ve ESI.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon tipinde; inhibitör serbest enzime bağlanamaz, sadece ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Buna karşın birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. V_{max} ve K_m değerleri azalır [12, 13].

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonun özel bir çeşidi olan lineer karışık tür inhibisyon, dönüşümlü inhibisyon sınıfına girer. Bu tür inhibisyonda; E, S ve I'nın bağlanma denge sabitleri değişmektedir [12].

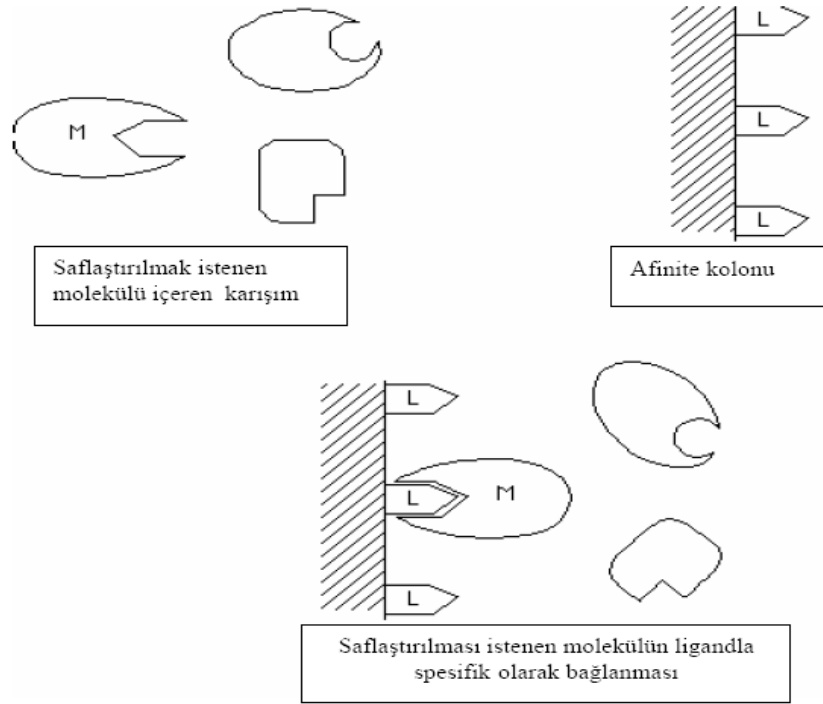
Daha öncede belirtildiği gibi enzimler protein yapısında olduklarından dolayı protein saflaştırma yöntemleri enzimler içinde uygulanabilir. Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zor bir süreçtir. Buna karşın birçok enzim saf olarak elde edilebilir. 1000'in üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den daha fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözeltideki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Globuler proteinlerin bu özelliklerin şöyledir:

- Molekül büyüklüğü
- Çözünürlük farkı esasından faydalanarak proteinlerin ayrılması
- Elektriksel yük esasından faydalanarak proteinlerin ayrılması
- Seçimli adsorbsiyon esasından faydalanarak proteinlerin ayrılması
- Spesifik ligandları esasından faydalanarak proteinlerin ayrılması (Afinite kromatografisi).

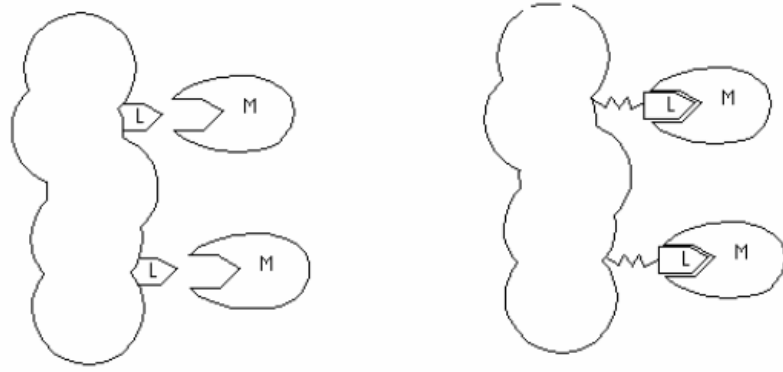
Enzimlerin, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç veren; spesifik ligandları esasından faydalanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi olan afinite kromatografisi yöntemidir ve bu yönteme göre karbonik anhidraz enzimini saflaştırıp karakterizasyon incelenmesi yapılabilmektedir. Bu yöntemde; ligand, enzime son derece spesifik olduğundan dolayı enzime kolayca bağlanır. Diğer enzim ve moleküller ortama bağlanamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzim kolonda kalır.

Kolonda kalan enzim, uygun tamponlarla elue edilir. Afinite kromatografisinin mekanizması Şekil 1.6’de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.6 Afinite kromatografisinin şematik gösterimi.

Safıştırılması istenen molekülün kolonda liganda bağlanması, çoğu durumda matriks ile ilgili molekül arasındaki sterik engelden dolayı zor olmakta ve kolon verimi azalmaktadır. Bu sorun, uygun uzantı kolu kullanılarak ortadan kaldırılabilir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Afinite kromatografisinde uzantı kolunun şematik gösterimi (L: Ligand; M: molekül)

Buna göre bir afinite kromatografi işlemi; uygun bir ligandın seçimi, taşıyıcı matriks üzerine ligand immobilizasyonu, protein karışımının matriks ile temas ettirilmesi, istenmeyen proteinlerin elue edilmesi ve ilgilenilen proteinin saf olarak elde edilmesi olmak üzere alt basamakları içerir.

2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ (E.C. 4.2.1.1)

2.1 Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidrazlar (CA'lar; aynı zamanda karbonat dehidratlar olarak da bilinirler), prokaryotlarda ve ökaryotlarda sıkça rastlanan dört farklı gen familyası halinde kodlanan metalloenzimlerdir. Bunlar α -Karbonik Anhidrazlar (omurgalılarda, bakterilerde, su yosunlarında ve yeşil bitkilerin iç sıvılarında bulunur), β Karbonik Anhidrazlar (yaygın olarak bakterilerde, su yosunlarında, tek ve iki çenekli bitkilerin kloroplastında bulunur), γ Karbonik Anhidrazlar (yaygın olarak arkeobakterilerde ve bazı diğer bakterilerde bulunur) ve bazı tek hücreli deniz alglerinde (diatom) bulunan δ Karbonik Anhidrazlarda vardır [14, 15]. Memelilerde, farklı katalitik aktivitelerde, değişik hücre altı sınırlamaları ve farklı doku dağılımları olan 16 α CA izoenzimi yada CA bağlantılı protein tarif edilmiştir (Çizelge 2.1). Beş, sitozolik formda (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), beş, membrana bağlı izoenzim (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV), iki, mitokondrial formda (CA VA ve CA VB) ve bir salgılanmış CA izoenzimi (CA VI) vardır [16, 17].

Çizelge 2.1 Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri [18].

İzoenzim	Katalitik Aktivitesi (Hidrataz)	Hücre İçi Yerleşimleri
CA-I	Düşük	Sitozol
CA-II	Yüksek	Sitozol
CA-III	Çok düşük	Sitozol
CA-IV	Yüksek	Plazma Membranı
CA-V	Orta dereceli* / Yüksek	Mitokondri
CA-VI	Orta dereceli*	Tükürük içinde
CA-VII	Yüksek	Sitozol
CARP-VIII	Yok	Sitozol
CA-IX	Yüksek	Plazma membranı
CARP-X	Yok	Sitozol
CAPR-XI	Yok	Sitozol
CA-XII	Düşük	Plazma membranı
CA-XII	Düşük	Sitozol
CA-XIV	Yüksek	Plazma membranı

* pH 7.4'de orta dereceli, pH : 8.2'de yüksek

2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

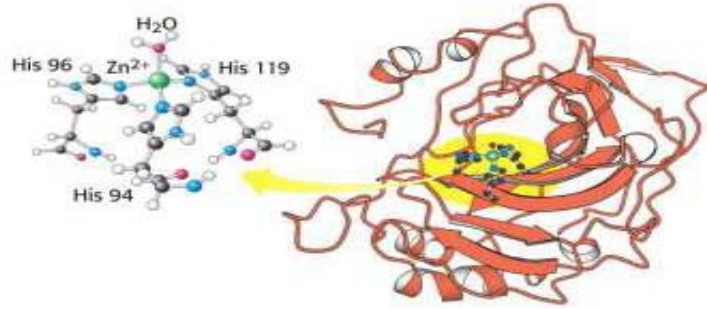
Karbonik anhidrazlar, CO₂ molekülünün hidratasyon reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamoik aside yada ürenin siyamide dönüşmesi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de CA tarafından katalizlenmektedir. Aynı zamanda CA enzimi hidrataz aktivitesi dışında, Çizelge 2.2'deki gibi elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, piruvat, ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizmada fizyolojik bir fonksiyonu olup olmadığı henüz bilinmemektedir [19, 20].

Çizelge 2.2 Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar.

(1)	$O=C=O + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O$	$\rightleftharpoons$	H_2NCOOH
(3)	$HN=C=NH + H_2O$	$\rightleftharpoons$	H_2NCONH_2
(4)	$RCHO + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$RHC(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$RHCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$RSO_3H + ArOH$
(7)	$ArOPO_3^{2-} + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$HPO_3^{2-} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$HF + ArOH$ (Ar= 2,4 dinitrofenil)
(9)	$PhCH_2OCOC1 + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$PhCH_2OH + CO_2 + HC1$
(10)	$RSO_2C1 + H_2O$	$\rightleftharpoons$	$RSO_3H + HC1$ (R=Me;Ph)

2.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında bazı değişiklikler gözlenmektedir. İzoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına rağmen, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 2.1'te gösterildiği gibi her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometride olup, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü koordine olmuştur. Zn⁺² iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteyi yitirir [21, 22, 23, 24].



Şekil 2.1 Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119).

İnsan eritrosit CA I ve CA II izoenzimlerinin aminoasit dizilişlerinin belirlenmesi, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonra sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına ait CA I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA II izoenzimlerinin amino asit dizilişleri tam olarak tespit edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA III izoenziminin amino asit dizilişi ise, insan için tanımlandığı gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu anlaşılmıştır [25, 26].

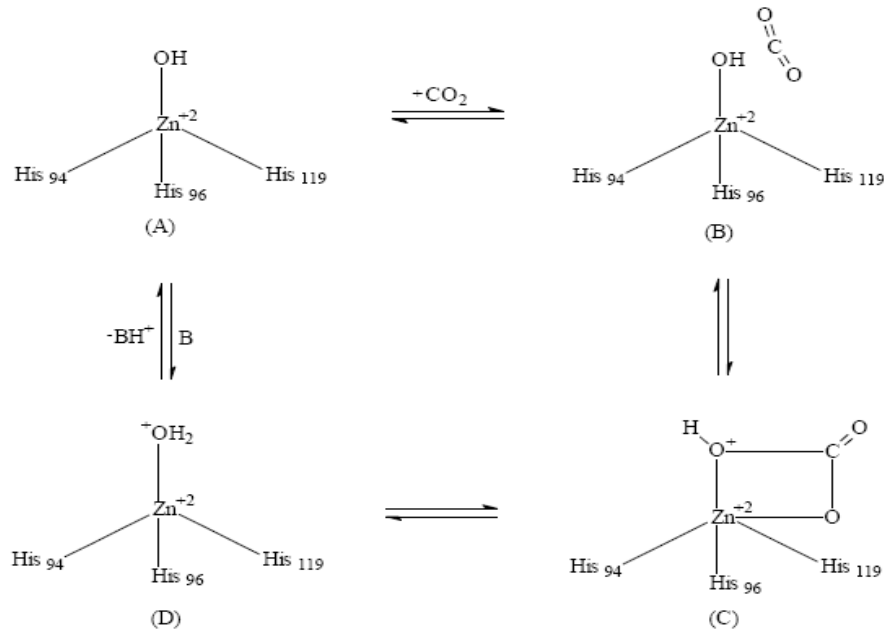
Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine karşın, aktiviteleri açısından farklılık göstermektedir. CA II izoenzimi CA I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi en fazla olanıdır. CA III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve CO₂-hidrataz aktivitesi CA I izoenziminin %5 kadardır [22, 27]. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları, 28.000 dalton, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hegzamerik bir yapıda olan CA'nın ise 180.000 dalton olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, insan böbreğinde hücre zarına bağlı 66.000 dalton molekül ağırlığında ve yine tavşan eritrositlerinde 54.000 dalton molekül ağırlığında, karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır [28, 29].

2.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 20 yıldır CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli fonksiyonları olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Aktif bölgede Zn⁺² iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu içermektedir. Aktif

bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde yerleşmişlerdir.

CA enziminin reaksiyonları katalizinde, Zn^{+2} iyonu önemlidir. Yapılan X-ray kristalografi verilerine göre, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Çinko bağlı H_2O , Glu106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu bağlanmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülün nükleofilitesini yükseltmekte ve molekülü nükleofilik atak için uygun yerdeki CO_2 'e doğru hareket etmektedir [30]. Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir (Şekil 2.2-A). Enzimin aktif yapısı, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 moleküle saldırır (Şekil 2.2-B). Bu da, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşturur (Şekil 2.2-C). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda, Zn^{+2} iyonuna su molekülüne tutunur ve bu da Şekil 2.2-D'de gösterildiği gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar [31].



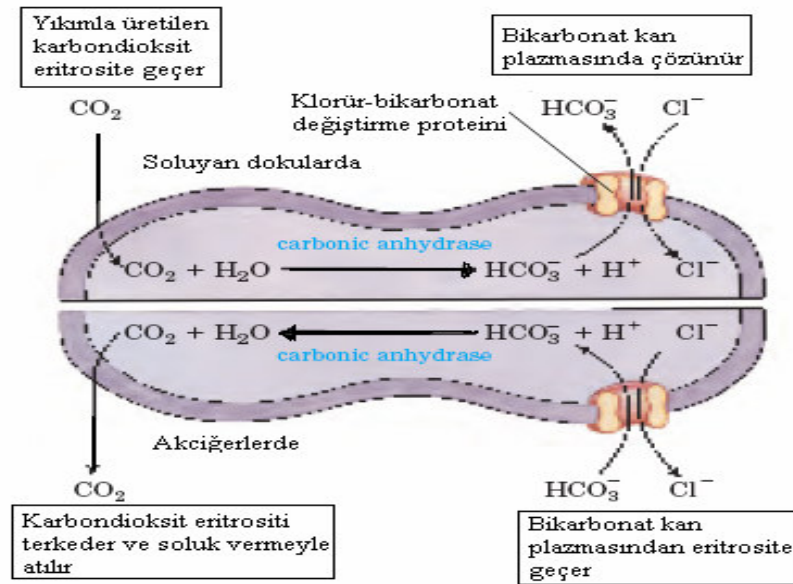
Şekil 2.2 CA enziminin CO_2 -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi [21].

2.5 Karbonik Anhidraz Enziminin Metabolizmadaki Yeri

Karbonik anhidraz enzimi CO_2 'nin su ile birleşmesini katalize eden enzimdir [32]. Oluşan H_2CO_3 kimyaca stabil bir bileşik olmadığından tamamen yakın bir kısmı iyonize olur. Bu enzim böbrek korteksinde proksimal ve distal tübül hücrelerinin ve toplayıcı tübül hücrelerinin lümenine bakan kısımlarında konsantre olmuş durumdadır. Aynı zamanda eritrositlerde, mide mukozasında, gözde korpus siller ve beyinde bulunur. Karbonik anhidraz çok önemli bir enzimdir. Çünkü böbreğin alkalileri tasarruf etmesini, asidi, idrar atılımını ve böylece ekstraselüler sıvının asit-baz dengesinin korunmasında görev alır. Gözde korpus siller'de hümör aközün meydana gelmesi karbonik anhidraz enzimi tarafından sağlanır. Enzimin inhibisyonu hümör aköz salgılanmasının düşmesine neden olur.

Enzim, H^+ ve ün HCO_3^- böbrekte, midede, kırmızı kan hücrelerinde, akciğerde pankreasta geçişini sağlar. Vücudun bazı bölgelerinde gerçekleşen bu olay göz içinde retinada, göz hücrelerinde, iristeki epitel dokularda da meydana gelir. Aynı süreç göz içindeki korpus siller cisminde görülür. Gözdeki hücrelerden Na^{+2} , HCO_3^- iyonlarıyla hümör aköze taşınır. Bu olay ozmotik basınçla meydana gelir. Ozmotik basıncın dengesini sağlamak için su molekülleri de hücrelerden hümör aköze geçiş yaparlar. Bu iki bölge arasında hümör aköz tarafından üretime dayalı yükselişten kaynaklanan dengesizlik meydana gelirse (yaklaşık 0.2 mikrolitre min-1 mmHg) göz içi basıncında (GİB) bir yükselme olur [32].

CA enzimi eritrositleri de içine alan birçok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda görev almaktadır. Doku / organlar ile akciğer arasındaki CO_2 / HCO_3^- respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda (Şekil 2.3), pH ve CO_2 homeostazında, elektrolit sekresyonunda, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynamaktadır [30, 33].



Şekil 2.3 Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi.

Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan HCO_3^- 'in giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın CO_2 taşıma kapasitesini yükseltmektir [8].

2.6 Karbonik Anhidraz İnhibitorleri

25 farklı Karbonik Anhidraz inhibitörlerinin yapısı Şekil 2.4.'de verilmiştir [34, 35]. Bu klasik inhibitörden olan asetazolamid (1), metazolamid (2), etakzolamid (3), sulthiam (4) ve diklorfenamid (5)'i içerir. CAİ'ler, ayrıca dorzolamid (6), brinzolamid (7), indisulam (8), topimarat (9), zonisamit (10), sulfirid (11), coumat (12), emat (13), celecoxib (14), valdecoxib (15) ve sakkarin (16) gibi son zamanlarda bulunan ilaçları ve araştırılan ajanları da içerir. 17 ve 18 numaralı türevler tümör ile ilgili CA IX izoformlarına karşı kullanılan ajanlardır. Aralarında thiazidler ise 19 a ve e arasındaki bileşenler ve 20-25 arasındaki türevlerin de olduğu bu bileşenlerin pek çoğu ilk olarak diüretik araştırmalar sırasında geliştirilmiştir [30, 34]. Ayrıca bu enzim inhibitörlerinin bazıları glokomun tedavisinde kullanılabilir. Son zamanlarda da yeni türev potansiyel topikal antiglokom ajanları olarak antitümör, antiobezite ve antienfektif ilaçlar keşfedilmiştir.

çok dokuda ve organdaki yayılmış yerleri ve mevcut inhibitörlerin izoenzim seçiciliğinin olmamasıdır. [36].

Çizelge 2.3 Bazı ilaçların inhibisyon etkileri.

K (nM)	Izoenzim (f= fare)											
	CA I	CA II	CA III	CA IV	CA VA	CA VB	CA VI	CA VII	CA IX	CA XII	fCA XIII	fCA XIV
1	250	12	2x10 ⁵	74	63	54	11	2.5	25	5.7	12	41
2	50	14	7x10 ⁵	6,200	65	62	10	2.1	27	3.4	19	43
3	25	8	1x10 ⁶	93	25	19	43	0.8	34	22	50	2.5
4	374	9	6.3x10 ⁵	95	81	91	134	6	43	56	1,450	1,540
5	1,200	38	6.8x10 ⁵	15,000	630	21	79	26	50	50	23	345
6	50,000	9	7.7x10 ⁵	8,500	42	33	10	3.5	52	3.5	18	27
7	45,000	3	1.1x10 ⁵	3,950	50	30	0.9	2.8	37	3.0	10	24
8	31	15	10,400	65	79	23	47	122	24	3,4	11	106
9	250	10	7.8x10 ⁶	4,900	63	30	45	0.9	58	3.8	47	1,460
10	56	35	2.2x10 ⁶	8,590	20	6,033	89	117	5.1	11,000	430	5,250
11	12,000	40	10,600	6.5x10 ⁵	174	18	0.8	3,630	46	3.9	295	110
12	3,450	21	7.0x10 ⁵	24	765	720	653	23	34	12	1,050	755
13	37	10	6.5x10 ⁵	-	-	-	-	-	30	7.5	-	-
14	50,000	21	7.4x10 ⁴	880	794	93	94	2,170	16	18	98	689
15	54,000	10	7.8x10 ⁴	1,340	912	88	572	3,900	27	13	425	107
16	18,540	5,950	1.0x10 ⁶	7,920	10,060	7,210	935	10	103	633	12,100	773
17	1,300	45	1.3x10 ⁶	650	134	76	145	18	24	5	76	33
18	4,000	21	3.1x10 ⁵	60	88	70	65	15	14	7	21	13
19	328	290	7.9x10 ⁵	427	4,225	603	3,655	5,010	367	355	3,885	4,105
20	35,000	1,260	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	54,000	2,000	6.1x10 ⁵	216	750	312	1,714	2.1	320	5.4	15	5,432
22	348	138	1.1x10 ⁴	196	917	9	1,347	2.8	23	4.5	15	4,130
23	51,900	2,520	2.3x10 ⁵	213	890	274	1,606	0.23	36	10	13	4,950
24	62	65	3.2x10 ⁶	564	499	322	245	513	420	261	550	52
25	4,930	6,980	3.4x10 ⁶	303	700	-	-	-	25.8	21.2	2,570	250

CA I, CA IV, CA VA, CA VB ve CA XIV gibi diğer izoenzimler, yine de, bu bileşenler tarafından inhibisyona (inhibisyon sabitleri nanomolar ve mikromolar aralıkta olmak üzere) daha az eğilim gösterirler. Bu olay CA III'ü sülfonamidler ve sülfomatlar tarafından inhibisyona duyarlı olmayan tek izoform olarak gösterir. Türevlerden az bir kısmı belirli izoformlara seçicilik gösterir: bunlar klasik inhibitörler ve topikal olarak etken antiglokom sülfonamidler olan bileşenler 6 ve 7 ile birlikte indisulam 8 CA II, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA IX, CA XII, CA XIII ve CA XIV için yüksek uyum gösteren seçici olmayan CAI'lerdir. Topiramet (bileşen 9) düşük nanomolar aralıkta bir CA VII inhibitörüdür fakat aynı zamanda CA II, CA VB ve CA XII'yi de etkin olarak inhibe eder [18, 37]. Zonisamid (bileşen 10) CA IX için yüksek uyum gösterir ama diğer izoformlara karşı zayıf uyum gösterir. Ayrıca, CA II ve CA VA'yı etkin bir şekilde inhibe eder. Sulfirid (11) güçlü CA VI ve CA XII inhibitörüdür ve diğer

izoformlara zayıf uyum gösterir. Valdecoxib (15) güçlü CA XII inhibitörüdür, öte yandan sakkarin (16) sadece CA VII'ye özgü bir inhibitördür [16].

Karbonik anhidrazların en güçlü organik inhibitörleri, aromatik ve heteroaromatik Sülfonamidlerdir. Sülfonamidler $R-SO_2NH_2$ yapısındadırlar. Burada R, genellikle aromatik ve heteroaromatik halkadan oluşan sistemdir. Sülfonamidlerin en önemli özelliklerinden birisi,



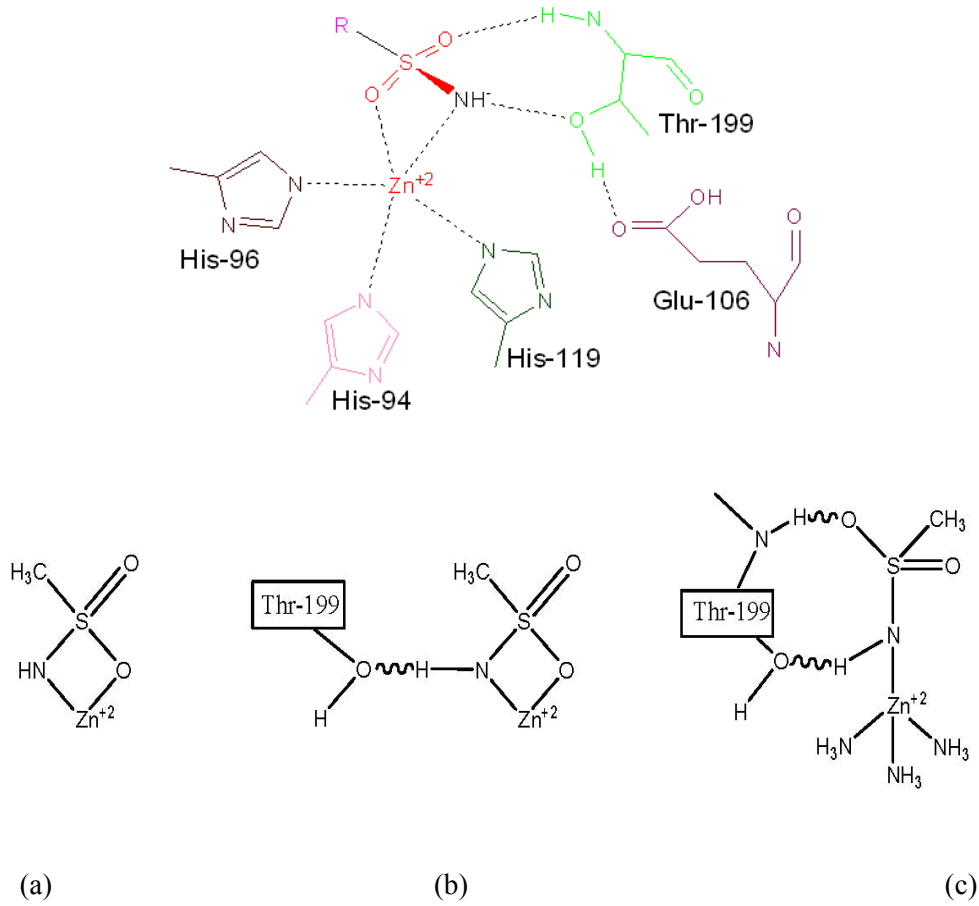
denkleminde göre kolaylıkla iyonik yapı kazanımlarıdır. Bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi için oldukça önemlidir. Sülfonamidler içerdikleri bu hidrofilik bölgeye ek olarak, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere de sahiptirler. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle $R-SO_2NH^-$ bileşiğindeki N atomunun karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile iyonik olarak tutunması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime tutunması ile bu etkileşme tamamlanır [32, 38].

Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzime güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin sonucudur. Nitekim, sübstitüe ya da alkil Sülfonamidlerin enzime bağlanmasında yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grubu taşıyanlara nazaran daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise yalnızca hidrofilik bağlanma sonucu, CA için Sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevi üstlenemezler [39].

Aşağıdaki şekil karbonik anhidrazın inhibisyonunu göstermektedir. Sülfonamidin $R-SO_2NH^-$ anyonu enzimde hidroksi anyonu yerine Zn^{+2} 'ya koordine olmaktadır. İnhibitörün sülfonamid azotuna bağlı proton Thr-199'un hidroksil grubuyla bir hidrojen bağı yapar ve sırayla Glu-106'nın karboksilik grubu Thr-199'un yan zincir hidrojeni ile hidrojen bağı yapar. Zn^{+2} 'ya koordine olan sülfonamid oksijenlerinden biri Thr-199'un $-NH$ grubu ile bir hidrojen bağı verirken diğeri Zn^{+2} iyonu ile kısmi koordinasyon meydana getirir. Bu etkileşimler CA-II ile tüm sülfonamidler arasında meydana gelir. Sülfonamidin $R-SO_2NH_2$ kısmı aktif bölge yarığının hidrofobik parçası içinde kalır. Yan zincir ile Ile-91, Val-121, Val-143, Leu-198, Pro-202 ile van der Waals etkileşimi oluştururken metoksi grubunun hidrofilik parçasına yönelmiş olarak Gln-92, Ser-197 ve Thr-200 ile van der Waals bağlantıları yapar [40].

Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını ortaya koymak için yapı aktivite ilişkileri ve enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre,

Sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı şekilde Van-der Waals etkileşmelerinden dolayı K_i değerlerinde önemli fark olduğunu göstermiştir [41].



Şekil 2.5 Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması.

Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesi arttırılmıştır. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron, emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici antibiyotik olarak günümüzde kliniklerde kullanılmaktadır. Bu

nedenle CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi oldukça önemlidir [30].

2.7 Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması

Karbonik anhidraz inhibitörlerini yapılarına ve etki mekanizmalarına bakarak ayırmak mümkündür. Sülfonamidlerden elde edilen bu maddeler sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri ve topikal karbonik anhidraz inhibitörleri olarak iki sınıfa ayrılır.

2.7.1 Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri

- Asetazolamid
- Metazolamid
- Diklorfenamid

2.7.1.1 Asetazolamid

Açık açılı glokom, sekonder glokom ve kapalı açılı glokomda ameliyattan önce ya da sonra göz içi basıncını azaltmak için kullanılır. Asetazolamid ağızdan yada intravenöz enjeksiyon ile alınır. Solüsyonun pH'sının alkali olması sebebiyle intramusküler uygulanımı ağırlıdır. Asetazolamid sülfonamid grubundan bir ilaçtır; bazen hematolojik bozukluklar, döküntü ve sülfonamidlere bağlı başka yan etkiler meydana gelir. Çoğunlukla uzun süre kullanılması tavsiye edilmese de meydana gelen elektrolit bozuklukları ve metabolik asidoz potasyum bikarbonat (efervesan tablet) verilerek düzeltilebilir. Enjeksiyon şekli Türkiye'de bulunmamaktadır [42, 43, 44].

2.7.1.2 Metazolomid

Böbrek taşları ve kan diskrazilerine sebep olabilir. Bu ajan, asetozolamide iyi bir alternatiftir ve daha uzun etkileme süresine sahiptir.

2.7.1.3 Diklorfenamid

Dozu 50-100 mgr dır ve günde 2 yada üç kez alınır. Etkisi 1 saat içinde başlar 3 saatte pik yapar ve 6-12 saat devam eder.

2.8.2 Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri

- Dorzolamid
- Brinzolamid

2.8.2.1 Dorzolamid

Topikal bir karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamid beta blokerlere dirençli ya da beta blokerlerin kontraendike olduğu hastalarda kullanılmak üzere tavsiye edilmiştir. Tek başına veya topikal bir blokerin yanında alınır. Karaciğer bozukluğu olanlarda dikkatli olunmalıdır. Ağır böbrek yetmezliği, gebelik, emzirenlerde ve hiperkloremik asidozu olanlarda kontrendikedir. Gözde yanma, batma, kaşıntı, ağızda acı tad, bulanık görme, gözlerde yaşarma, konjonktivit, yüzeysel punktat keratit, blefarit, anterior üveit, geçici miyopi; baş ağrısı, sersemlik, parestezi, asteni, bulantı, döküntü ve allerjik reaksiyonlar (ürtiker, anjio ödem, bronkospazm dahil), üriner sistem taşları oluşturma gibi yan etkilere sahiptir.

2.8.2.2 Brinzolamid

Azopt ticari adıyla %1 konsantrasyonda tedaviye sunulmuş başka bir topikal karbonik anhidraz inhibitörüdür. Dorzolamid gibi CA-II izoenzimi bloke ederek hüner aköz yapımını düşüren Sülfonamid türevi bir ilaçtır [45].

2.9 Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Kullanım Alanları

CA reaksiyonu solunum, CO₂'nin ve bikarbonatın metabolize eden dokular ve akciğer arasında taşınması; pH ve CO₂ dengelemesi; farklı doku ve organlarda elektrolit salgılanması; biyosentetik reaksiyonlar (glukoneojenez, lipojenez ve üre oluşması gibi); kemik emilmesi; kireçlenme ve tümör oluşumu gibi pek çok fizyolojik ve patolojik işleme katkıda bulunur.

Bu aktivitelere katılan pek çok CA izoenzimi, ödem, glokom, obezite, kanser, sara ve osteoporoz gibi bozuklukların tedavisinde inhibisyon göstererek kullanılmaya potansiyeline sahiptir.

Ayrıca, tekhücreliler, mantarlar ve bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarla savaşmak için CAİ'lerin potansiyel kullanımı son zamanların yeni araştırma konusudur. Farklı familyalara ait CA'lar klonlanmış, ve Plasmodium falciparum, Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis, Candida albicans ve Cryptococcus neoformans gibi pek çok organizmada

tanımlanmıştır. Bu CA'lar parazitlerin etkililik, büyüme ve intibakında hayati bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, birkaç aktivatör sınıfı tarafından gerçekleştirilen CA aktivasyonunun anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlanmıştır.

Bu tür bileşikler, Alzheimer hastalığında, yaşlanmada ve hafıza kayıpları ile ilgili diğer durumların tedavisinde kullanılabilecek farmakolojik ajanların bulunmasına yardımcı olabilirler.

2.9.1 Diüretikler olarak CAİ'ler

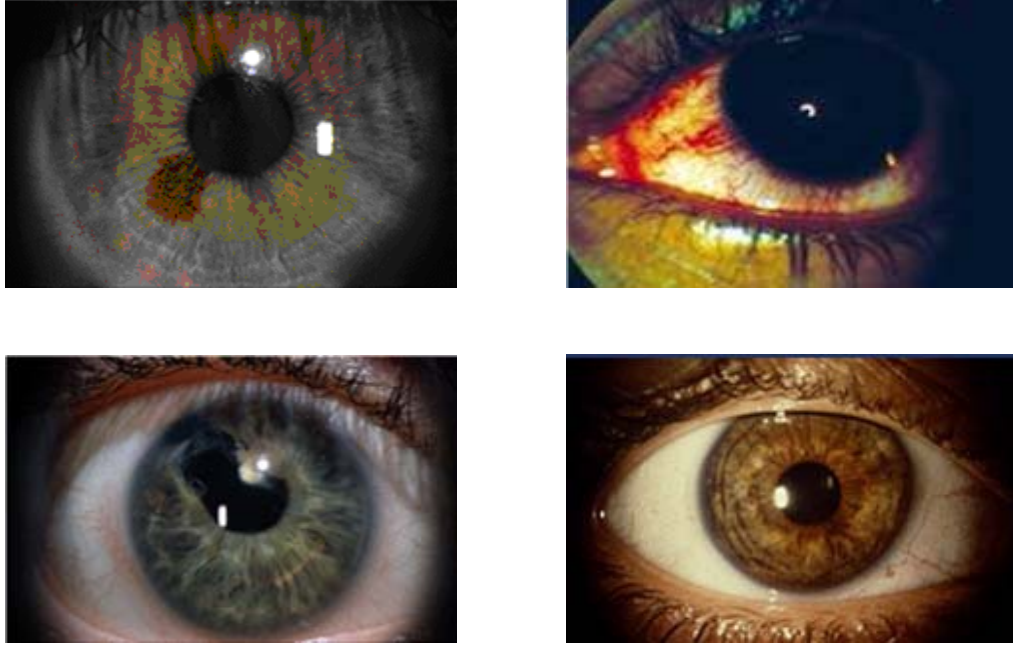
CA'lar böbrekte büyük miktarlarda bulunurlar ve bu organda bulunan izoenzimlerin en az üç fizyolojik işlemde önemli görevler üstlenirler. Bu görevler asit-baz denge ayarı (bu işlem enzimler tarafından katalize edilen CO_2 hidrasyon reaksiyonu neticesinde, protonları salgılayarak ve boşaltılarak gerçekleştirilir), bikarbonatın yeniden emilme işlemi ve NH_4 çıkışıdır. Asetazolamid (1) 1956 yılında klinik olarak kullanılan ve ilk civa olmayan diüretiktir. Diğerlerine nazaran daha sınırlı terapötik kullanıma sahiptir. Renal fizyoloji ve farmakolojideki temel gelişmelerde, thiazid ve yüksek düzeyli diüretikler gibi yaygın olarak kullanılan diüretik ajanlarının tasarımında önemli bir rol oynamıştır. Asetazolamidin uygulanmasından sonra, idrar hacmi artar ve alkaline halini alır [30, 45]. Artmış olan bikarbonat, idrarın içinde Na^+ ve K^+ 'nin katılımıyla birlikte elimine edilir. Öte yandan atılan klorid miktarı ortadan kalkmıştır. Bu olaylar dizisi yakın tübüllusta CA'nın inhibisyonu sonucunda gerçekleşir.

Sitozolik ve membrana bağlı (CA IV, XII ve CA XIV) enzimlerin inhibisyonu sülfonamidlerin diüretik etkilerine katkı sağladıkları varsayılmaktadır. Asetazolamid (1), metazolamid (2), etakzolamid (4) ve diklorfenamid (5) konjestif kalp yetmezliğinin neden olduğu ödemin tedavisinde kullanılırlar. Benzothiadiazineler (19a-e; örneğin, klorothiazid ve hidroklorothiazide); quinethazon (20); metolazon (21); klortalidon (22); indapamid (23); furosemid (24); ve bumetanid (25) gibi pek çok başka diüretik farklı verimlilik dereceleri ile CA inhibitörü olarak etkilidirler. Tüm bu diüretikler, etkili çinko-bağlı parçacıklar gibi hareket eden değiştirilmemiş birincil sülfonamid parçacıkları içerirler [30].

2.9.2 Göz bozukluklarının tedavisinde kullanılan CAİ'ler

Glokom kronik, bozulmuş, optik sinir başında geri döndürülemez zarara sebep olan yüksek göz içi basıncı (GİB) ile karakterize edilen göz hastalığıdır. Bu hastalık görme

fonksiyonu kaybıyla ve sonunda da körlükle sonuçlanır [46]. Aköz hümörün dinamikleri ve kimyası ile ilgili çalışmalar bu salgılayanın ana bileşeninin sodyum bikarbonat olduğunun bulunmasını sağlamıştır. CA enzimler gözün ön damar tabakasında bulunurlar ve bikarbonat salgılamasından sorumludurlar.



Şekil 2.6 Glokom hastalığına yakalanmış farklı göz örnekleri.

Lekeli (benekli) ödemin tedavisinde sistemik asetazolamidin etkili olduğu gözlemlenmiştir [46]. Son zamanlarda benzer verimlilik değerleri dorzolamid ve brinzolamidin topikal uygulamaları içinde görülmüştür. Ödemin kaybolması ve görme fonksiyonunun gelişmesinin, retinadaki dolaşımın doğrudan etkisi sebebiyle, sülfonamidin düşük tansiyona sebep olan aktivitesinden bağımsız olduğu varsayılmaktadır. Asetazolamid, dorzolamid veya brinzolamidler büyük olasılıkla bu organdaki kan akışını regüle eden ve bundan dolayı metabolik çöp ürünlerini ve drusenleri temizleyen, lokal damar genişleten ilaçlar olarak kullanılırlar[47, 48].

Gao ve arkadaşlarının çalışması sitozolik CA I izoenziminin kanayan retinal ve beyinsel damarlı geçirgenliğe, prekallikrein'in aktivasyonu ve oldukça etkili serine proteaz faktörü XIII'ün üretimi vasıtasıyla aracılık ettiğini göstermektedir [49]. Bu olaylar, çoğalan diyabetik retinopatinin ve diyabetik benekli ödemin patojenezine sebep olurlar. Bu iki olay görme

kaybının başlıca sebepleridir ve bunlara karşı mevcut bir farmakolojik tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle, Gao ve arkadaşları tarafından da belirtildiği gibi, CA I inhibisyonu bu durumların tedavisinde terapötik amaç olabilir [49, 50].

Son zamanlarda CA II'nin glokom hastalarının gözlerinde büyük oranlarda salgılandığı bulunmuştur. Bu durum hastalığın yüksek GİB oluşmasında önemli bir rol oynadığını varsaymaktadır. CA II'nin klinik olarak kullanılan bütün antiglokom sülfonamidleri tarafından yüksek oranda inhibe edildiği de bilinmektedir [51, 52].

Glokom, retinopati ve benekli dejenerasyon gibi göz bozukluklarında farklı CA izoformlarının etkilerini daha iyi anlamak için başka çalışmalar gereklidir.

2.9.3 Potansiyel antiobezite ilaçları olarak CAI'ler

Hayvanlarda bulunan α -CA sınıfı formları arasında iki CA VA ve CA VB, mitokondride bulunurlar. Bu izoenzimler, omurgalılarda (örneğin, kemirgenlerde) ve omurgasızlarda (örneğin, salkım ağacında) üre oluşumu, glukoneogenez ve lipogenez gibi birkaç biyosentetik işleme katkıda bulunurlar [53].

Antiobezite ilaçları olarak CAI'lerin CA izoenzimleri üzerindeki etkilerinden dolayı potansiyel faydaları olduğu kanıtlanmıştır [53, 54]. Topimarad (bileşen 9) sara tedavisinde kullanılan ve güçlü antikonvülzan etkiye sahip bir ilaçtır. Bu ilacın obez hastalarda gözlemlenen yan etkilerinden biri, bu konuda hiçbir farmakolojik açıklama yapılamamasına rağmen, kilo kaybıdır. Ayrıca, topimaradın zayıf ve obez Zucker farelerinde enerji ve kilo almayı azalttığı bulunmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, topimarad ayrıca CA II, CA VA, CA VB, CA VI, CA VII, CA XII ve CA XIII gibi birkaç CA izoenziminin güçlü inhibitörü olduğu bulunmuştur. Topimaradın CA II ile girişik x-ışını kristal yapısı son zamanlarda ulaşılan başka bir sonuçtur. Bu sonuç, bileşiğin CA aktif alanı için yakın uyumunu açıklayan moleküler etkileşimleri ortaya çıkarmıştır. Topimaradın aynı zamanda insan mitokondrial izoenzimleri olan CA VA ve CA VB'nin etkili bir şekilde inhibisyonunda rol alması, lipogenez esnasında hem mitokondrial hem de sitozolik CA izoenzimlerinin inhibisyonuyla kilo kaybının kontrolünde yeni bir yaklaşım sağlayabilir.

2.9.4 Kanser tedavisinde kullanılan CAİ'ler

Pek çok tümörde görülen önemli bir özellik hipoksiyadır. Yetersiz oksijen temini, yapısal ve işlevsel olarak bozuk mikrosirkülasyon ve kötü oksijen difüzyon işlemlerinin patofizyolojik bir sonucudur. Tümördeki oksijen azlığı tümörün yayılmasıyla, ilerlemesi, kemoterapi ve radyoterapiye direnç göstermesiyle güçlü bir şekilde bağlantılı görünmektedir. CA IX'un salınımı sırasında, artırılarak düzenlenmesi hipoksiya tarafından gerçekleştirilir ve azaltılarak düzenlenmesi doğal-tip von Hippel-Lindau tümör süpresör proteini (pVHL) tarafından gerçekleştirilir [55, 56].

Beyin tümörü (gliyom)/ependimomlar, mezotelyom, papilali/foliküllerden oluşmuş karsinomaları, idrar kesesindeki habis urlar, uteriner serviks, nazofarenkse ait habis urlar, kafa ve boyun, göğüs, yutak, akciğer, beyin, vulva, skuamöz /bazal hücre kötü urları ve böbrek tümörleri gibi pek çok tümörde CA IX salınımı güçlü bir şekilde gerçekleşir. Bazı kanser hücrelerinde, VHL geni, konstitütif HIF aktivasyonunun bir sonucu olarak güçlü CA IX salınımının düzenlenmesi sonucu mutasyona uğrar [55, 56].

Güçlü antikanser aktiviteli bir sülfonamid türevi olan indisulamın (10) (ilk olarak E7070 olarak isimlendirilmiştir), CA IX'un nanomolar inhibitörü olarak hareket ettiği yakın zaman önce bulunmuştur [56, 57]. Bu bileşenin detaylı aksiyon mekanizmaları bilinmemektedir, fakat CA inhibisyon özelliği ile birlikte, G1 ve G2 evrelerinde hücre devriminin düzensizliğine, siklinlerin azaltılarak düzenlenmesine, sikline-bağımlı kinaz 2'nin (CDK2) azaltılmasına, retinoblastoma proteini (pRb) fosforilasyonunun inhibisyonu, hücre birleşmesi, sinyalizasyonu ve bağışıklık tepkisi gibi aktivitelere katkıda bulunduğu bilinmektedir. Indisulam, farede insan tümör zenografına karşı önemli bir antitümör etkisi göstermiş ve katı tümörlerin tedavisinde klinik denemelerde 1. ve 2. evrelere ilerleyerek in vivo tesir göstermiştir.

Özet olarak, biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik veriler klasik kemoterapiye ya da radyoterapiye yanıt vermeyen hipoksit tümörlerin tedavisinde tümör-ilintili CA izoenzim olan IX'un inhibisyonunun faydalı olabileceğini belirtmektedir. Bu nedenle, şimdiye kadar bahsettiğimiz CAİ'lerin kullanımı, bu tümörlerin non-invazif görüntülenmesinde kullanılan teşhis araçlarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [58, 59].

2.9.5 Osteoporoz tedavisinde kullanılan potansiyel ilaçlar olarak CAİ'ler

Hayli aktif olan CA II kemikte yüksek oranlarda bulunurlar. Burada osteoklastlar toplanmışlardır. CA II'nin buradaki rolü CO₂'nin hidrasyonu vasıtasıyla oluşturulmuş hidrojen iyonlarını ATP-bağımlı proton pompalarına götürmektedir. Bu pompalar, hidrojen iyonlarını kemikten gelen kalsiyumun mobilizasyonu için kullanırlar. Bu mobilizasyon, organik matriks çözülmesinin enzimsel salınımından önce yapılan inorganik kemik matriksi için gereklidir [60].

Osteoklastlardaki membrana bağlı CA'ların fizyolojik rolünü değerlendirmek için, bileşen 18'le yapısal olarak benzer, yeni bir CA inhibitörü kullanılmıştır. Düşük inhibitör konsantrasyonlarına maruz bırakılmış fare osteoklast kültürlerinde osteoklast sayısı artmış ve kemik emilim aktivitesi gözlenmiştir. Öte yandan kullanılan yüksek oranlardaki konsantrasyonlar hücrelerin hayatta kalmasını etkilemiştir. İnhibitör tedavisi ayrıca osteoklastlardaki hücre-içi asitlenmeyi bozmuştur.

2.10 Omurgasız CA'lar ve Onların İnhibisyonu

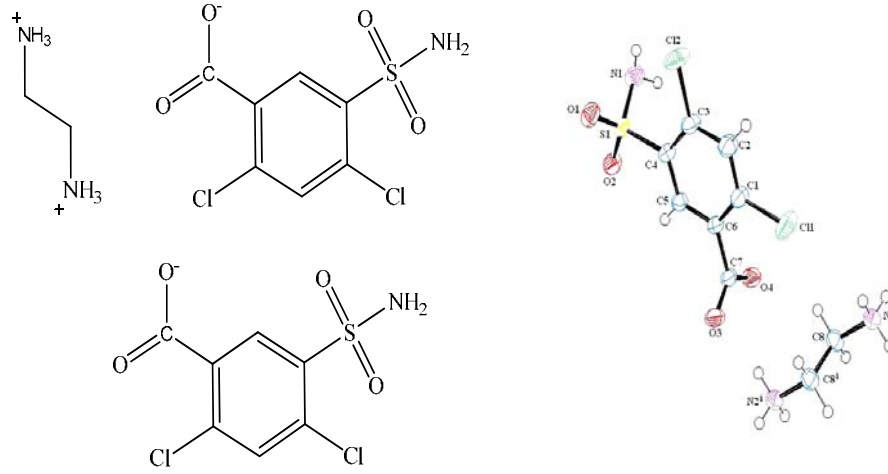
Ökaryot ve prokaryot genomların sıralanması, özellikle de yaygın hastalıklara neden olan patojenlerin ortaya çıkarılması (örneğin, sıtma, tüberküloz ile birlikte diğer bakteriyel ve fungal enfeksiyonlarda), CA'ların bu organizmalarda da bulunduğunu göstermiştir. Fakat omurgalılar sadece α -sınıfına bağlı bulunan CA'lara sahipken, bu tür daha basit organizmalar farklı CA familyalarına sahip enzimlere sahiptir [61, 62].

İnsanlarda görülen sıtmanın ölüme sebebiyet verebilecek durumlar oluşturmamasından genelde P.falciparum sorumludur. İlaçlara direnç gösteren sıtma parazitlerinin varlığı yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesine ve özelliklerinin ortaya çıkarılmasını gerektirmektedir. P.falciparum'da bulunan CA'lar α sınıfındandır ve insan host enzimleri olan CA I ve II'de bulunanlardan farklı katalitik özelliklere sahiptirler. 4-(3,4-Diklorfenilüre-etil)-benzensülfonamid P.falciparum'un büyümesini engellemede ve dolayısıyla sıtma ile mücadelede in vitro olarak en etkili sülfonamid CA'dır. Bu olgu, tek hücreleri enzimlere karşı sülfonamid CAİ'lerin yeni sıtma karşıtı ilaçların gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir [61, 62].

Bu çalışmada; karbonik anhidraz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve daha önce sentezlenen bileşiklerin; glokom tedavisinde rolü olan insan eritrosit CA-I ve CA-II

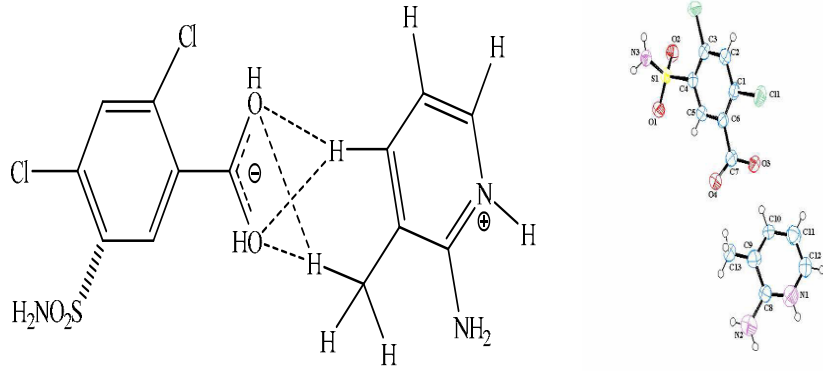
enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çıkış maddeleri olan Hsba, en ve amp bileşikleri ile de çalışılmıştır. Bunun yanı sıra CA-I enzimi ile inhibisyon çalışmaları yapıp CA-II ile karşılaştırılacaktır. Ayrıca bu bileşiklerden inhibisyon etkisi gösterenlerin %aktivite- [I] grafikleri yardımıyla I_{50} değerlerinin (%50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu) bulunması ve inhibisyon gösterenlerin de grafikler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin formülleri şöyledir:



Şekil 2.7 (1) bileşiğinin molekül yapısı ve atom etiketleme planı.

Hsba (lasamid) ve en (etilen diamin) proton transfer bileşiklerinden hazırlanan etan-1,2-diamonyum 2,4-diklor-5-sulfamoil benzoat (1)



Şekil 2.8 (2) bileşiğinin molekül yapısı ve atom etiketleme planı.

Hsba (lasamid) ve 2-amino-3-metilpiridin (2-amino-3-picoline) (amp) proton transfer bileşiklerinden hazırlanan 2-amino-3-metilpiridinyum 2,4- diklor-5-sülfamoil benzoat (2)

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, trihidroksi metil aminometan (Tris), siyanojen bromür, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, tiyonil klorür, piridin, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250 ve R-250 E., sodyum hidroksit ve karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar DPÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde bulunmaktadır.

- Santrifüj: Nüve NF800
- Soğutmalı santrifüj: Sigma K30
- Spektrofotometre: UV-1700 Mod. Shimadzu Mar. + AKS
- pH metre: Schott Instruments / Lab850
- Peristaltik pompa: Ismater MS-4/8 Reglo digital 4 kanallı 8 tekerli
- Karıştırıcı: Vortex-Genie, Heidolph
- Hassas terazi: Ohaus – Adventurer
- Kronometre: Hanhard, Electronische Digital-Stoppuhr Germany
- Otomatik Pipetler: Biohit Proline
- Manyetik karıştırıcı: Heidolph MR 3001
- Çalkalayıcı: GFL

3.3 Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1. 0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon):
6,055 g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

2. 0,2 M NaHCO_3 , pH=8,8 (Sephacrose - 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon):

16,8 g (0,02 mol) NaHCO_3 , 950 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

3. 0,0025 M Veronal tamponu;

5,15 g sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp, pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

4. 25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na_2SO_4 , pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon):

3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na_2SO_4 , 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

5. 25 mM Tris – HCl / 22 mM Na_2SO_4 , pH=8,7 (hemolizatin tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon):

3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na_2SO_4 , 950 mL destile suda çözülüp, 1 N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

6. 0,1 M NaCH_3COO / 0,5 M NaClO_4 , pH=5,6 (kolona tutunmuş CA II izoenzimi elüsyonu için kullanılan tampon çözelti):

9,187 g (0,075 mol) NaClO_4 ve 2,09 g (0,15 mol) $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot \text{H}_2\text{O}$, 120 mL destile su ile çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

7. CO_2 çözeltisi (CO_2 -hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti):

0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO_2 gazı geçirilerek hazırlandı.

8. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

9. Boyama çözeltisi (jelin boyanması için kullanılan çözelti):

0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

10. Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti):

%10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

11. Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti):

%50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

12. İnhibitör stok çözeltileri:

CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen 1, 2, 3 bileşiklerinin %1'lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5'er mg alınıp 1 mL dimetil sülfoksitte (DMS) çözüldükten sonra, hacimleri 5'er mL'ye tamamlandı.

3.4 Yöntemler

3.4.1 Protein tayini

3.4.1.1 Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşı okundu.

3.4.1.2 Coomassie Blue yöntemi ile protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [63].

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart insan eritrosit çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL coomassie reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Köre olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

3.4.2 Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

3.4.2.1 CO₂-Hidrataz aktivitesi tayini

Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da, pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na₂CO₃+0,1 M NaHCO₃) yararlanıldı [64, 65]. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c 'ye bölünmesi ile belirlendi.

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,1mL brom timol çözeltisi, 0,5 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymun CO₂ çözeltileri konuldu. Çizelge 3.1'de kullanılan maddeler gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan maddeler.

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (μ L)	Numune Tüpü (μ L)
0,025 M Veronal Tamponu (pH= 8.2)	1000	1000
0,04'lük Brom –Timol Mavisi	100	100
Saf Su	600	500
Enzim Çözeltisi	-	100
Substrat (Doymun CO ₂ çözeltisi)	2500	2500
Toplam Hacim	4200	4200

Daha sonra bir kronometre ile CO₂ çözeltisi konulduğu andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH= 6,3) için geçen süre belirlendi (t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t_0). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,0 mL). Bu yöntemde göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Yani;

$$EU = (t_0 - t_c) / t_c$$

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

3.4.2.2 Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin CA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitro fenil asetatı, 348 nm’de absorbans veren p-nitro fenol veya p-nitro fenolat’a hidroliz etmektedir.



348 nm’de p-nitro fenol ve p-nitro fenolat’ın her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir. Bu dalga boylarındaki p-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvartz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından 3 dakika sonra 25°C’de 348 nm’de absorbansı okundu. Çizelge 3.2’de kullanılan maddeler belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Esteraz aktivitesinde kullanılan maddeler.

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (μL)	Numune Tüpü (μL)
1 M Tris – SO_4 Tamponu (pH= 7.4)	1300	1300
p-nitrofenilasetat	1000	1000
Saf Su	700	600
Enzim Çözeltisi	-	100
Toplam Hacim	3000	3000

Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle; 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitro fenil asetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine o miktarda inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitro fenil asetat substrat çözeltisi, taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş eklendi. Bu çözelti 3 mM’lık olup, daha derişğini hazırlamak ester sınırlı

çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi [66]. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı [67].

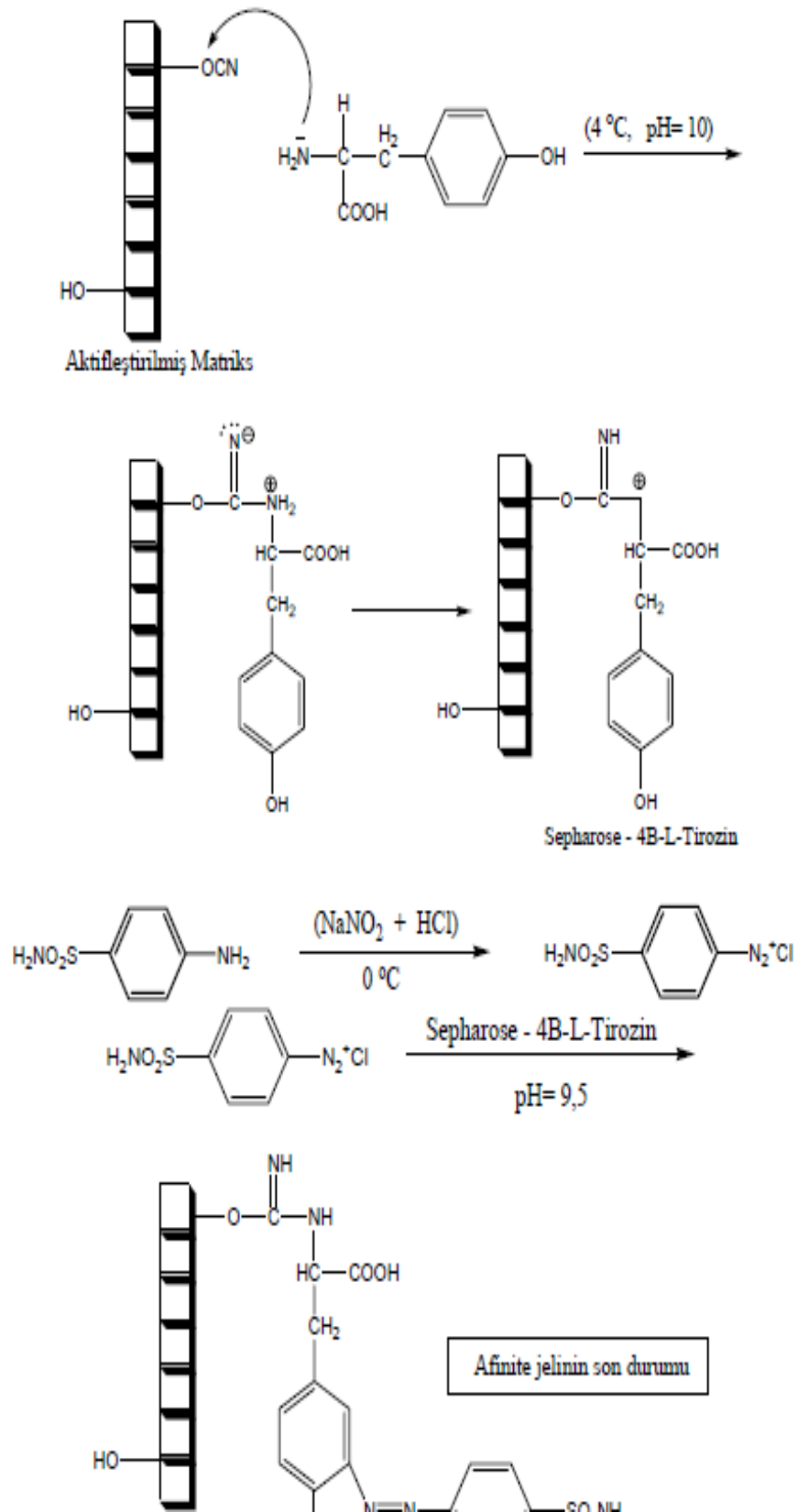
3.4.3 Afinite jelinin hazırlanması

3.4.3.1 Sepharose-4B Matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktiveleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır [67].

Sepharose-4B'nin aktiveleştirilmesi ve tirozin takılması: 20 mL Sepharose-4B, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi ve eşit hacimde destile su ile birleştirildi. Buz banyosu içerisinde karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna, 4 g toz haline getirilmiş CNBr eklendi. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile 11'e çıkarıldı ve reaksiyon boyunca bu pH değişmeyinceye kadar devam edildi. Karışım buchner hunisine aktararak süzüldü. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile yıkandı ve bir behere alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 4°C'de 2 saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat bu sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel yıkama suyu 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin, tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisine alındı [67, 68].

Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 25 mg-sülfanilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine 10 dakikada damla damla katıldı. Diazolanmış bulunan sülfanilamid, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabit tutuldu. 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi [68]. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 3.1 Afinite Jelinin Hazırlanması.

3.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

3.4.4.1 Hemolizat eldesi

Kullanılacak kan, antikoagülanlı kan torbalarına alındıktan sonra 4 °C’de muhafaza edildi ve en çok 2 gün içerisinde kullanıldı. Eritrositleri ayırmak için kan 10 ml’lik tüplere konuldu ve 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrıldı. Sonra altta kalan eritrositler %0,9 luk NaCl çözeltisi ile birkaç defa yıkanıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositlerin hacimlerinin 1,5 misli 0 °C’deki saf su ile hemoliz edildi. Hemoliz edilen eritrositler bir araya toplanarak hemolizin tam gerçekleşmesi için yarım saat süreyle karıştırıldı. Hücre zarlarının ayrılması için hemolizat 4 °C’de 20.000 rpm’de yarım saat süreyle santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin dibine çöken hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatlice alındı. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH’sı katı Tris ile 8,7’ye getirildi. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi.

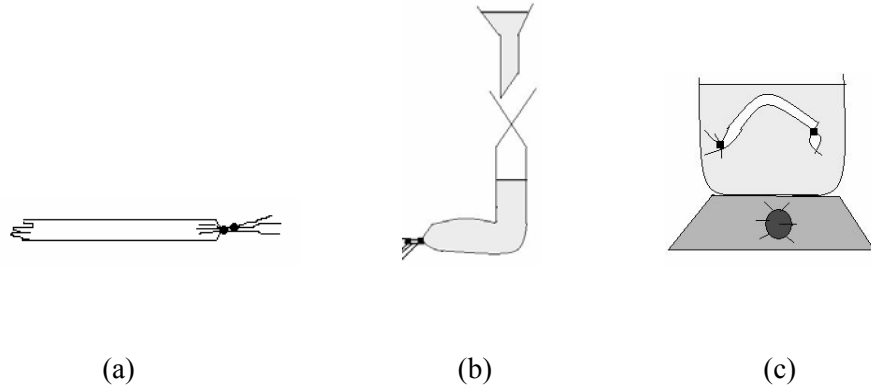
3.4.4.2 Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

İşlemlerden geçen hemolizat kolona tatbik edilir. Tatbik işlemi bittikten sonra yıkama tamponu ilave edilir. Yıkama işlemi kanın kırmızı rengi kolondan tamamen gidinceye kadar ve yıkama tamponuna karşı 280 nm de 0,05 değerine ulaşıncaya kadar devam edilir. Bu değere ulaşıldığında sırasıyla hCA-I ve hCA-II enzimlerinin elüsyon çözeltileri kolondan geçirilir. Elüsyon her tüp için 5 ml şeklindedir. Elüsyondan alınan her tüpün 280 nm de absorbansına bakılır. Elüsyondan alınan tüplerin absorbansı belli bir yükselme ve düşme gerçekleştikten sonra elüsyon bitirilir ve elde edilen enzimlere diyaliz işlemi uygulanır.

3.4.4.3 Diyaliz işlemi

Biyolojik moleküllerin ayrımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir. Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları genellikle molekül ağırlığı 10.000’den daha fazla olan makro moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantrasyona bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Dengeye ise çalışılan hacime bağlı olarak, genellikle 4-6 saatte ulaşılır.

Dengeye ulaşıldıktan sonra, dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Böylece, istenilen ayırım tamamlanıncaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir [69].



Şekil 3.2 Diyaliz işleminin uygulanması

a) diyaliz torbasının hazırlanması b) enzim çözeltisinin konulması c) diyalize bırakılma

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (sellofan, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. Diyaliz yöntemi, iyonik olan ve olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek veya konsantre etmek için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür. Çalışmamızda elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına doldurulmuş ve 4 °C'da diyaliz tamponu kullanılarak diyaliz işlemi yapılmıştır. 24 saat boyunca işleme devam edilmiş ve her 8 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilmiştir. Diyaliz işlemleri sonucu elde edilen enzim artık kısmen saf hale getirilmiştir. Elde edilen bu enzim çözeltisi, yapacağımız diğer işlemlerde kullanılmak üzere 3'er mililitrelik tüplere konmuş ve -20 °C'da derin dondurucuda depolanmıştır [69].

3.5 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

3.5.1 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimi için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

3.5.2 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik-çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde beş farklı inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Bütün esteraz aktivitesi deneylerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 3 mM, aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3 mL olduğundan ve 1 mL substrat çözeltisi kullanıldığından; ortamdaki substrat konsantrasyonu 1 mM'dır. Aktivite birimi şöyle hesaplandı: 348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti (ϵ) $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. p-Nitrofenil asetatın ise $0.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbans değerinin 5'e bölümü ile ortamdaki p-nitrofenol (p-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir [70].

$$\text{p-Nitrofenol konsantrasyonu} = A (\text{O. D}) / 5 \times 10^3 \text{ M}$$

$$\text{p-Nitrofenol konsantrasyonu} = A (\text{O. D}) / 5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre; 1 dakikada oluşan p-nitrofenol miktarını bulmak için 3'e bölünür. Toplam hacim 3 mL olduğundan miktar aşağıdaki gibi bulunur.

$$\text{p-Nitrofenol miktar} = \frac{A(OD)/5}{3} \times 3 = A(OD)/5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)}$$

3.5.3 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkilerinin K_i sabitleriyle bulunması

K_i değerlerini bulmak için; insan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Esteraz aktivitesi için yukarda belirtildiği gibi;

$$\text{p-Nitrofenol miktar} = \frac{A(OD)/5}{3} \times 3 = A(OD)/5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)}$$

değeri, V (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver Burk grafiklerini çizmek için bu değerler $1/V$ değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonları [S], grafikte kullanmak için $1/[S]$ değerlerine dönüştürüldü. Bu-değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün, insan eritrosit CA enzimi için ayrı ayrı Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden, K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Bu değerler yarışmasız inhibitrler için kullanılan eşitlikte yerine konularak K_i değerleri hesaplandı.

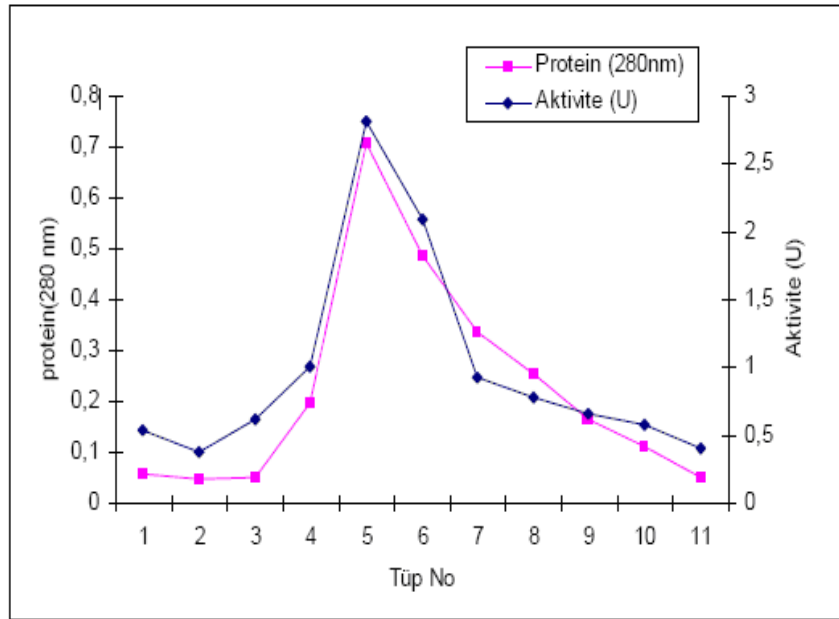
$$V_{max}^i = \frac{V_{max}}{1 + [I] / K_i}$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

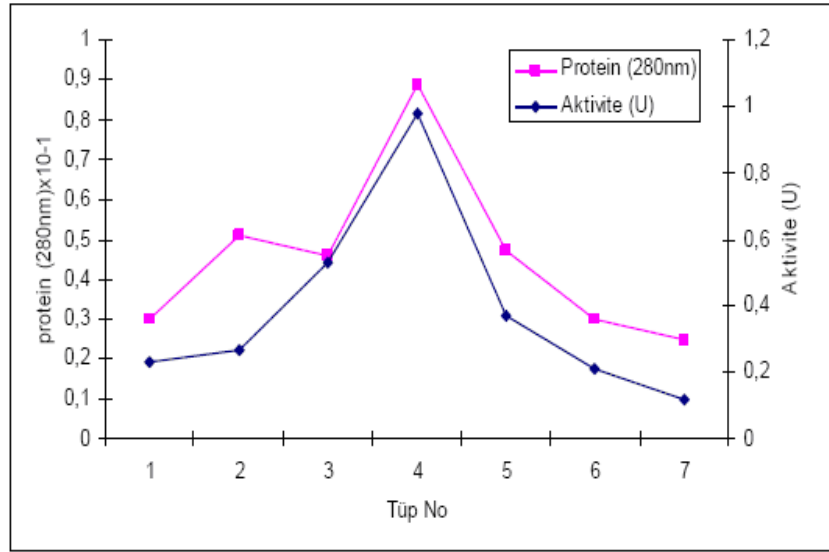
4.1 Afinite Kromatografisi ile hCA I ve hCA II İzoenzimlerin Saflaştırılması

HCA I izoenziminin elüsyonu için; 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6), 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), CA II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 7mL /saat olarak ayarlanmıştır.

Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı belirlendi. 280 nm'de en yüksek absorbans ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi (Şekil 4.1.a ve 4.1.b).



Şekil 4.1a HCA I enziminin elüsyon grafiği.



Şekil 4.1b HCA II enziminin elüsyon grafiği.

İnsan kanından saflaştırılan CA enzimi için coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Enzimlerin aktivite ölçümü 1 mM substrat konsantrasyonunda ve 100 µL enzim çözeltisi ile yapılmıştır. Protein tayinleri ise, 100 µL enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Hemolizatlarda ise aktivite ve protein miktarı ölçümünde; her bir hemolizattan 1 mL alınıp, 10 mL'ye seyreltilmiş ve bundan 100 µL alınarak ölçümler yapılmıştır.

İnsan kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 135 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 2200 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 2200/135 = 16,29$$

olarak bulundu.

CA I ve CA II için coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi deneyleri yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltileri için mL'deki protein miktarı CA I için 0,54 mg ve mL'deki hidrataz aktivitesi 265 EU olarak bulundu. Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 100 kat seyreltme yapıldığından aktivitesi CA I için 26500 EU/mL olarak bulundu. CA II için mL'deki protein miktarı 0,35 mg ve mL'deki enzim ünitesi 243 EU olarak bulundu. 100 kat seyreltme ile hesaplamaya katıldığında CA II için 24300 EU/ml olarak bulunur. Buna göre;

CA I için spesifik aktivite (SA) = $26500/0,54 = 49074$

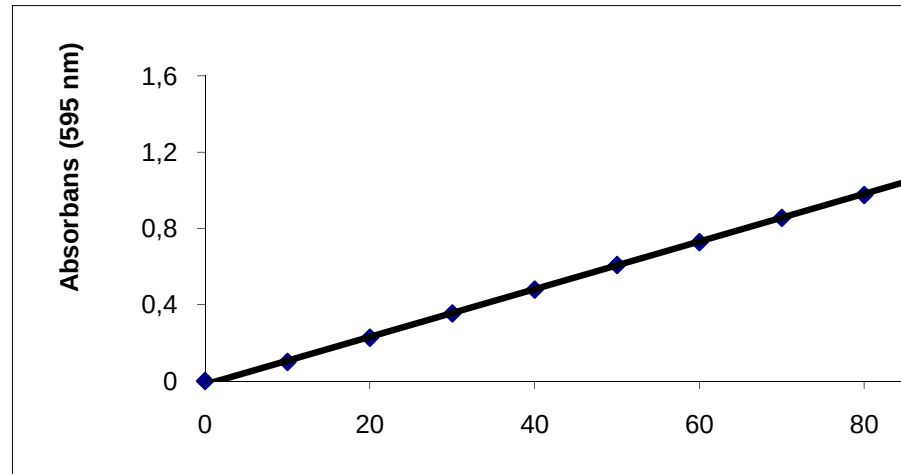
CA II için spesifik aktivite (SA)= $24300/0,35 = 69428$

Bu değerlere göre, hemolizatin doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

CA I enzimi, $49074/16,29 = 3012$ kat saflaştırılmış oldu.

CA II enzimi, $69428/16,29 = 4262$ kat saflaştırılmış oldu.

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem için önce standart bir eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Daha önceden çalışılarak hazırlanan standart grafiğinden; standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerlerinden faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Bradford yöntemi kullanılarak hazırlanan standart grafik.

4.2 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi

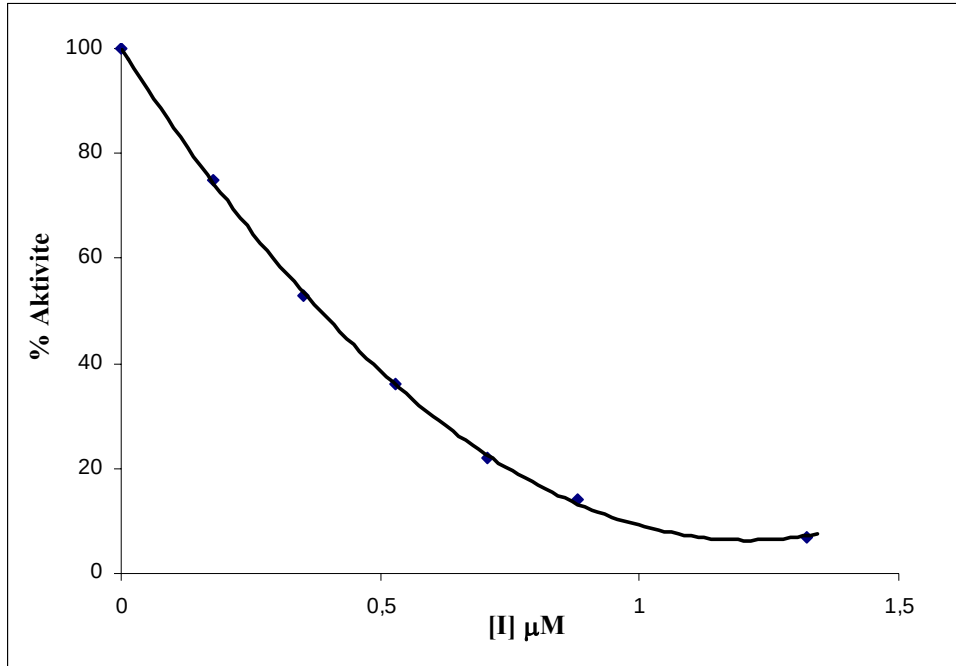
4.2.1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glökom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle

araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4.2 mL).

Çizelge 4.1 İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.

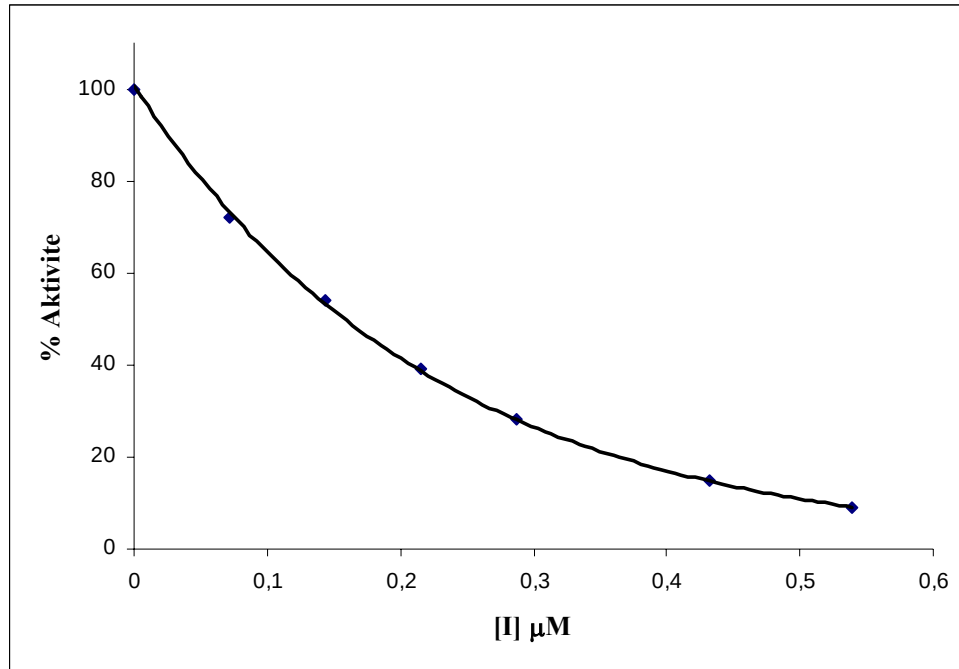
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μl)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (μM)
HSBA	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	20	480	2,5	76	0.1763
	1	100	100	40	460	2,5	55	0.3526
	1	100	100	60	440	2,5	38	0.5289
	1	100	100	80	420	2,5	24	0.7052
	1	100	100	100	400	2,5	15	0.8815
	1	100	100	150	350	2,5	9	1,3223



Şekil 4.3 İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.2 İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.

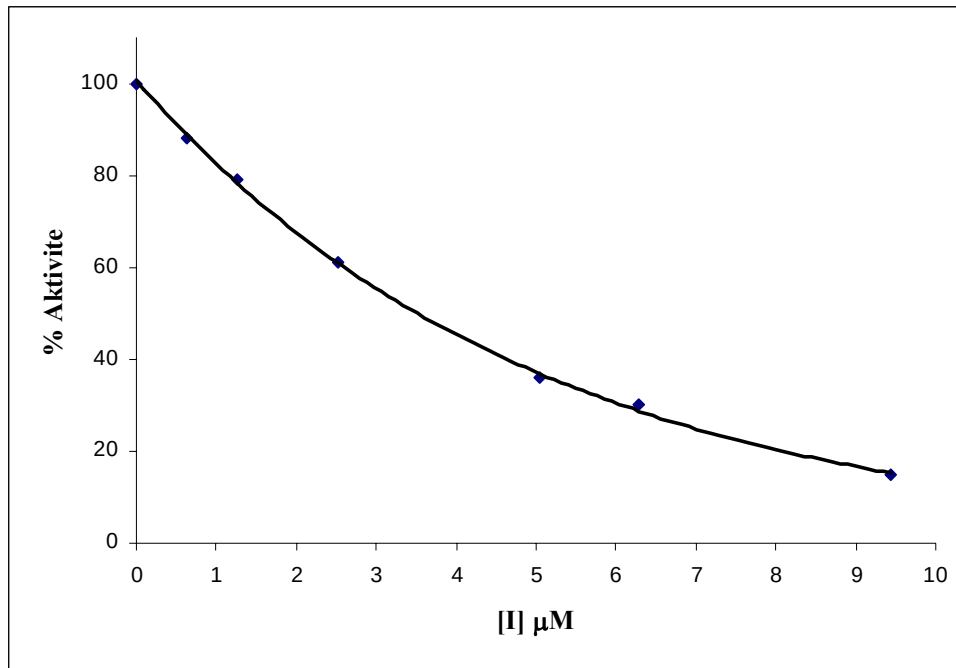
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μl)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] μM
1	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	20	480	2,5	72	0,071
	1	100	100	50	450	2,5	54	0,143
	1	100	100	100	400	2,5	39	0,215
	1	100	100	200	300	2,5	28	0,287
	1	100	100	300	200	2,5	15	0,431
	1	100	100	400	100	2,5	9	0,539



Şekil 4.4 İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.3 İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.

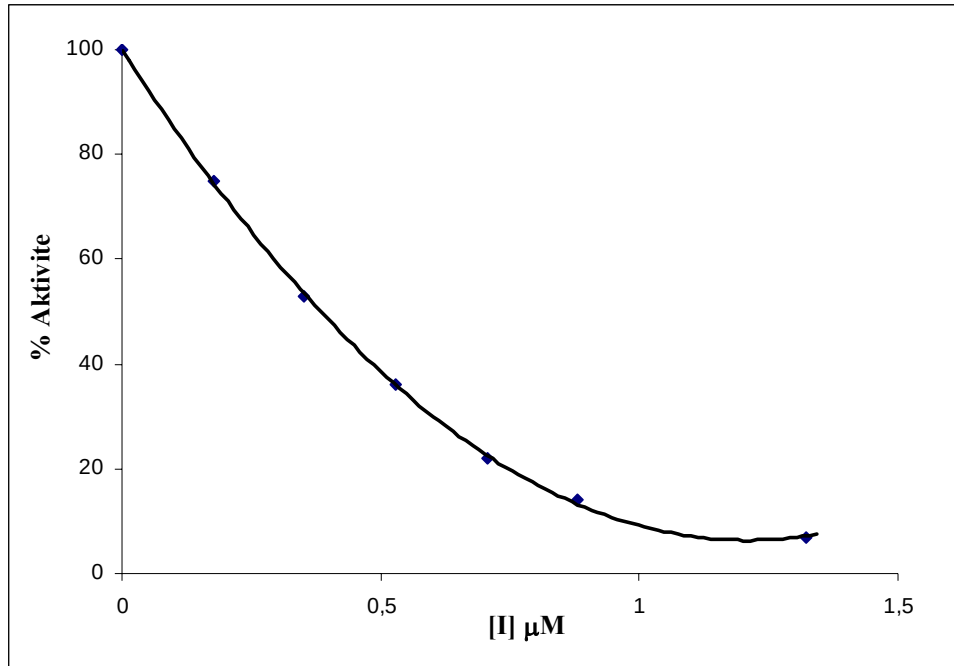
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (μM)
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	88	0.629
	1	100	100	20	470	2,5	78	1.258
	1	100	100	40	460	2,5	63	2.517
	1	100	100	80	420	2,5	38	5.035
	1	100	100	100	400	2,5	30	6.294
	1	100	100	150	350	2,5	15	9.442



Şekil 4.5 İnsan eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.4 İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin in vitro sonuçları.

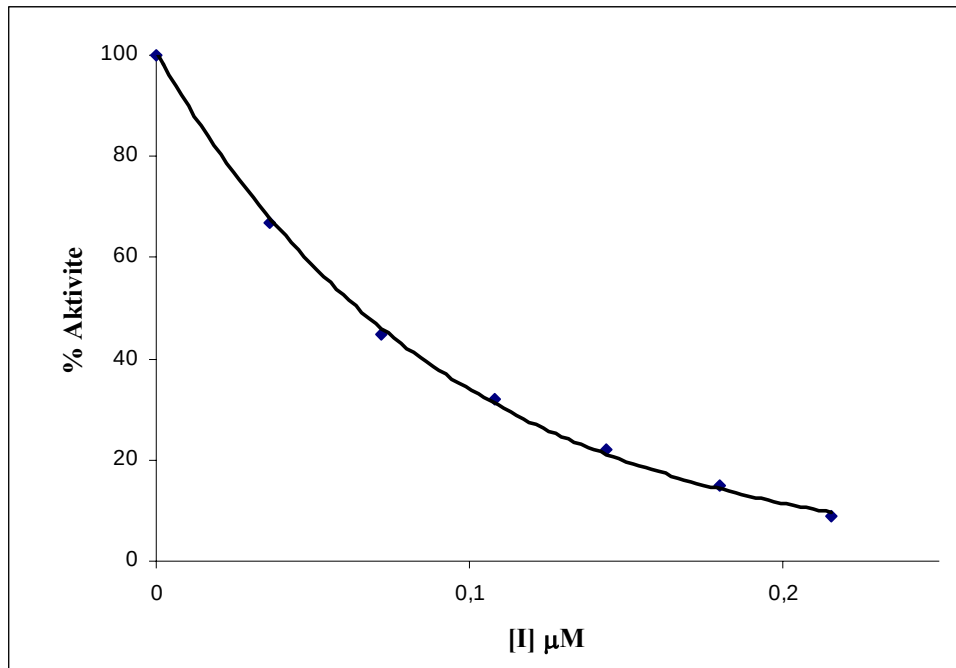
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (μM)
HSBA	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	20	480	2,5	75	0.1763
	1	100	100	40	460	2,5	53	0.3526
	1	100	100	60	440	2,5	36	0.5289
	1	100	100	80	420	2,5	22	0.7052
	1	100	100	100	400	2,5	14	0.8815
	1	100	100	150	350	2.5	7	1.3223



Şekil 4.6 İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (HSBA) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.5 İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.

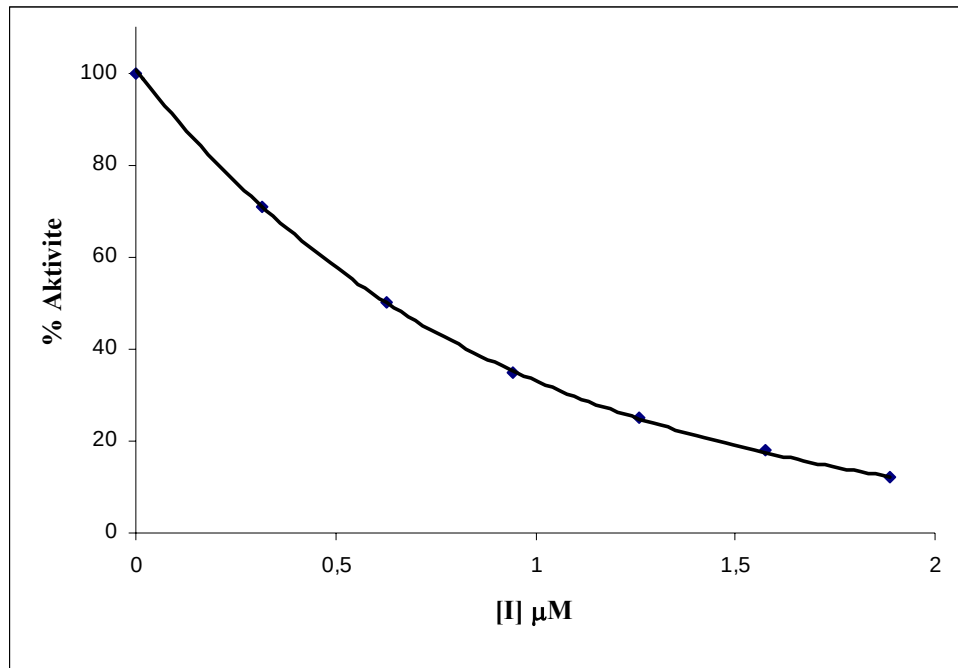
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μl)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (μM)
1	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	67	0.0359
	1	100	100	10	490	2,5	45	0.0719
	1	100	100	15	485	2,5	32	0.1078
	1	100	100	20	480	2,5	22	0.1438
	1	100	100	25	475	2,5	15	0.1798
	1	100	100	30	470	2,5	9	0.2157



Şekil 4.7 İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.6 İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkilerini sonuçları.

İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol Mavisi (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	5	495	2,5	71	0.3147
	1	100	100	10	490	2,5	50	0.6294
	1	100	100	15	475	2,5	35	0.9442
	1	100	100	20	480	2,5	25	1.258
	1	100	100	25	475	2,5	18	1.573
	1	100	100	30	470	2.5	12	1.888



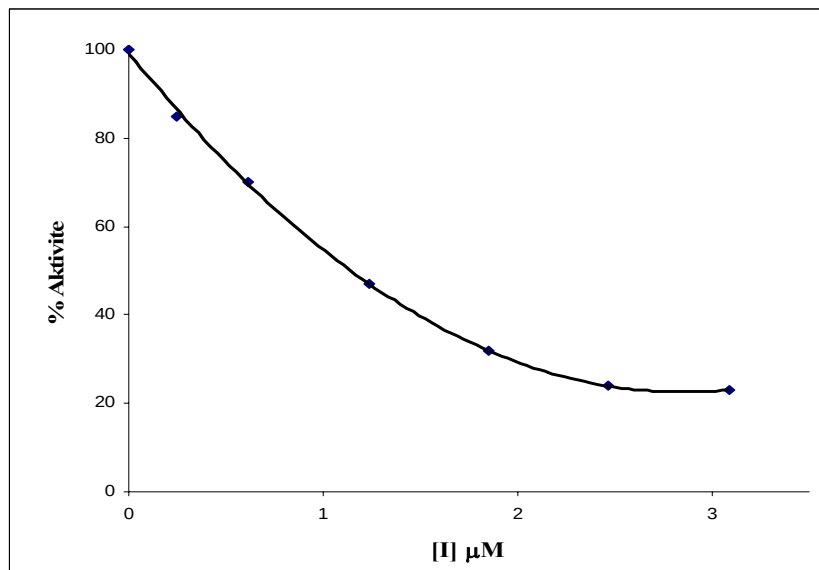
Şekil 4.8 İnsan eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.

4.2.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi

CA I ve CA II'nin esteraz aktivitesi üzerinde HSBA, 1, 2 bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir.

Çizelge 4.7 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (**HSBA**) bileşiklerinin *in vitro* inhibisyon sonuçları.

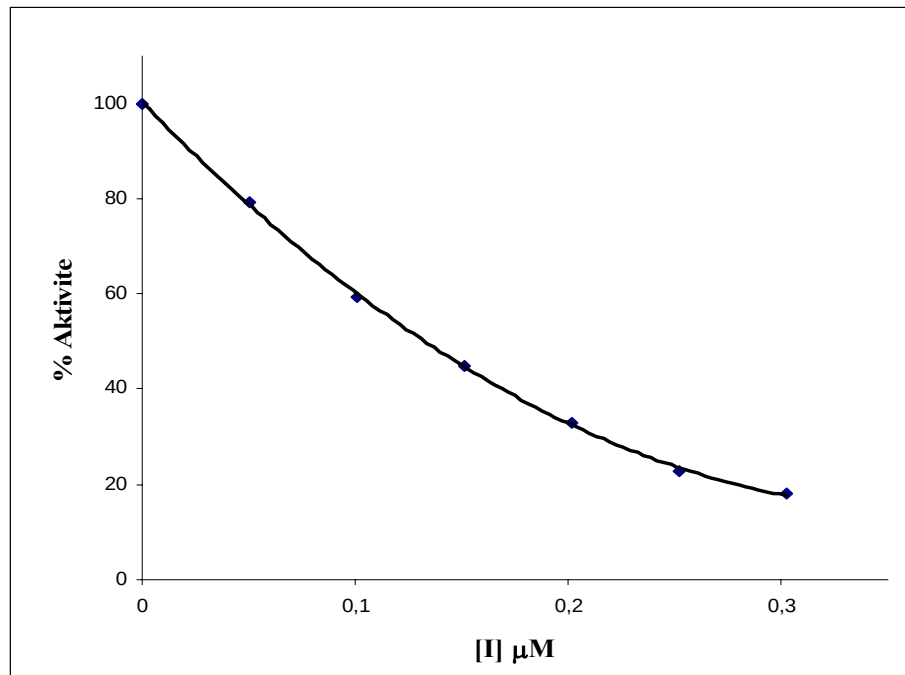
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
HSBA	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	20	580	85	0.2469
	1	1,3	0,1	50	550	70	0.6172
	1	1,3	0,1	100	500	47	1.2345
	1	1,3	0,1	150	450	32	1.8518
	1	1,3	0,1	200	400	24	2.4691
	1	1,3	0,1	250	350	23	3.0864



Şekil 4.9 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (**HSBA**) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.8 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.

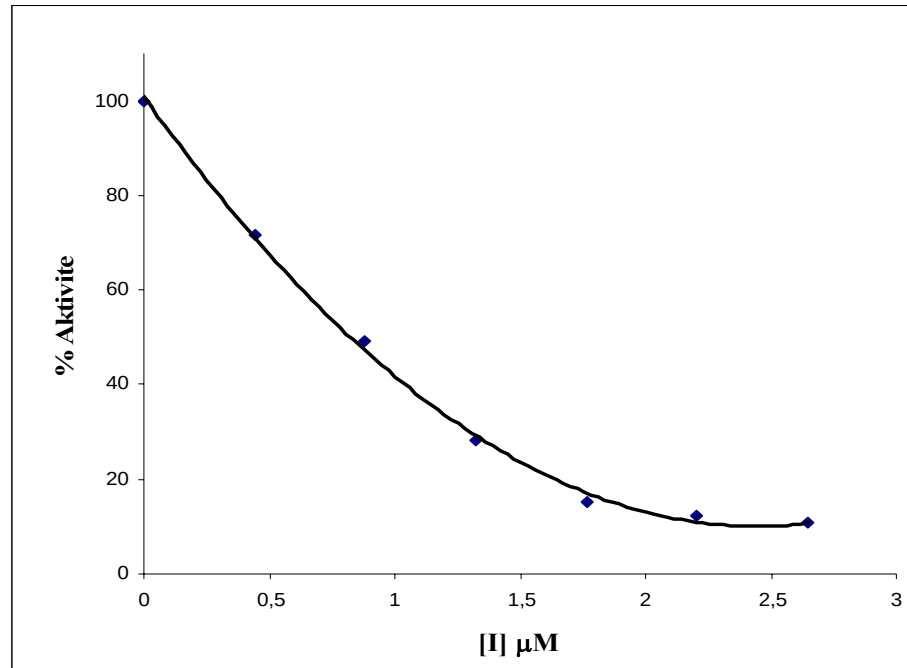
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
1	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	79.11	0.0503
	1	1,3	0,1	10	590	59.42	0.1007
	1	1,3	0,1	15	585	45	0.1510
	1	1,3	0,1	20	580	31	0.2014
	1	1,3	0,1	25	575	20.8	0.2517
	1	1,3	0,1	30	570	18	0.3021



Şekil 4.10 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.9 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon sonuçları.

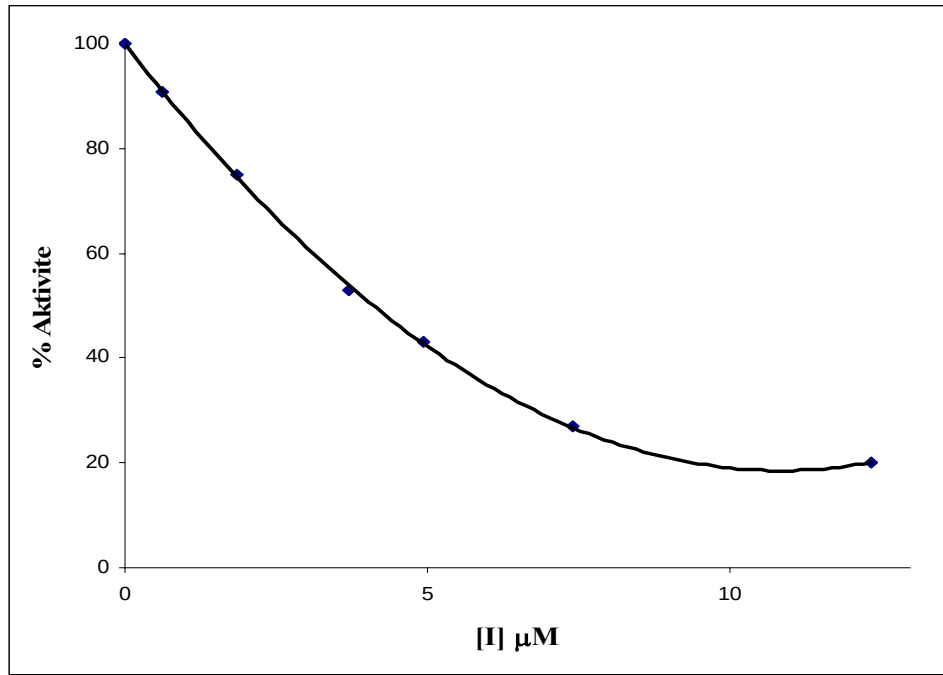
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
2	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	71.71	0.4409
	1	1,3	0,1	10	590	49.19	0.8818
	1	1,3	0,1	15	585	28.15	1.3227
	1	1,3	0,1	20	580	15.25	1.7636
	1	1,3	0,1	25	575	12.28	2.2045
	1	1,3	0,1	30	570	10.69	2.6455



Şekil 4.11 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.10 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (**HSBA**) bileşiklerinin in vitro inhibisyon sonuçları.

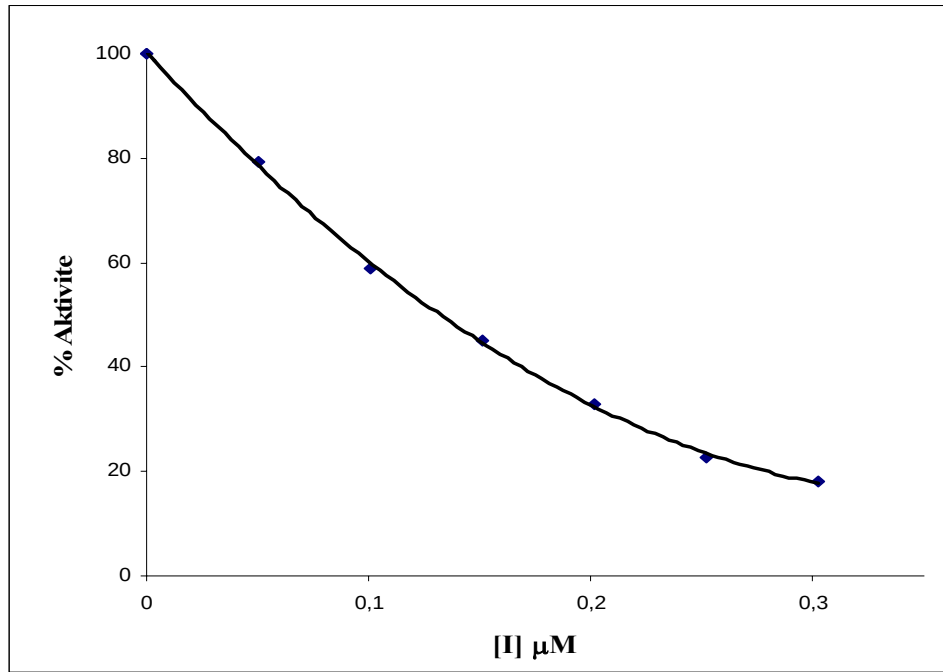
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
HSBA	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	90	0.6172
	1	1,3	0,1	15	585	75	1.8518
	1	1,3	0,1	30	570	53	3.7037
	1	1,3	0,1	40	560	43	4.9382
	1	1,3	0,1	60	530	27	7.4074
	1	1,3	0,1	100	500	20	12.345



Şekil 4.12 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (**HSBA**) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.11 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiklerinin in vitro inhibisyon sonuçları.

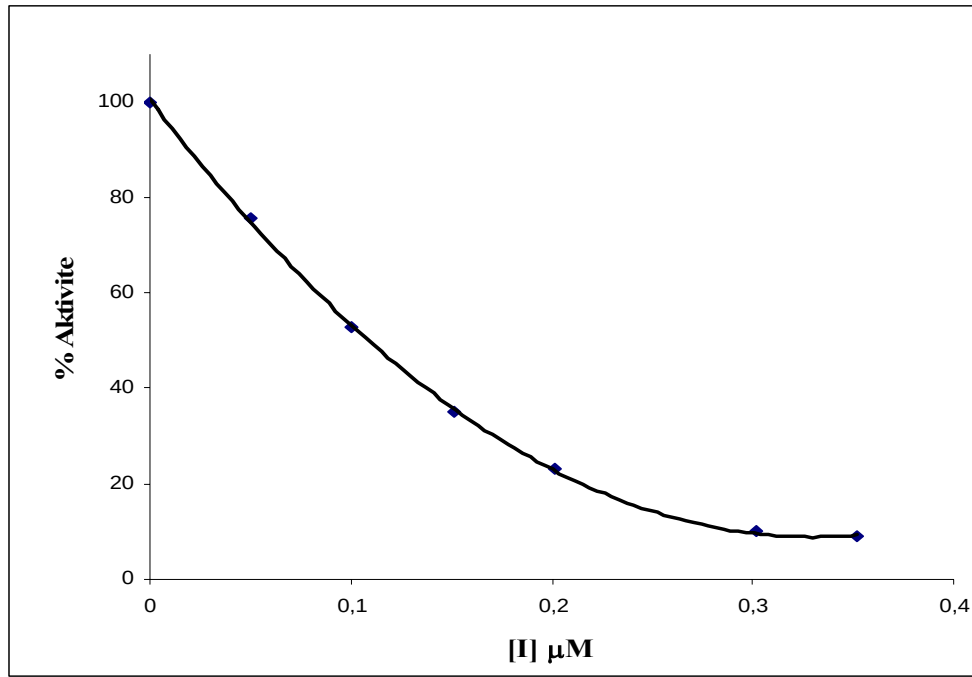
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (μL)	Destile su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
1	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	79.113	0.0503
	1	1,3	0,1	10	58	59	0.1007
	1	1,3	0,1	15	585	45	0.1510
	1	1,3	0,1	20	580	33	0.2014
	1	1,3	0,1	25	575	22.8	0.2517
	1	1,3	0,1	30	570	18	0.3021



Şekil 4.13 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 4.12 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiklerinin in vitro inhibisyon sonuçları.

İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
2	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	5	595	75.7143	0.0503
	1	1,3	0,1	15	585	53	0.1006
	1	1,3	0,1	30	570	35	0.1509
	1	1,3	0,1	40	560	23	0.2012
	1	1,3	0,1	60	530	10	0.3019
	1	1,3	0,1	100	500	9	0.3522



Şekil 4.14 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.

Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin CO₂ hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 'teki grafiklerden hesaplanan I₅₀ değerleri toplu olarak Çizelge 4.13 verilmiştir.

Çizelge 4.13 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro CO₂-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.

I₅₀ (μM)		
<u>Inhibitör</u>	<u>HCA I</u>	<u>HCA II</u>
En	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Amp	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Hsba	0.45	0.40
1	0.15	0.06
2	0.32	0.15

Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 4. 10, 4. 11, 4. 12, 4. 13, 4. 14, 4. 15'teki grafiklerden hesaplanan I₅₀ değerleri toplu olarak Çizelge 4. 14 verilmiştir.

Çizelge 4.14 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.

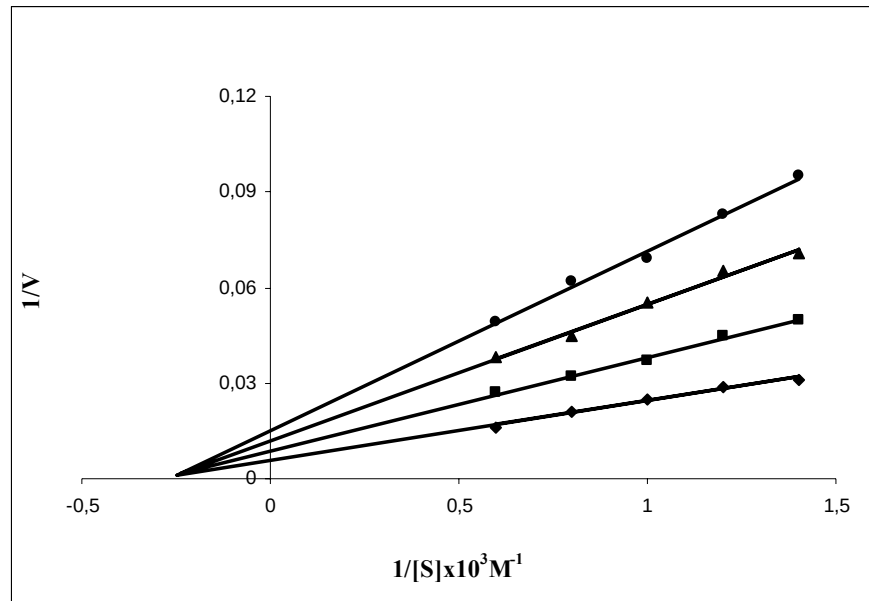
I₅₀ (μM)		
<u>Inhibitör</u>	<u>HCA I</u>	<u>HCA II</u>
En	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Amp	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Hsba	3.2	18.0
1	0.13	0.14
2	0.8	0.1

4.3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K_i Sabitlerinin Bulunması

İnhibitör çalışmaları için sentezlenen sülfonamid bileşikler olan HSBA, 1, 2 bileşikler kullanıldı. Bunun için inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla 3. 5. 2 ve 3. 5. 3 bölümlerinde anlatıldığı şekilde hazırlanan 3 mM'lık p-nitrofenilasetat çözeltisinden istenilen konsantrasyonu sağlayacak şekilde tüplere 5 farklı miktarda ilave edildi. Bütün tüplerin toplam hacmi 1,9 mL olacak şekilde saf su veya inhibitör çözeltisi eklendi. Daha sonra her tüpe 1 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) ve 0.1 mL enzim ilave edilip, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 348 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü. Kullanılan çözelti miktarları ve buna karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları çizelgede verilmektedir. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda değişik substrat konsantrasyonlarında 348 nm'de ölçülen absorbans değerleri, kullanılan aktivite birimi (reaksiyon hızı) $\mu\text{mol/dakika}$ cinsinden bölüm 3. 5. 2'de belirtildiği şekilde bulundu. Bütün inhibitörler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; $1/V-I/S$ değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı.

Çizelge 4.15 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (HSBA) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K_i sonuçları.

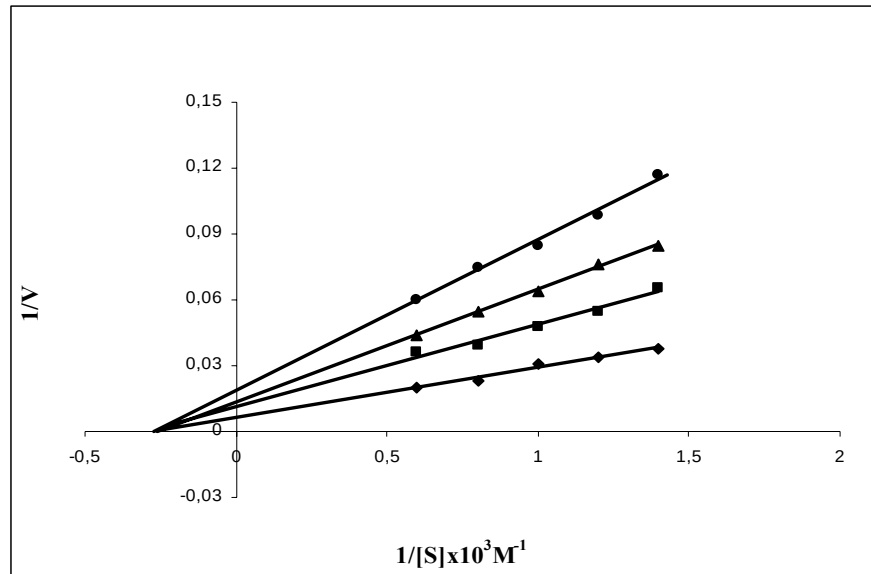
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (μL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/da k.) ⁻¹
HSBA	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,028
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,025
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,016
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,016
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,011
	0,6	1,3	0,1	20	0,98	1,66	0,035
	0,8	1,3	0,1	20	0,78	1,25	0,025
	1,0	1,3	0,1	20	0,58	1,0	0,020
	1,2	1,3	0,1	20	0,38	0,8	0,017
	1,4	1,3	0,1	20	0,18	0,7	0,016
	0,6	1,3	0,1	50	0,95	1,66	0,045
	0,8	1,3	0,1	50	0,75	1,25	0,032
	1,0	1,3	0,1	50	0,55	1,0	0,037
	1,2	1,3	0,1	50	0,35	0,8	0,018
	1,4	1,3	0,1	50	0,15	0,7	0,022
	0,6	1,3	0,1	200	0,80	1,66	0,87
	0,8	1,3	0,1	200	0,60	1,25	0,062
	1,0	1,3	0,1	200	0,40	1,0	0,052
	1,2	1,3	0,1	200	-	0,8	0,038
	1,4	1,3	0,1	200	-	0,7	0,034



Şekil 4.15 İnsan eritrosit CA I enzimi üzerinde (HSBA) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.16 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K_i sonuçları.

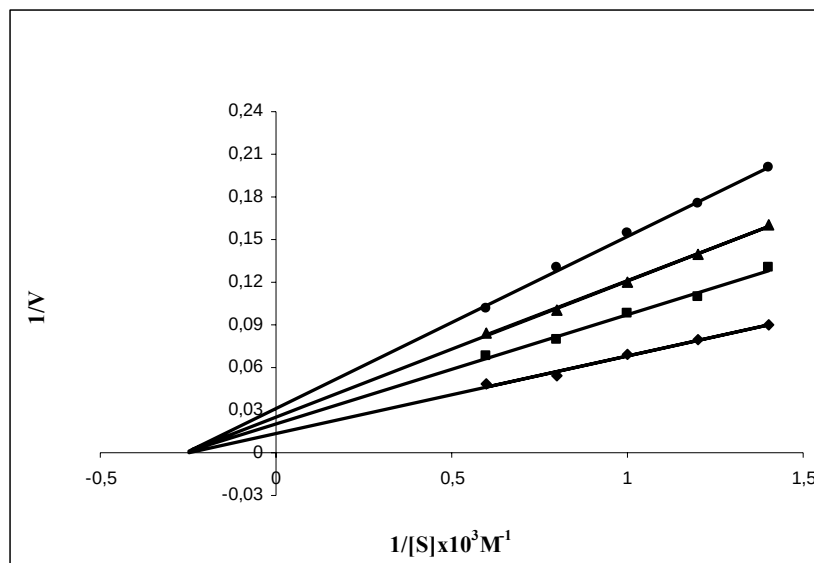
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (μL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
1	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,041
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,033
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,026
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,023
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,020
	0,6	1,3	0,1	5	0,995	1,66	0,046
	0,8	1,3	0,1	5	0,795	1,25	0,039
	1,0	1,3	0,1	5	0,595	1,0	0,031
	1,2	1,3	0,1	5	0,395	0,8	0,026
	1,4	1,3	0,1	5	0,195	0,7	0,023
	0,6	1,3	0,1	20	0,98	1,66	0,056
	0,8	1,3	0,1	20	0,78	1,25	0,043
	1,0	1,3	0,1	20	0,58	1,0	0,038
	1,2	1,3	0,1	20	0,38	0,8	0,032
	1,4	1,3	0,1	20	0,18	0,7	0,029
	0,6	1,3	0,1	30	0,97	1,66	0,089
	0,8	1,3	0,1	30	0,77	1,25	0,058
	1,0	1,3	0,1	30	0,57	1,0	0,050
	1,2	1,3	0,1	30	0,37	0,8	0,043
	1,4	1,3	0,1	30	0,17	0,7	0,035



Şekil 4.16 İnsan eritrosit CA I enzimi üzerinde **(1)** bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.17 İnsan eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (2) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K_i sonuçları.

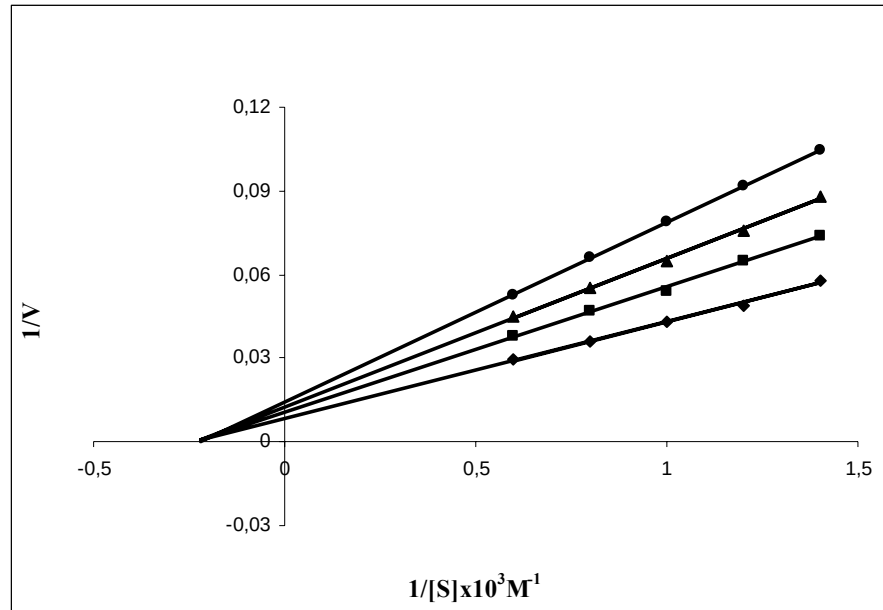
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (μL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
2	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,076
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,065
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,056
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,052
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,032
	0,6	1,3	0,1	5	0,995	1,66	0,113
	0,8	1,3	0,1	5	0,795	1,25	0,090
	1,0	1,3	0,1	5	0,595	1,0	0,074
	1,2	1,3	0,1	5	0,395	0,8	0,056
	1,4	1,3	0,1	5	0,195	0,7	0,045
	0,6	1,3	0,1	10	0,99	1,66	0,205
	0,8	1,3	0,1	10	0,79	1,25	0,116
	1,0	1,3	0,1	10	0,59	1,0	0,092
	1,2	1,3	0,1	10	0,39	0,8	0,081
	1,4	1,3	0,1	10	0,19	0,7	0,057
	0,6	1,3	0,1	15	0,94	1,66	0,416
	0,8	1,3	0,1	15	0,74	1,25	0,208
	1,0	1,3	0,1	15	0,54	1,0	0,151
	1,2	1,3	0,1	15	0,34	0,8	0,125
	1,4	1,3	0,1	15	0,14	0,7	0,067



Şekil 4.17 İnsan eritrosit CA I enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.18 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla (**HSBA**) bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K_i sonuçları.

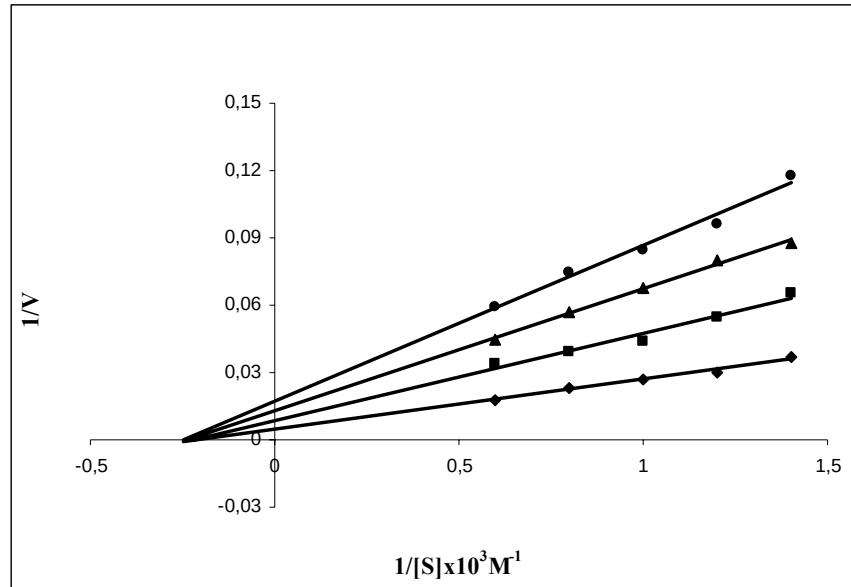
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (μL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
HSBA	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,192
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,151
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,119
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,090
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,071
	0,6	1,3	0,1	5	0,995	1,66	0,238
	0,8	1,3	0,1	5	0,795	1,25	0,217
	1,0	1,3	0,1	5	0,595	1,0	0,178
	1,2	1,3	0,1	5	0,395	0,8	0,131
	1,4	1,3	0,1	5	0,195	0,7	0,102
	0,6	1,3	0,1	30	0,97	1,66	0,384
	0,8	1,3	0,1	30	0,77	1,25	0,312
	1,0	1,3	0,1	30	0,57	1,0	0,238
	1,2	1,3	0,1	30	0,37	0,8	0,185
	1,4	1,3	0,1	30	0,17	0,7	0,142
	0,6	1,3	0,1	100	0,90	1,66	0,625
	0,8	1,3	0,1	100	0,70	1,25	0,500
	1,0	1,3	0,1	100	0,50	1,0	0,416
	1,2	1,3	0,1	100	0,30	0,8	0,312
	1,4	1,3	0,1	100	0,10	0,7	0,250



Şekil 4.18 İnsan eritrosit CA II enzimi üzerinde (**HSBA**) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.19 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla **(1)** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K_i sonuçları.

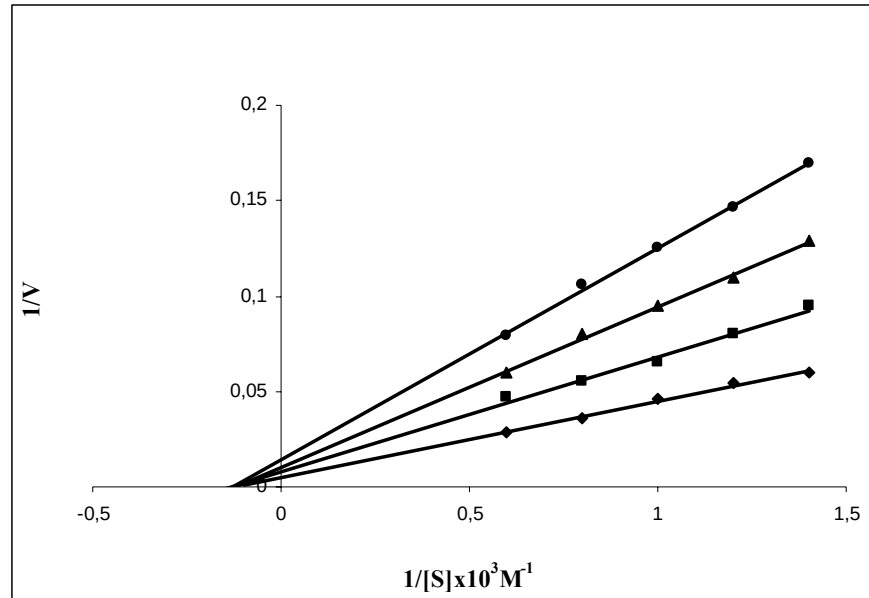
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (μL)	Destile su (ml)	1/[S] 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
1	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,048
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,023
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,022
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,018
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,014
	0,6	1,3	0,1	5	0,995	1,66	0,147
	0,8	1,3	0,1	5	0,795	1,25	0,106
	1,0	1,3	0,1	5	0,595	1,0	0,062
	1,2	1,3	0,1	5	0,395	0,8	0,053
	1,4	1,3	0,1	5	0,195	0,7	0,050
	0,6	1,3	0,1	20	0,98	1,66	0,172
	0,8	1,3	0,1	20	0,78	1,25	0,113
	1,0	1,3	0,1	20	0,58	1,0	0,075
	1,2	1,3	0,1	20	0,38	0,8	0,066
	1,4	1,3	0,1	20	0,18	0,7	0,058
	0,6	1,3	0,1	30	0,97	1,66	0,263
	0,8	1,3	0,1	30	0,77	1,25	0,166
	1,0	1,3	0,1	30	0,57	1,0	0,106
	1,2	1,3	0,1	30	0,37	0,8	0,098
	1,4	1,3	0,1	30	0,17	0,7	0,075



Şekil 4.19 İnsan eritrosit CA II enzimi üzerinde **(1)** bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.20 İnsan eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla **(2)** bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K_i sonuçları.

İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (μL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
2	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,048
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,023
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,022
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,018
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,014
	0,6	1,3	0,1	5	0,995	1,66	0,087
	0,8	1,3	0,1	5	0,795	1,25	0,064
	1,0	1,3	0,1	5	0,595	1,0	0,055
	1,2	1,3	0,1	5	0,395	0,8	0,047
	1,4	1,3	0,1	5	0,195	0,7	0,043
	0,6	1,3	0,1	10	0,99	1,66	0,108
	0,8	1,3	0,1	10	0,79	1,25	0,093
	1,0	1,3	0,1	10	0,59	1,0	0,076
	1,2	1,3	0,1	10	0,39	0,8	0,058
	1,4	1,3	0,1	10	0,19	0,7	0,054
	0,6	1,3	0,1	15	0,94	1,66	0,138
	0,8	1,3	0,1	15	0,74	1,25	0,115
	1,0	1,3	0,1	15	0,54	1,0	0,09
	1,2	1,3	0,1	15	0,34	0,8	0,080
	1,4	1,3	0,1	15	0,14	0,7	0,065



Şekil 4.20 İnsan eritrosit CA II enzimi üzerinde **(2)** bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.21 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CAI ve CAII enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon sonuçları.

I₅₀ (μM)		
<u>Inhibitör</u>	<u>HCA I</u>	<u>HCA II</u>
En	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Amp	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Hsba	7.7	23
1	0.137	0.157
2	0.99	0.075

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidroliyz, E.C.4.2.1.1) canlı organizmalarda pH düzenleyici, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi gibi önemli fonksiyonları olan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran yaygın bir metalloenzim ailesidir. Bu enzim fizyolojik şartlarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemektedir [32, 71, 72, 73]. CA, hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde fonksiyon gören önemli bir enzimdir [74, 75, 76].

Karbonik anhidraz'ın (CA) canlı metabolizmasında hidrataz aktivitesinin yanı sıra; böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi gibi dokularda H^+ ve HCO_3^- birikiminde rol almaktadır. Bunlardan başka önemli miktarda tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır [77].

Lasamid (2,4-diklor-5-sülfamoil benzoik asit) furosemidin (4-klor-N-furfuril-5-sülfamoilantranilik asit) üretiminde kullanılan bir kimyasal maddedir. Lasamidler aktif ilaç katkı maddeleridir yani kullanıma hazır etkin maddeler sınıfındadırlar. Lasamidler, hem diüretik (antihipertansif) hem de antiviral ilaçların aktif farmakolojik içeriğini oluştururlar

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen HSBA, 1, 2 no'lu karbonik anhidraz inhibitörlerinin insan karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Aktivite belirlenmesinde iki yöntem kullanıldı.

i) Hidrataz Aktivitesi: CO_2 'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan ileri gelen pH değişiminin pH-stat yöntemiyle belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır. Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU) enzimsiz olarak meydana gelen CO_2 hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi (t_0-tc/tc) formülüne göre hesaplandı [64]. Bu aktivite tayininde yarışmalı inhibisyon türü gözlenmektedir. Bunun nedeni karbondioksit molekülü direkt Zn^{+2} 'ye bağlı OH grubuna bağlanmaktadır. Sülfonamid inhibitörleri de aynı bölgeye bağlanacağından inhibitörle substrat enzime bağlanma konusunda yarış halindedir.

ii) Esteraz Aktivitesi: Bu yöntem, karbonik anhidrazın ester bağıını koparması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorbsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat’a hidroliz etmektedir. Bu da 348 nm’de absorbans artışından belirlenmektedir.

Klinikte kullanılan tedavide etkili ilaçların birçok yan etkisi olmasından dolayı yeni ilaçlar sentezlenmeye ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışmamızda lasamid maddesinden sentezlenen yeni bileşiklerin hCA üzerinde inhibisyon etkileri çalışılmıştır.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede I_{50} değerleri kullanılmaktadır. İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen HSBA,1,2 no’lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1’lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı.

Sentezlenen HSBA, 1, 2 no’lu bileşiklerin insan eritrosit CA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda çizilen %Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan I_{50} değerleri tekrar Çizelge 5. 1’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.

I_{50} (μM)		
<u>İnhibitör</u>	<u>HCA I</u>	<u>HCA II</u>
En	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Amp	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Hsba	0.45	0,40
1	0.15	0.06
2	0.32	0.15

İnsan eritrosit CA enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde HSBA, 1, 2 no’lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1’lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildi. Daha sonra inhibisyon gösteren bileşikler için; insan kanından saflaştırılan eritrosit CA enzimi için, beş farklı inhibitör

konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı.

İnsan eritrosit CA izoenzimleri için K_i değerlerinin tesbitinde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Bu amaçla üç farklı inhibitör konsantrasyonu için beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapıldı.

Sentezlenen HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerinin CA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi in vitro esteraz aktivite ölçümleri sonucu çizilen %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen I_{50} değerleri tekrar Çizelge 5.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.

I_{50} (μ M)		
<u>İnhibitör</u>	<u>HCA I</u>	<u>HCA II</u>
En	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Amp	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Hsba	3.2	18.0
1	0.13	0.14
2	0.8	0.1

Çalışmalar sonucunda HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerinin CA-II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri (sırasıyla 0.40 μ M, 0.15 μ M, 0.06 μ M) olarak bulunmuştur. CA-I üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri ise (sırasıyla 0.45 μ M, 0.32 μ M, 0.15 μ M) olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit CA-II izoenzimi üzerinde HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilecek inhibitörler olduğunu teyid etmektedir. HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerin CA-II esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri (sırasıyla 18.0 μ M, 0.1 μ M, 0.14 μ M) olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit CA-I üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri ise (sırasıyla 3.2 μ M, 0.8 μ M, 0.13 μ M) olarak bulunmuştur İnsan CA-II izoenzimi üzerinde HSBA, 1, 2 no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilecek inhibitörler olduğunu teyit etmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin Çizelge 4.21'deki sonuçlara göre hCA-II üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, HSBA bileşiği için, K_i = 23 μ M, 1 bileşiği için, K_i = 0.157 μ M ve 2 bileşiği

için, $K_i=0.075\mu\text{M}$ 'dir. hCA-I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde ise, HSBA bileşiği için, $K_i= 7.7\mu\text{M}$, 1 bileşiği için, $K_i= 0.137\mu\text{M}$ ve 2 bileşiği için, $K_i=0.99\mu\text{M}$ 'dir. Öte yandan en ve amp bu izoenzimler üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermemiştir.

Yeni sentezlenen bileşenler, çıkış maddelerine göre daha yüksek potansiyel inhibisyon etkilerine sahiptir. Özellikle çizelge 2.3'te verilen bazı ilaçların inhibisyon etkilerindeki yapısal olarak lasamid benzeyen diklorfenamid inhibisyon değerleri sentezlenen bileşiklerle karşılaştırıldığında yakın oldukları görülmektedir. Bu nedenle, yeni sentezlenen bileşenler glokomun tedavisinde ilaç olarak kullanılabilirler.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Klusackova, P., ve ark., 2007, Occupational asthma and rhinitis in workers from a lasamide production line, Scand J Work Environ Health, 33(1), 74-8 p.
- [2] Latosinska, J. N., ve ark., 2009. Stability and molecular dynamics of solid lasamide (API of diuretic and antiviral drugs) studied by H NMR spectroscopy and DFT methods, Journal of molecular structure, 931, 94-99 p.
- [3] Toussaint, J. 1951, Acta Crystallogr, 4, 71 p.
- [4] Latosinska J. N., ve ark., 2006, Molecular dynamics of solid furosemide (4-chloro-2-furfurylamino-5-sulfamoyl-benzoic acid) studied by NMR and DFT methods, Chemical physics letter, 430, 127-132 p.
- [5] Ohnishi H., ve ark., 1982, Antiviral activity of sodium 5-aminosulfonyl-2,4-dichlorobenzoate, Antimicrob Agents Chemother, 22(2), 250-254.
- [6] Uğurbaş M. E., ve Turaçlı, S. H., 1994, Türkiye Klinikleri J Ophthalmol, 3(2), 136-41.
- [7] Yaman M., ve ark., 2005, Nobel Med, 1(3), 22-26.
- [8] Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M., 2005, Principles of Biochemistry, 3.Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), Palme Yayıncılık.
- [9] Fresht, A., 1999, Structure and mechanism in protein science, W.H. Freeman and Company, New York, ABD.
- [10] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s.
- [11] Gözükara, E., 1997, Enzimler, Biyokimya, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.
- [12] Segel, I.H., 1975, Enzyme Kinetics, Wiley Interscience, New York, ABD.
- [13] Telefoncu, A., 1986, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını (Der) 59, İzmir.
- [14] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. and Supuran, C. T., 2006, Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy, Expert Opin. Ther. Pat, 16, 1627–1664.
- [15] Pastorekova S., ve ark., 1997, Carbonic anhydrase IX, MN/ CA IX: Analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts, Gastroenterology, 112 (2), 398–408.
- [16] Köhler, K., ve ark., 2007. Saccharin inhibits carbonic anhydrases: possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste, Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 46, 7697–7699.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [17] De Simone, G., ve ark., 2006, Carbonic anhydrase inhibitors: Hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX, *J. Med. Chem.*, 49, 5544–5551.
- [18] Pastarekova, S., ve ark., 2004. Carbonic anhydrases: Current state of the art, therapeutic applications and future prospects, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 19, 199–229.
- [19] Kaiser, E.T., and Lo, K.W., 1969, The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4912.
- [20] Jabusch, J.R., and Deutsch, H.F., 1989, Localization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat, *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170.
- [21] Lindskog, S., 1997, Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharma col. Ther.*, 74, 1-20.
- [22] Wistrand, P.J., 1980, Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase, *J. Med. Sci.*, 85, 75.
- [23] Schcer, A., and Dietsch, P., 1984, A 54.000 moleculer weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in *Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase*, *Annals ,New York Acad. Sci.*, 429, 241.
- [24] Armstrong, J., Myers, Mc.D., Verpoorte, J.A., and Edsall, J.T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte Carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.*, 214, 5137.
- [25] Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., 1983, On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III isozymes: Current topics in Biological and Medical Research, *Moleculer Structure and Regulation*, 7, 79.
- [26] Deutsch, H.F., 1987, Carbonic anhydrase, *Int. J. Biochem.*, 19, 100.
- [27] Ryon, U.S., Whitney, P.L., and Ryen, J.W., 1982, Localization of Carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture, *J. Appl. Physiol.*, 53, 914.
- [28] Lin, K.T.D., and Deutsch, H.F., 1974, Human Carbonic anhydrase XII, the complete structure of the C isoenzyme, *J. Biol. Chem.*, 249, 2329.
- [29] Carter, N. D., ve ark., 1981, Testosterone-induced, sulfonamide resistant Carbonic Anhydrase isozyme of rat liver is indistuinguisable from skeletal muscle Carbonic Anhydrase-III, *Febs Lett.*, 128:114-118.
- [30] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2000, Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1, 3, 4 – thiadiazole – 2 sulfonamide derivatives as antitumor agents, *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 867 – 874.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [31] Stams, T., Chen, Y., Bariack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D.W., 1998, Structural analysis of inhibitor binding to human Carbonic Anhydrase II, *Protein Sci.*, 7(12), 2483–2489.
- [32] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [33] Chegwidden W. R., ve ark., 2000. The Carbonic Anhydrase-new horizons. molecular bases of inherited disease (Scriber, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., McGraw-Hill, Inc., New York, 2165-2204.
- [34] Supuran, C. T., Scozzafava, A. and Casini, A., 2003, Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 23, 146–189.
- [35] Thiry, A., ve ark., 2006, Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 566–573.
- [36] Supuran, C. T., 2008, Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Review Drug Discovery*, 7, 168-181.
- [37] Alterio, V., De Simone, G., Monti, S. M., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2007, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4201-4207.
- [38] Arslan, O., 2001, Inhibition of bovine Carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds, *Turk J. Med. Sci.*, 66 (9), 982.
- [39] Maren T. H., ve ark., 1983, the transcorneal permeability of sulfonamide Carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Exp. Eye. Res.*, 36, 457-480.
- [40] Abbate, F., ve ark., 2004, Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 217–223.
- [41] Briganti, F., ve ark., 1996, Novel classes of Carbonic anhydrase inhibitors and their interaction with the native and cobalt-substituted enzyme: Kinetic and spectroscopic investigations. *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001-1010.
- [42] Alward, W.L., 1998, Medical management of glaucoma. *The New England Journal of Medicine*, 339(18), 1298-1307.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [43] Pocker, Y., and Joan, S.Y., 1973, Plant Carbonic Anhydrase: Properties and carbondioxide hydration kinetics, *Biochem.*, 12, 5127-5134.
- [44] Schuman, J. S., 2000, Antiglaucoma medications. *Clinical Therapeutics*, 2(22), 167-208.
- [45] Rosenberg, L.F., ve ark., 1998. Combination of systemic acetazolamide and topical dorzolamide in reducing intraocular pressure and aqueous humor formation, 105(9), 1581-1594.
- [46] Mincione, F., ve ark., 2007, The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents, *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 849-854.
- [47] Sugrue, M. F., 2000, Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors, *Prog. Retin. Eye Res.*, 19, 87-112.
- [48] Cox, S. N., ve ark., 1988, Treatment of chronic macular edema with acetazolamide, *Arch. Ophthalmol.*, 106, 1190-1195.
- [49] Gao, B.B., ve ark., 2007, Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation, *Nature Med.* 13, 181-188.
- [50] Supuran, C. T., ve ark. 2004, Carbonic Anhydrase – Its inhibitors and activators (eds Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 67-147 (CRC, Boca Raton).
- [51] Maren, T. H., 1995, The development of topical carbonic anhydrase inhibitors, *J. Glaucoma*, 4, 49-62.
- [52] Innocenti, A., ve ark., 2005, Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the membrane-bound human and bovine isozymes IV with sulfonamides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 1149-1154.
- [53] Supuran, C. T., 2003, Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 13, 1545-1550.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [54] Picard, F., ve ark., 2000, Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats, *Obesity Res.*, 8, 656–663.
- [55] Maxwell, P. H., ve ark., 1999, The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen dependent proteolysis, *Nature*, 399, 271–275.
- [56] Hon, W. C., ve ark., 2002, Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL, *Nature*, 417, 975–978.
- [57] Talbot, D. C., ve ark., 2007, A randomized phase II pharmacokinetic and pharmacodynamic study of indisulam as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.*, 13, 1816–1822.
- [58] Svastova, E., ve ark., 2004, Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH., *FEBS Lett.*, 577, 439–445.
- [59] Dubois, L., ve ark., 2007, Imaging the hypoxia surrogate marker CA IX requires expression and catalytic activity for binding fluorescent sulfonamide inhibitors, *Radiother. Oncol.*, 83, 367–373.
- [60] Riihonen, R., ve ark., 2007, Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts, *Bone* 40, 1021–1031.
- [61] Innocenti, A., ve ark., 2004, Carbonic anhydrase inhibitors: the first on-resin screening of a 4- sulfamoylphenylthiourea library, *J. Med. Chem.*, 47, 5224–5229.
- [62] Zimmerman, S. A., Ferry, J. G., and Supuran C. T., 2007, Inhibition of the archaeal β - Class (Cab) and γ - Class (Cam) carbonic anhydrases, *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 901–908.
- [63] 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, 248 p.
- [64] Maren, C. H., 1960, A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26 p.
- [65] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G., and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity, *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172 p.
- [66] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, *J. Biol. Chem.*, 241, 5137 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [67] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 1996, A new method for the purification of Carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography, Turkish Journal of Medical Sciences, 26, 163-166.
- [68] Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680 p.
- [69] Temizkan, G. ve Arda, N., 2004, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, Nobel Tıp Kitapevleri.
- [70] Maren, T. H., and Janskowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot, Cur. Eye. Res., 4, 399 p.
- [71] Tashian, R. E., ve ark., 1992, On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III isozymes: Current topics in Biological and medical research, Molecular Structure and Regulation, 7, 79.
- [72] Sly, W.S., and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies, Annu. Rev. Biochem, 67, 375-401 p.
- [73] Smith, K. S., and Ferry, J. G., 2000, Prokaryotic carbonic anhydrases, FEMS Microbiol. Rev., 24, 335–366.
- [74] Beydemir, S., Çiftçi, M., Özmen, I, Okuroğlu, M.E.B., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, Ö.I., 2000, Effects of some medical drugs on enzyme activities of Carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, Pharmacological Research, 42, 187.
- [75] Demir, N., Demir, Y. and Nadaroglu, H., 2001. Carbonic anhydrase from bovine bone, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 31, 33-47.
- [76] Krungkrai, S. R., ve ark. 2001, Characterization of Carbonic anhydrase in Plasmodium Falciparum. Int. J. Parasitol, 31, 661-668.
- [77] Supuran, C. T., 1998. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 29. Interaction of isozymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives, Eur. J. Med. Chem., 33, 739–752.