



BENZOTİYAZOL TÜREVLERİNİN VE
METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN
ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Yasemin TUNCA

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Ocak – 2018

BENZOTİYAZOL TÜREVLERİNİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN
ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Yasemin TUNCA

Dumlupınar Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Ocak – 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Yasemin TUNCA tarafından hazırlanan "BENZOTİYAZOL TÜREVLERİNİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ" adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

19/01/2018

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Anabilim Dalı Başkanı, Biyokimya Bölümü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Danışman, Biyokimya Bölümü

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Şükrü BEYDEMİR
Eczacılık Fakültesi, Anadolu Üniversitesi

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Biyokimya Bölümü, Dumlupınar Üniversitesi

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK
Biyokimya Bölümü, Dumlupınar Üniversitesi

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan intihal programı ile tarandığını ve benzerlik oranının %19 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.



Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Danışman



Yasemin TUNCA

Öğrenci

BENZOTİYAZOL TÜREVLERİNİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Yasemin TUNCA

Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi, 2018

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1.), karbondioksitin HCO_3^- ve H^+ iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidratasyonu reaksiyonunu katalizleyen, aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. İnsan göz dokusunda CA I, CA II ve CA IV izoenzimleri bulunur. Bunlardan CA I ve CA II izoenzimleri sitozolik iken, CA IV izoenzimi membrana bağlıdır. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aköz humorun fazla salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncını (IOP) düşürdükleri için glokom tedavisinde kullanılırlar. Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin bu enzim üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Öncelikle insan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri afinite jeli (Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid) kullanılarak saflaştırıldı. hCA I 1108,21 EU/mg protein spesifik aktivite ve %16,82 verimle, hCA II 2399,80 EU/mg protein spesifik aktivite ve %23,97 verimle saflaştırılmıştır. Kalitatif ve kantitatif protein tayini yapıldı ve SDS-PAGE elektroforezi ile enzimlerin saflığı kontrol edildi. Enzim aktiviteleri kinetik çalışmalarla belirlendi. Daha sonra sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bileşiklerin inhibisyon etkisini belirlemek için karbonik anhidraz enziminin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü. İnhibisyon etkisi gösteren bileşikler için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i sabitleri hesaplandı. Hidrataz IC_{50} değerleri hCA I için 2,55-84,07 μM arasında, hCA II için 1,91-56,48 μM arasında bulundu. Esteraz IC_{50} değerleri hCA I için 0,15-890 μM arasında, hCA II için ise 0,09-820 μM arasında bulundu. K_i değerleri ise hCA I için 0,06-4,38 μM arasında, hCA II için ise 0,04-3,5 μM arasında bulundu.

Anahtar Kelimeler: Glokom, IC_{50} değerleri, Karbonik anhidraz, K_i değerleri, Metal kompleksleri, Sülfonamidler.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF BENZOTHAZOLE DERIVATIVES AND THEIR METAL COMPLEXES ON HUMAN ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASES

Yasemin TUNCA

Biochemistry, MSc. Thesis, 2018

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Carbonic anhydrase (CA) (E.C. 4.2.1.1.) is a metalloenzyme that contains zinc ion in its active site. It catalyses that the reversible hydration of carbon dioxide to yield bicarbonate and proton in a two-step reaction. Human eye tissue contains CA I, CA II and CA IV isoenzymes. CA I and CA II isoenzymes are cytosolic, but CA IV isoenzyme is membrane-bound. Carbonic anhydrase inhibitors have been used for treatment of glaucoma, because of their decrease higher intraocular pressure which occurs with excessive secretion of aqueous humor. In this study, the inhibitory effects of new carbonic anhydrase inhibitors, which candidates for treatment of glaucoma, on this enzyme were investigated *in vitro*.

Firstly, hCA I and hCA II isoenzymes were purified from human erythrocytes by using affinity gel (Sephacrose-4B-L-tyrosine-sulfanilamide). Specific activity and purification yield of hCA I 1108,21 EU/mg protein and %16,82, respectively. Specific activity and purification yield of hCA II 2399,80 EU/mg protein and %23,97, respectively. The qualitative and quantitative protein assay was made and the purity of the enzymes was checked with SDS-PAGE electrophoresis. Enzyme activities were determined with kinetic studies. Later, the inhibition effects of synthesized compounds on hCA I and hCA II isoenzymes were determined. To determine inhibitory effects of the compounds, the hydratase and esterase activities of carbonic anhydrase enzyme were measured. %Activity vs. [I] graphics were drawn and the IC₅₀ values were calculated for potential inhibitory compounds. The K_i constants were calculated from Lineweaver-Burk graphics. The IC₅₀ values of compounds for hydratase activity are in the range of 2,55-84,07 µM for hCA I and 1,91-56,48 µM for hCA II, respectively. The IC₅₀ values of compounds for esterase activity are in the range of 0,15-890 µM for hCA I and 0,09-820µM for hCA II, respectively. The K_i values of these inhibitors are in the range of 0,06-4,38 µM for hCA I and 0,04-3,50 µM for hCA II, respectively.

Keywords: Carbonic anhydrase, Glaucoma, IC₅₀ values, K_i values, Metal complexes, Sulfonamides.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Metin BÜLBÜL'e, maddelerin sentez ve karakterizasyon işlemlerini yapan Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Halil İLKİMEN'e teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan aileme ve eşim Ekrem TUNCA' ya teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
 1. GİRİŞ	 1
2. ENZİMLER	3
3. KARBONİK ANHİDRAZ	10
3.1. Katalitik Özellikleri	11
3.1.1. α -Karbonik anhidrazın katalitik mekanizması	12
3.2. Fizyolojik Fonksiyonları	14
3.3. Karbonik Anhidraz I	17
3.3.1. Farmakolojik hedef olarak CA I	17
3.4. Karbonik Anhidraz II	18
3.4.1. CA II inhibitörleri	20
3.5. Antiglokom Ajanları Olarak Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	22
3.5.1. Birinci nesil inhibitörler	22
3.5.2. İkinci nesil inhibitörler: topikal olarak etkili sülfonamidler	23
3.5.3. Üçüncü nesil inhibitörler	25
4. MATERYAL VE METOD	26
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
4.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	26
4.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	29
4.4. Yöntemler	30
4.4.1. Protein tayini	30
4.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	31
4.4.3. Afinite jelinin hazırlanması	32
4.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflaştırılması	35

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.4.5. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi.....	37
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
5.1. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	39
5.2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimleri (hCA I ve hCA II) Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	41
5.2.1. Sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	41
5.2.2. Sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	50
5.2.3. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin belirlenmesi.....	64
KAYNAKLAR DİZİNİ	83
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.	5
2.2. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.	6
2.3. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.	6
2.4. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.	7
3.1. Çeşitli CA ailelerindeki metal iyon koordinasyonu.	11
3.2. hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki Zn(II) iyonunun üç histidin kalıntısı (His94, His96 ve His119) ve aktif bölgenin koruyucusu olan Thr199 ve Glu106 kalıntılarıyla koordinasyonunun şematik gösterimi.	12
3.3. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği CO ₂ -hidrasyon reaksiyonu mekanizmasının şematik gösterilişi.	13
3.4. hCA II izoenzimi ile çeşitli iyonların oluşturduğu yapılar.	21
3.5. Benzensülfonamit bileşiğinin hCA II aktif bölgesi ile etkileşimi.	22
4.1. Çalışmalarda kullanılan bileşikler.	27
4.2. Afinite jelinin hazırlanması.	34
5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin grafik.	39
5.2. Bradford metodu için hazırlanan kalibrasyon grafiği.	40
5.3. SDS-PAGE sonuçları.	41
5.4. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 2 bileşiğinin etkisi.	42
5.5. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 3 bileşiğinin etkisi.	43
5.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 4 bileşiğinin etkisi.	44
5.7. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.	45
5.8. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 2 bileşiğinin etkisi.	46
5.9. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 3 bileşiğinin etkisi.	47
5.10. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 4 bileşiğinin etkisi.	48
5.11. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.	49
5.12. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine mABS bileşiğinin etkisi.	50
5.13. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine HmABSMAL bileşiğinin etkisi.	51
5.14. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 1 bileşiğinin etkisi.	52
5.15. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 2 bileşiğinin etkisi.	53
5.16. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 3 bileşiğinin etkisi.	54

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.17. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 4 bileşiğinin etkisi.	55
5.18. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.	56
5.19. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine mABS bileşiğinin etkisi.	57
5.20. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine HmABSMAL bileşiğinin etkisi.	58
5.21. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 1 bileşiğinin etkisi.	59
5.22. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 2 bileşiğinin etkisi.	60
5.23. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 3 bileşiğinin etkisi.	61
5.24. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 4 bileşiğinin etkisi.	62
5.25. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.	63
5.26. mABS bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	65
5.27. HmABSMAL bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	66
5.28. 1 bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	67
5.29. 2 bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	68
5.30. 3 bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	69
5.31. 4 bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	70
5.32. 5 bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.	71
5.33. mABS bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	72
5.34. HmABSMAL bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	73
5.35. 1 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	74
5.36. 2 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	75
5.37. 3 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	76
5.38. 4 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	77
5.39. 5 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. CA izoformlarının doku/organ dağılımı ve ilişkili olduğu hastalıklar.	14
4.1. Çalışmalarda kullanılan bileşiklerin isimleri ve verilen kısaltmaları.	28
5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar.	39
5.2. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	42
5.3. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 3 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	43
5.4. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 4 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	44
5.5. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	45
5.6. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	46
5.7. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 3 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	47
5.8. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 4 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	48
5.9. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	49
5.10. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla mABS bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ..	50
5.11. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla HmABSMAL bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	51
5.12. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 1 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	52
5.13. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	53
5.14. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 3 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	54
5.15. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 4 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	55

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.16. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	56
5.17. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla mABS bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar. ..	57
5.18. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla HmABSMAL bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	58
5.19. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 1 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	59
5.20. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	60
5.21. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 3 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	61
5.22. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 4 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	62
5.23. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	63
5.24. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla mABS bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	65
5.25. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla HmABSMAL bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	66
5.26. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 1 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	67
5.27. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	68
5.28. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 3 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	69
5.29. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 4 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	70
5.30. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	71
5.31. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla mABS bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	72
5.32. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla HmABSMAL bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki Ki sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	73

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.33. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 1 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	74
5.34. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	75
5.35. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 3 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	76
5.36. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 4 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	77
5.37. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	78
5.38. Bileşiklerin hidrataz ve esteraz IC_{50} değerleri ile esteraz K_i değerleri.	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ζ	Zeta
η	Eta
Å	Angstrom
μ	Mikro
M	Molarite
°C	Celcius
mL	Mililitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
K_m	Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu
K_i	İnhibisyon denge sabiti
V_{max}	Maksimum hız
[I]	İnhibitör konsantrasyonu
IC_{50}	Enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu
[S]	Substrat konsantrasyonu

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CA	Karbonik anhidraz
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
SDS	Sodyum dodesil sülfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi

1. GİRİŞ

Glokom, göz içi basıncının yükselmesiyle görme sinirinin giderek zayıflamasına ve böylece görme kaybına yol açan bir hastalıktır (Soylu, 2001). Glokom, risk faktörleri, istatistik özellikleri, semptomları, süresi, tedavisi ve teşhisi bakımından farklılık gösteren bir dizi hastalık içerir. Glokom, dünya çapında geri dönüşü olmayan körlüğün en sık nedenlerinden biridir (Bourne vd., 2013; Stevens vd., 2013; Tham vd., 2014).

2010 yılında, dünya genelinde 32,4 milyon kör kişiden 2,1 milyon (% 6,5) kişinin körlük nedeni glokomdur (Bourne vd., 2016). Yaşlılık ile olan ilişkisi nedeniyle, glokomun genel görülme sıklığı, daha genç nüfuslu bölgelerde daha yaşlı nüfuslu bölgelere oranla daha düşüktür (Bourne vd., 2016). Glokomun küresel görülme sıklığı, 40-80 yaş arası insanlar için yaklaşık % 3,5'tur (Tham vd., 2014).

2013'te dünya genelinde glokomdan etkilenen 40-80 yaş arası insanların sayısının 64,3 milyon olduğu belirlenmiştir ve bu rakamın 2020'de 76 milyona ve 2040 yılında 112 milyona çıkacağı öngörülmektedir (Tham vd., 2014).

Glokomun kronik formları ağrısız olduğu için, ölçülebilir görme alanı kusurları glokomun erken bir safhasında gelişmez ve kusurlar genelde her iki görme alanında da görülmez. Bu yüzden glokomdan etkilenen bireylerin farkındalığı hastalık evresinde olur (Chauhan vd., 2013; Loewen vd., 2015; Skaat vd., 2016; Zhang vd., 2016; Yu vd., 2016).

Glokomatöz optik nöropatinin daha da ilerleme riskini azaltmak için kanıtlanmış ve genel kabul görmüş tek tedavi, göz içi basıncın düşürülmesidir (Kas vd., 2002; Garway-Heath vd., 2015; Heijl vd., 2002). Göz içi basıncının azaltılması, ilaç tedavisi, lazerle tedavi veya cerrahi müdahale ile sağlanır. Göz içi basıncını düşürmek için topikal ilaçların çeşitli kategorileri mevcuttur. Genel olarak, prostaglandin analogları birinci basamak tıbbi tedavidir. Prostaglandinlere alternatif olarak, humor aköz üretimini azaltarak göz içi basıncını düşüren β adrenerejik blokerleri vardır. Diğer ilaç grupları ise, humor aköz üretimini azaltan topikal karbonik anhidraz inhibitörlerini içerir. Günümüzde ise karbonik anhidraz inhibitörleri olarak sülfonamid türevleri kullanılmaktadır (Netland, 2008).

1995 yılına kadar glokom tedavisinde kullanılan, sülfonamid türevleri olan asetazolamit, metazolamit, etokzolamit ve diklorfenamit bileşikleri göz dokusundaki karbonik anhidraz izoenzimleri ile beraber diğer dokulardaki enzimleri inhibe ettiğinden pek çok yan etkisi bulunmuştur (Maren, 1967; Supuran ve Scozzafava, 2000). Bu yan etkiler arasında parestezi,

asidoz, iştah kaybı, kilo kaybı, depresyon, sindirim bozuklukları, trombositopeni ve agranülositoz bulunmaktadır (Netland, 2008).

1995 ve daha sonraki tarihlerde göze damla olarak uygulanabilen topikal inhibitörler olarak geliştirilen dorzolamit ve brinzolamit bileşiklerinin ise göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşmasına sebep oldukları tespit edilmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2001; Conroy, 1997). Tüm bu nedenler, araştırmacıları, yeni inhibitör bileşikler geliştirmeye sevk etmiştir.

Benzotiyazoller, antikonvülsan, antifungal, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antihelmintik özellikleri olan, biyolojik açıdan önemli belirteçlerdir ve lokal anestetik etkisi olduğu bilinen türevleri, herbisitler, fungusitler ve bitki büyüme düzenleyicileri olarak geliřtirilmiřtir (Alkan vd., 2016).

Bu çalışmada, 3-(3 veya 4-sülfamoilfenilkarbamoyl)akrilik asit ile 2-amino-6-klorobenzotiyazolden elde edilen proton transfer tuzları ile bunların Cu(II) komplekslerinin insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. ENZİMLER

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100 lük ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere bütün enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Vücudumuzda yaşamımızı sürdürmemizi sağlayan pek çok biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonların tamamına yakını enzimler olarak bilinen biyolojik katalizörler aracılığıyla yürütülmektedir (Voet ve Voet, 2004).

Bazı enzimler katalitik aktivite için aminoasit kalıntıları dışında kimyasal gruplara gerek duymaz. Bazıları ise katalitik aktivite için kofaktör olarak adlandırılan Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metalorganik gruplara gerek duyar. Enzim proteinine çok sıkı olarak bağlanan koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır (Lehninger, 2005).

Pek çok ilaç vücudumuzdaki enzimlerin aktivitelerine etki ederek etkisini gösterir. Bu yüzden ilaç çalışmaları için enzimlerin kinetik parametrelerinin bilinmesi gerekir. K_m sabiti ve turnover sayısı gibi kinetik parametrelerin belirlenebilmesi için Henri-Michaelis-Menten bağıntısından yararlanılır.

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Henri-Michaelis-Menten eşitliği

Bu denklemden elde edilen veriler ordinatta hız, apsiste substrat konsantrasyonu olacak şekilde grafiğe geçirildiği zaman, bir hiperbol elde edilir. Teorikte kullanışlı olsa bile deneysel çalışmalar sonucu bu grafikten sağlıklı veriler elde edilemeyebilir. Bu yüzden grafiğin bir doğru grafiği olması gerekir. Yukarıdaki eşitliğin değiştirilmiş şekli olan Lineweaver-Burk eşitliği ve bu eşitlikten elde edilen doğrusal grafik oldukça kullanışlıdır. Böylece K_m ve $V_{\max}$ değerleri daha doğru olarak belirlenebilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Lehninger, 2005).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Lineweaver-Burk eşitliği

Enzimlerin katalizleme gücü turnover sayısı ile verilir. Turnover sayısı; optimum koşullar altında bir mol enzim tarafından bir dakikada ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanır. Karbonik anhidraz enzimi bilinen en yüksek turnover sayılı ($36 \times 10^6 \text{ dk}^{-1}$) enzimlerdendir (Segel, 1976).

Birçok dokudaki enzimin gerçek molar konsantrasyonu bilinmemektedir. Enzim miktarını belirleyebilmek için enzim aktivitesinden yararlanılır. Enzim aktivitesi enzim ünitesi (EU veya U) cinsinden verilir. Uluslararası Biyokimyacılar Birliği Enzim Komisyonu tarafından bir enzim ünitesi tanımı yapılmıştır. Optimum şartlar altında bir dakika içerisinde bir mikromol ürün oluşturan enzim miktarı bir enzim ünitesidir. Spesifik aktivite ise miligram protein başına düşen enzim ünitesi olarak tanımlanır ve enzim saflığının bir göstergesidir. Katal ise bir saniyede bir mol substratın ürüne dönüşümünü katalizleyen enzim miktarıdır (Segel, 1976).

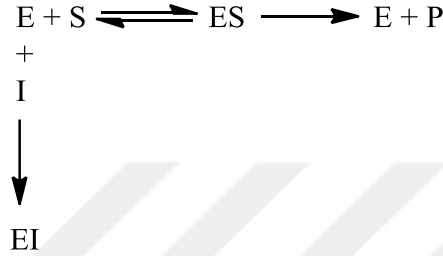
Enzim aktivitesi üzerine etki eden faktörler de substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, varsa kofaktör konsantrasyonu, inhibitör ve aktivatör konsantrasyonları olarak sıralanabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Aynı organizmada aynı reaksiyonları katalizledikleri halde molekül yapıları bakımından farklılık gösterebilen enzimler de vardır. Bunlara izoenzimler veya izozimler denir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı ve substratlarına karşı ilgileri değişkenlik gösterebilir. İzoenzimlere örnek olarak karbonik anhidraz enzimi verilebilir. Bu enzimin on altı izoenzimi belirlenmiştir (Kalaycıoğlu ve ark., 2006; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimler üzerinde çalışılan bir diğer konu da enzim inhibisyonudur. Enzimlerin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitelerinin bazı maddeler tarafından azaltılması veya ortadan kaldırılması olayına enzim inhibisyonu denir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Enzim katalizli reaksiyonların hızını azaltan bu maddelere ise inhibitör denir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu hücrelerde başlıca düzenleyicidir. İnhibisyon çalışmaları; enzimin seçiciliği, aktif bölgesinin fiziksel ve kimyasal yapısı ile reaksiyonun kinetik mekanizması hakkında bilgi verir (Segel, 1976). Enzim inhibitörleri, bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasındadır (Lehninger, 2005). Örneğin, glokom tedavisinde kullanılan sülfonamid türevi ilaçlar, karbonik anhidraz enzimi inhibitörleridir.

Enzim inhibisyonu, dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitörler bir enzimle birleşen veya enzimin aktivitesi için temel olan bir işlevsel grubu bozan veya özellikle kararlı bir yapı meydana getiren bileşiklerdir. Dönüşümsüz inhibitör ve enzim arasında sıklıkla kovalent bağlanmanın oluşumuna rastlanır (Şekil 2.1) (Lehninger, 2005). Dönüşümsüz

inhibisyonda $V_{\max}$ değeri azalırken K_m sabit kalır. Dolayısıyla dönüşümsüz inhibisyon yarışmasız inhibisyona benzemektedir. $V_{\max}$ azalır, çünkü bazı enzimler inhibe edildiği için sistemden uzaklaştırılmış olur. $V_{\max} = k_3[E_T]$ olduğu hatırlanırsa bu ifadenin doğru olduğu görülür (Segel, 1976).



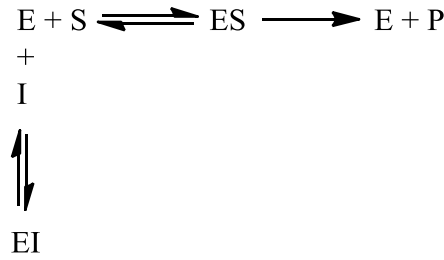
Şekil 2.1. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim ile inhibitörün etkileşmesi arasında bir denge söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon ve lineer karışık tip inhibisyon olmak üzere dört çeşittir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Yarışmalı inhibitörler substratın bağlanmasını önleyecek şekilde serbest enzim ile birleşirler. Çünkü bu inhibitörler yapı olarak substrata benzerler. Yarışmalı inhibisyon durumundaki hız eşitliği aşağıdaki gibidir:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

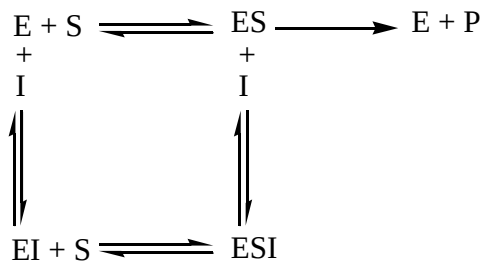
Yarışmalı inhibisyonda inhibitör substrat için K_m değerini artırmada rol oynar. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça K_m değeri de artar. $V_{\max}$ değeri değişmeden kalır, ancak yarışmalı inhibitör varlığında $V_{\max}$ değerine ulaşabilmek için daha yüksek substrat konsantrasyonu gereklidir (Şekil 2.2) Yarışmalı inhibisyonda inhibisyonun derecesi $[S]$, $[I]$, K_m ve K_i değerlerine bağlıdır. $[I]$ sabit, $[S]$ arttığı durumda inhibisyonun derecesi azalır. $[S]$ sabit $[I]$ arttığı durumda inhibisyonun derecesi artar. K_i değeri ne kadar küçükse inhibisyonun derecesi o kadar büyüktür (Segel, 1976).



Şekil 2.2. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

Yarışmasız inhibisyonunda ise inhibitörün, substratın enzime bağlanması üzerine bir etkisi yoktur. Substrat ve inhibitör dönüşümlü, rastgele ve bağımsız olarak enzimin farklı bölgelerine bağlanır. Bu da substrat ve enzimin aynı anda enzime bağlanabileceğini gösterir. Yani I, E ve ES kompleksine bağlanabilir veya S, E ve EI kompleksine bağlanabilir. Sonuçta oluşan ESI kompleksi katalitik olarak inaktiftir. Bu inhibisyon çeşidinde katalitik merkezin doğru olarak konumlandırılmasının engellendiği düşünülmektedir. Yarışmasız inhibitör varlığında $V_{\max}$ değeri azalır, çünkü enzimin katalitik etkinliği düşer. İnhibitör aktif bölgeye bağlanmadığı için substrat enzime bağlanabilir, yani enzimin substratına karşı ilgisi değişmemiştir. (Şekil 2.3) Bunun sonucu olarak K_m değerinin değişmediğini söyleyebiliriz (Segel, 1976). Yarışmasız inhibisyon durumundaki hız eşitliği aşağıdaki gibidir:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

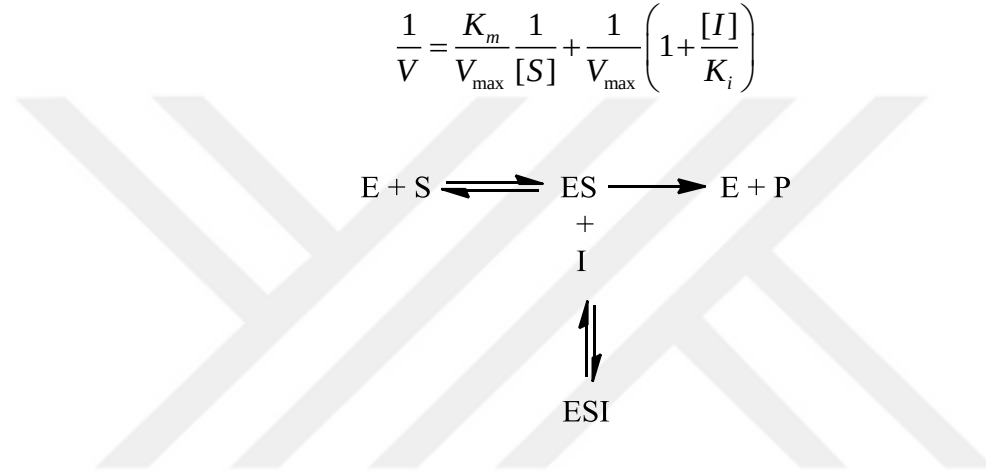


Şekil 2.3. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

Yarı yarışmalı enzim inhibisyonunda ise inhibitör inaktif ESI kompleksi vermek üzere enzim-substrat kompleksine dönüşümlü olarak bağlanır, serbest enzime bağlanamaz. Tek reaktantlı sistemlerde nadir görülür. Daha çok birden fazla reaktant içeren sistemlerde görülür (Segel, 1976). Yarı yarışmalı inhibitörün enzime bağlanmasının aktif bölgenin yapısını değiştirdiği, böylece enzimi katalitik olarak inaktif hale getirdiği düşünülmektedir. (Şekil 2.4) Yarı yarışmalı inhibisyon, inhibitörün enzimin katalitik fonksiyonunu etkilemesini fakat

substrat bağlama gücünü etkilememesini gerektirir. Tek substratlı enzimler için (protonlar veya metal iyonları gibi küçük inhibitörler hariç) bahsi geçen durumun mümkün olabilirliliği oldukça zordur. Yani yukarıda da bahsedildiği gibi bu inhibisyon çok substratlı enzimler için önemlidir (Voet ve Voet, 2004). İnhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_m azalır. Aynı zamanda ortamda sürekli ESI kompleksi var olacağından V_{max} da düşer (Keha ve Küfrelioğlu, 2004; Segel, 1976).

Yarı yarışmalı inhibisyon durumundaki hız eşitliği aşağıdaki gibidir:



Şekil 2.4. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

Lineer karışık tip inhibisyon ise yarışmasız inhibisyonun özel bir türüdür. Bu inhibisyon, substrat EI kompleksine ve inhibitör ES kompleksine bağlandığı zaman gerçekleşir. Her iki durumda da katalitik bakımdan aktif olmayan ESI kompleksi oluşur. Ancak burada EI kompleksinin substrata karşı ilgisi serbest enzime göre daha azdır. Bu durumda $K_m (1+[I]/K_i)$ kesri kadar değişirken V_{max} ise $(1+[I]/\alpha K_i)$ kadar değişir. K_i , EI kompleksinin ayrışma sabiti, αK_i ise ESI kompleksinden inhibitörün ayrışma sabitidir. Lineer karışık tip inhibisyondaki hız eşitliği aşağıdaki gibidir (Arslan, 2003).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)$$

Metabolik yollardaki tepkimeler ve kimyasal ara ürünler ile kataliz basamağında etkin olan düzenlenme mekanizmaları hakkındaki bilgilerimizin büyük bölümü saflaştırılmış enzimlerle yapılan araştırmalardan türetilmiştir. Kinetikler, kofaktörler, etkin bölgeler, yapı ve etki mekanizması hakkında güvenilir bilgi elde edebilmek için de ileri derecede saflaştırılmış enzimlere ihtiyaç duyulur (Murray vd., 2004).

Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok yapı taşını içeren ham bir hücre özütünden ayırmaktır. İstenilen enzimin kimyasal ve fiziksel olarak benzer yüzlerce proteinden ayrılması bir sorundur (Murray vd., 2004).

Enzimler protein yapısında olduklarından, proteinlere uygulanan saflaştırma işlemleri enzimlere de uygulanabilir. Protein saflaştırmadaki ilk basamak hedef proteinin bulunduğu hücreleri parçalamaktır. Böylece ham özüt adı verilen çözeltiye proteinlerin geçmesi sağlanmış olur. Gerekli durumlarda özgül organelleri elde etmek için diferansiyel santrifüjleme yapılabilir (Lehninger, 2005). Ham özüte geçen proteinler, bazı özelliklerinden faydalanılarak fraksiyonlara ayrılabilir. Bu özellikler şöyle sıralanabilir:

- Çözünürlük farkı (amonyum sülfat çöktürmesi)
- Molekül büyüklüğü farkı (jel filtrasyon kromatografisi)
- Net elektriksel yük farkı (iyon değiştirme kromatografisi)
- Adsorblanma farkı (seçimli adsorbsiyon)
- Spesifik ligantlara bağlanma özellikleri (afinite kromatografisi)

Saflaştırmada en önce gelen fraksiyonlama çözünürlük farkına dayanılarak yapılan fraksiyonlamadır. Yüksek tuz derişimlerinde proteinlerin çözünürlüğü düşüktür (salting out). Amonyum sülfat gibi iki değerlikli nötral tuzlar daha yüksek bir iyonik şiddet oluşturduklarından salting out işlemlerinde yaygın olarak kullanılırlar. Uygun miktarda tuz ilavesi ile ham özütteki proteinlerden bazıları çökerken bazıları çözeltide kalır. Sonra diyaliz işlemi uygulanarak amonyum sülfatın uzaklaştırılması sağlanabilir. Diyaliz işleminde kısmen saflaşmış özüt yarı geçirgen bir zardan yapılmış torbaya konur. Bu torba uygun iyonik güçteki fazla miktarda tampon çözeltiye asıldığında zar, tuz ve tamponun yer değiştirmesine izin verirken proteinleri geçirmez (Lehninger, 2005).

Ön fraksiyonlama işlemi bittikten sonra, yukarıda bahsedilen kromatografi yöntemlerinden uygun olanı ile protein saf olarak elde edilebilir. Proteinleri yüksek spesifiklikte ayırması sebebiyle afinite kromatografisi oldukça güvenilir ve doğru sonuç veren bir yöntemdir. Bu yöntemde saflaştırılması istenen enzim ile özgül olarak etkileşen hareketsiz bir ligant kullanılır. Protein karışımı bu hareketsiz ligantla karıştırıldığında, sadece ligantla güçlü etkileşime giren proteinler bağlanır. İstenmeyen proteinler kolondan akıp gider ve atılır (istenmeyen proteinleri uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılır). Daha sonra istenilen proteinler hareketsiz liganttan durulanarak alınır. Durulama için ya ligantın suda çözünür formu ya da yüksek derişimli tuz çözeltileri kullanılır. Afinite kromatografisi yöntemleriyle gerçekleştirilen saflaştırma çok mükemmel olup, çoğu kez çok sayıda klasik yöntemin ardışık

uygulanmasından daha iyi sonuçlar verir (Murray vd., 2004). İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması da afinite kromatografisi ile gerçekleştirilir.



3. KARBONİK ANHİDRAZ

Bütün organizmaların metabolik reaksiyonlardan oluşan yüksek miktarda CO₂'i dönüştürmek için CA lara ihtiyacı vardır (Smith vd., 1999; Xu vd., 2008; Schlicker vd., 2009; Minakuchi vd., 2009; Nishimori vd., 2009; Güzel vd., 2009; Carta vd., 2009; Nishimori vd., 2010; Winum vd., 2010; Vullo vd., 2011; Pan vd., 2013; Carta vd., 2011; Nishimori vd., 2008). Karbonik anhidrazlar (CA) yaşayan her organizmada bulunan ve birbirinden bağımsız altı gen ailesi tarafından kodlanan metaloenzimlerdir (Alterio vd., 2012). CA lar sadece metabolik süreçte oluşan yüksek miktarda CO₂ yi dönüştürmekle kalmaz, aynı zamanda olası asit-baz dengesini de yönetir. Bütün canlı formlarda pH düzenlemesi oldukça önemli bir süreçtir çünkü birçok biyokimyasal reaksiyon pH tarafından düzenlenmektedir (Supuran, 2008a; Alterio vd., 2012; Neri ve Supuran, 2011; Supuran, 2012; Supuran, 2011a; Del Prete vd., 2014; Alterio vd., 2012; Smith vd., 1999; Xu vd., 2008).

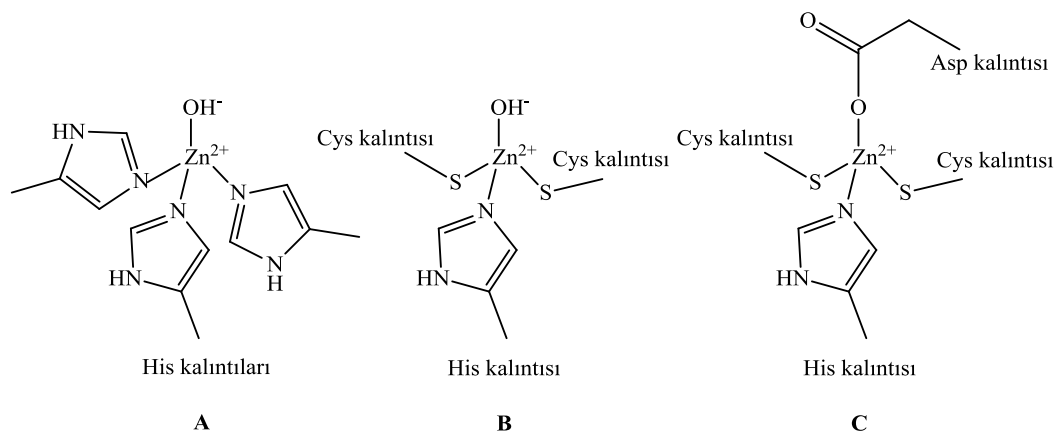
α -CA lar başlıca omurgalılar, mantarlar, protozoa, mercanlar, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmalarında ayrıca bazı bakterilerde bulunur (Supuran, 2008a; Alterio vd., 2012; Pan vd., 2013). β -CA lar bakteriler, algler ve hem monokotiledon hemde dikotiledonların sitoplazmalarında ve ayrıca birçok mantarlar ve arkealarda bulunur (Minakuchi vd., 2009; Winum vd., 2010; Carta vd., 2011). γ -CA lar bitkilerde, bakterilerde ve arkealarda bulunur (Smith vd., 1999). ζ -CA lar yalnızca deniz diatomlarında gözlemlenir (Alterio vd., 2012; Xu vd., 2008), δ -CA lar deniz fitoplanktonları, dinoflagellata, diatom ve klorofik prasinofiteslerde CO₂ fiksasyonuna katlı sağlarken, η -CA lar deniz diatomlarında bulunur (Del Prete vd., 2014). Tüm bu organizmalarda CA lar CO₂ ve pH hemostazı, solunum ve bikarbonat/CO₂ in taşınımı, bazı doku ve organlarda elektrolit salınımı; karboksilasyon reaksiyonu için bir substrat görevi gören bikarbonat bulunduran glukoneogenesis, lipogenesis, ve ürogenesis gibi biyosentetik reaksiyonlar, kemik erimesi, kireçlenme ve tümör oluşumu ile bağlantılı olarak önemli fizyolojik rol oynamaktadır ve bu çalışmaların hepsi omurgalılarda incelenmiştir (Supuran vd., 2003; Carta ve Supuran, 2013; Masini vd., 2013; Aggarwal vd., 2013; Scozzafava ve Supuran, 2013; Monti vd., 2013). CA lar algler, bitkiler ve siyanobakterilerde CO₂ ve bikarbonatın RUBISCO enzim kompleksinin yakınında birikmesini sağlayarak fotosentezde ve birkaç diğer biyosentetik reaksiyonda önemli rol oynarlar (Supuran, 2011a; Bertucci vd., 2013). Ayrıca diatomlarda bulunan δ - ve ζ -CA lar CO₂ fiksasyonunda ve SiO₂ döngüsünde önemli role sahiptir (Xu vd., 2008).

Tüm memeli CA ları α -sınıfı üyesidir. Bu sınıfın üyeleri moleküler özellik, oligomerik düzenlemeler, hücre lokalizasyonları, organ ve dokulardaki dağılımları, ekspresyon seviyeleri,

kinetik özellikleri ve inhibitörlerin farklı sınıflara tepki vermesi açısından 16 farklı izoenzim ile tanımlanmıştır (Çizelge 3.1) (Supuran, 2008a; Clare ve Supuran, 2006). Üç izoformu (CA VIII, X, XI) CA benzeri protein ve herhangi bir katalitik aktiviteden yoksun olarak adlandırılırken, 13 izoformu (CA I-IV, VA, VB, VI, VII, IX ve XII-XIV) enzimatik aktivite göstermektedir (Çizelge 3.1) (Supuran vd., 2004; Supuran, 2008b). Birçok çalışma fizyolojik süreçte CA ların önemli rollerini ispatlamış ve bu enzimlerin farklı insan dokuları arasındaki ilişkiyi ve anormal seviyelerini göstermiştir (Supuran vd., 2009). Sonuç olarak, son zamanlarda biyomedikal uygulamalar ile CA izoenzimleri inhibitör ve aktivatör dizaynı için ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir (Supuran 2007; Supuran vd., 2003; Supuran ve Scozzafava, 2007; Scozzafava vd., 2006). CA aktivatörleri, alzheimer hastalıkları ya da yaşlanmadan kaynaklanan öğrenme ve hafıza kayıplarının tedavisinde önemli etkiye sahiptirler (Winum vd., 2006). CA inhibitörleri ise diüretik, antiglokom, antiepileptik, antiobesite ve antitümör ilaçları olarak kullanılmaktadır (De Simone vd., 2008; Supuran vd., 2008; De Simone ve Supuran, 2007; Winum vd., 2008).

3.1. Katalitik Özellikleri

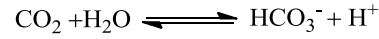
Bütün CA lar metaloenzimdirler ve katalitik aktivitede metal iyonları önemli rol oynar (Innocenti ve Supuran, 2010). CA lar katalizi gerçekleştirmek için aktif bölgelerinde farklı metal iyonlarını bulundursalar da Zn(II) iyonu beş sınıf içinde ortaktır. Fakat γ -CA lar Fe(II) iyonu (aynı zamanda Zn (II) ya da Co (II) iyonu), ζ -CA Cd(II) iyonu ya da Zn(II) bulundururlar (Alterio vd., 2012; Xu vd., 2008). Metal iyon koordinasyonu şematik olarak Şekil 3.1 de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çeşitli CA ailelerindeki metal iyon koordinasyonu. (A: α , γ ve δ CA lar, B: β ve ζ CA lar, C: β CA lar da görülen bir diğer durum).

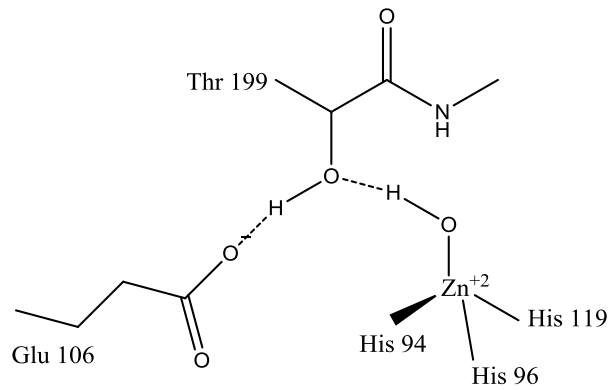
3.1.1. α -Karbonik anhidrazın katalitik mekanizması

Karbonik anhidrazlar aşağıdaki tepkimeyi katalizlerler;



Şu ana kadar araştırılan tüm α -CA'lardaki metal iyonları kataliz için oldukça büyük bir öneme sahiptir (Scozzafava vd., 2006; Smith vd Ferry, 2000). X ışını kristalografik verileri iyonun aktif bölge yarığının 15 Å içerisinde yer aldığını ve üç histidin kalıntısı tarafından koordine edildiğini göstermektedir (His94, His96 ve His119) (Thiry vd., 2006). His64, His4, His3, His17, His15 ve His10 dan oluşan histidin kümesi çevre ve aktif bölge arasında proton mekiği görevini üstlenir (Supuran vd., 2004; Supuran vd., 2003).

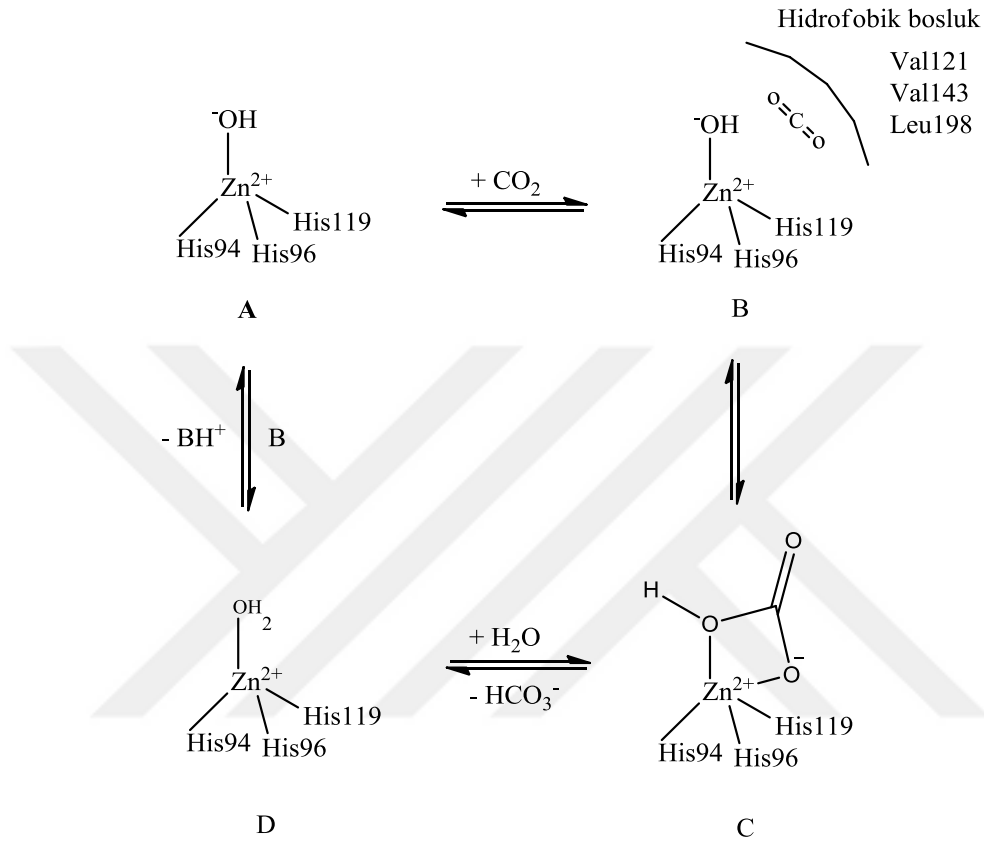
Zn^{2+} bağlı su, ayrıca, Glu106 kalıntısının karboksilat ucu ile köprü oluşturmuş olan Thr199 kalıntısının hidroksil ucuna hidrojen bağı ile bağlıdır (Şekil 3.2). Bu etkileşimler çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini artırır ve substratı (CO_2), nükleofilik atak için uygun bir konuma yönlendirir (Şekil 3.3) (Pasterokova vd, 2004; Nishimori vd., 2007).



Şekil 3.2. hCA II izoenziminin aktif bölgesindeki Zn(II) iyonunun üç histidin kalıntısı (His94, His96 ve His119) ve aktif bölgenin koruyucusu olan Thr199 ve Glu106 kalıntılarıyla koordinasyonunun şematik gösterimi.

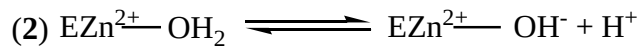
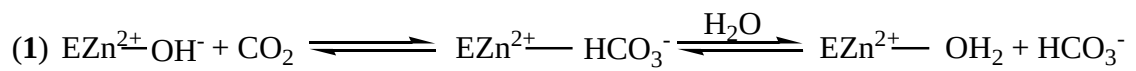
Enzimin aktif formu hidroksitin Zn(II) iyonuna bağlı olduğu temel formudur (Şekil 3.3A). Bu güçlü nükleofil, Zn(II) iyonu ile koordine olmuş bikarbonat iyonunu oluşturmak üzere (Şekil 3.3C) komşu kısımdaki hidrofobik boşlukta bağlı bulunan CO_2 molekülü ile etkileşir. (Şekil 3.3B) (İnsan CA II izoenzimi için, hidrofobik boşluktaki bu substrat bağlayıcı bölge Val121, Val143, Leu198 ve Trp209 kalıntılarından oluşmaktadır.) Bikarbonat iyonu oluştuktan sonra su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye bırakılır. Bu durumda Zn(II) iyonu su molekülü ile koordine olmuş durumdadır ve enzimin asit formu olarak bilinen yapıyı

oluşturur. Enzimi asit formu katalitik olarak inaktiftir (Şekil 3.3D) (Supuran ve Scozzavafa, 2007).



Şekil 3.3. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği CO₂-hidrasyon reaksiyonu mekanizmasının şematik gösterilişi.

Enzimin aktif formunun geri kazanılması için, aktif bölgedeki His64 gibi aminoasit kalıntıların (His64 kalıntısı CA I, II, IV, VI, VII, IX ve XII-XIV izoenzimlerinde proton mekiği olarak bilinir) veya ortamdaki tamponların yardımıyla aktif bölgeden çevresine bir proton transferi gerçekleşir. Bu süreç şematik olarak eşitlik (1) ve eşitlik (2) ile gösterilmiştir (Nishimori vd., 2007).



3.2. Fizyolojik Fonksiyonları

Birçok çalışma ile hCA'ların fizyolojik rolü ve doku dağılımı ispatlanmıştır. Bazı izoformları örneğin hCA I ve hCA II neredeyse her yerde bulunup bazı hastalıkların hedefi olabilirken, diğerleri hastalıklar için hedef dışı olabilirler. Diğer izoformları ise daha sınırlı bir dağılım gösterir. Çizelge 3.1 de neden olduğu hastalıklarla birlikte, katalitik olarak aktif izoformların, doku/organ lokalizasyonu özetlenmiştir. Bu tablonun analizinden hCA inhibitörlerinin çeşitli farmakolojik uygulamalarda kullanılabileceği gözlenmektedir (Supuran, 2008b; Hen vd., 2011; Winumvd., 2008; Thiry vd., 2008).

Çizelge 3.1. CA izoformlarının doku/organ dağılımı ve ilişkili olduğu hastalıklar.

	Organ/ Doku Dağılımı	Hücre İçi Yerleşimi	Katalitik Aktivite (CO₂ hidrasyonu)	Sülfonamit İlgisi	Dahil Olduğu Hastalık	Hedef Dışı Olan Diğer CA İzoformları
CA I	Eritrosit, Gastrointes- tinal sistem, Göz	Sitozol	Düşük	Orta	Retina/Beyin ödemi	Bilinmiyor
CA II	Eritrosit, Gastrointes- tinal sistem, Göz, Kemik osteoklastla- rı,Böbrek, Karaciğer, Testis, Beyin	Sitozol	Yüksek	Çok yüksek	Glokom, Ödem, Epilepsi, Yüksek irtifa hastalığı	CA I
CA III	İskelet kası, Adipositler	Sitozol	Çok düşük	Çok düşük	Oksidatif stres	Bilinmiyor
CA IV	Böbrek, Karaciğer, Pankreas, Göz, Bağırsak, Kalp kası,	Zara bağlı	Orta	Yüksek	Glokom, Pigmentel retinopati, Felç	CA I
CA VA	Akciğer	Mitokondri	Düşük	Yüksek	Obezite	CA I, CA II
CA VB	Kalp ve iskelet kası, Pankreas, Böbrek, Omurilik,	Mitokondri	Yüksek	Yüksek	Obezite	CA I, CA II

Çizelge 3.1. CA izoformlarının doku/organ dağılımı ve ilişkili olduğu hastalıklar (devam).

CA VI	Tükürük ve meme bezleri	Tükürük ve süt içerisine salgılanır	Düşük	Çok Yüksek	Karyojenez	CA II
CA VII	Merkezi sinir sistemi	Sitozol	Yüksek	Çok yüksek	Epilepsi	Bilinmiyor
CA VIII	Merkezi sinir sistemi	Sitozol	Katalitik değil	İlgisiz	Nörodejenerasyon, Kanser	Bilinmiyor
CA IX	Tümörler, Gastrointestinal mukoza	Membrana gömülü	Yüksek	Yüksek	Kanser	CA I, CA II
CA X	Merkezi sinir sistemi	Sitozol	Katalitik değil	İlgisiz	Bilinmiyor	Bilinmiyor
CA XI	Merkezi sinir sistemi	Sitozol	Katalitik değil	İlgisiz	Bilinmiyor	Bilinmiyor
CA XII	Böbrek, Bağırsak, Üreme epiteli, Göz, Tümörler	Membrana gömülü	Düşük	Çok yüksek	Kanser, Glukom	CA I, CA II
CA XIII	Böbrek, Beyin, Akciğer, Üreme sistemi	Sitozol	Düşük	Yüksek	Kısırlık	Bilinmiyor
CA XIV	Böbrek, Beyin, Akciğer, Göz	Membrana gömülü	Düşük	Yüksek	Epilepsi, Retinopati	Bilinmiyor

hCA I gözde, gastrointestinal sistem ve eritrositlerde bulunur. Retinal ve serabral ödem ile de bağlantısı bulunmaktadır (Gao vd., 2007). hCA II, bazı organ ve dokularda bulunan ve irtifa hastalığı, epilepsi, ödem, ve glukom gibi hastalıklarla ilişkisi olan, oldukça yaygın bir izoformdur (Mincione vd., 2008; Basnyat vd., 2003; Swenson ve Teppema, 2007). hCA III bu ailenin özgün bir üyesidir. Çünkü CO₂ hidrasyon katalizi için oldukça düşük katalitik aktiviteye sahiptir. Bu da hCA III ün bu katalizde fizyolojik rolünün olup olmadığını sorgulamaya neden olmaktadır. Bu hipotez ile uyumlu olarak birkaç çalışma adipositlerde ve iskelet kaslarındaki

yerleşimi ile ilgilidir. Bu enzimin oksidatif hasardan hücreleri korumak için oksijen radikal süpürücü gibi olası bir rolü vardır hemde yüzeyindeki sistein residüleri sayısı çok yüksektir (Roy vd., 2010). hCAIV birçok dokuda hCA II ve hCAXII ile birlikte bulunur ve antiglokom ilaçları için iyi bir hedef olduğu ispatlanmıştır (Matsui vd., 1996). Dahası retinitis pigmentosa (Datta vd., 2009) ve inme (Tang vd., 2006) de bu izoformların bulunduğu rapor edilmiştir.

Mitokondrial izoform olan hCA VA ve VB farklı doku lokalizasyonuna sahiptir. Bu lokalizasyon hCA VB için çok geniş iken hCA VA için karaciğer ile sınırlandırılmıştır. Ancak her iki izoform antiobezite ajanlarının geliştirilmesi için ilaç hedefi olarak önerilmektedir (De Simone vd., 2008; Supuran vd., 2009). CA VI aslen meme ve tükürük bezlerinde bulunur ve karyogenez ile ilgili olduğu ispatlanmıştır (Nishimori vd., 2007). hCA VII en aktif izoform olan CA II ile birlikte sınırlı bir dağılıma sahiptir, çoğunlukla bazı beyin dokularında bulunmaktadır (Nishimori vd., 2009; Hilvo vd., 2008). Bu izoformun epileptik form ile birlikte aktiviteye katkıda bulunduğu ispatlanmıştır (Hen vd., 2011). hCA VII'nin CA III gibi hücreleri oksidatif hasardan koruduğuna dair yeni çalışmalar bulunmaktadır (Del Giudice vd., 2013).

CA IX ve CA XII tümör dokularında bulunmasından dolayı tümör ilişkili protein olarak tanımlanabilir (Pastorekova ve Pastorek, 2004). Ancak CA IX sadece tümörler ile ilgili iken, CA XII ayrıca birçok normal dokuda da bulunur (Pastorekova ve Zatovicova, 2008). Her iki enzim tümörler ile olan ilişkileri nedeniyle kanser tedavisinde yeni tedavi ve teşhis araçlarının ilaç dizaynı için köklü birer hedef olmuşlardır (Monti vd., 2013).

İnsan dokularındaki izoenzim dağılımı çalışmaları kalın bağırsak, ince bağırsak ve timus da CA XIII ün bulunduğunu göstermektedir (Supuran vd., 2010). Ancak bu izoformların ana özelliği, bazı endometrial bezlerde, rahim serviksinde ve sperm hücresinin tüm gelişim aşamasında testislerde bulunmasıdır (Lehtonen vd., 2004). Çünkü normal fertilizasyonu sağlamak için üreme organlarında pH ve iyon dengesi iyi bir şekilde düzenlenmelidir. CA XIII sperm motilitesinin korunması için pH homeostazisi ve uygun HCO_3^- konsantrasyonunu sağlayarak üreme süreçlerine katkı sağladığı ileri sürülmüştür (Di Fiore vd., 2009). Böylece CA XIII ün inhibisyonu kontraseptif (doğum kontrol) ajanlarının gelişmesi için kullanılabilir (Alterio vd., 2012).

Son olarak CA XIV in bazı retinopatilerde ve epileptogenezisde bulunması nedeniyle bu tür hastalıkların tedavisinde yararlı ajanların geliştirilmesinde kullanıldığına dair veriler bulunmaktadır (Hen vd., 2011).

3.3. Karbonik Anhidraz I

1928 de Henriques kan ve hemoglobin solüsyonunun, CO₂ hidrasyon hızını önemli ölçüde arttırdığını belirtmiştir (Henriques, 1928). Bu olgu 1932 de Meldrum ve Roughton'un kandan katalitik özelliklere sahip bir miktar kan hücresi izole edene kadar hemoglobinden kaynaklandığı düşünülmekteydi. Onlar bu kan hücresini karbonik anhidraz olarak adlandırmışlardır (Meldrum ve Roughton, 1932). Daha sonraki yüzyıllarda CA'nın farklı alt türleri canlı organizmalarda tanımlanmıştır. Kırmızı kan hücrelerinde bol miktarda bulunmasından dolayı bu bilim adamlarının şu anda karbonik anhidraz I olarak adlandırılan enzimi saflaştırdıkları tahmin edilebilir. İnsan kırmızı kan hücrelerinde CA I izoformları, 150 µM yoğunluğu ve nispeten hemoglobin CA'larının her gramı için 10-12 mg bulunması ile en fazla bulunan proteindir (Lindskog, 1997; Hassan vd, 2013).

Bu enzimin birincil sekansı 1972 ve 1974 arasında aydınlatılmıştır (Deutsch, 1987; Andersson ve Nyman 1972). 1990 da Lowe ve arkadaşları (Lowe vd, 1990) CA I geni kodlanmasının q22 bölgesinde kromozom 8 üzerinde yer aldığını ve CA II ve III kodlayan genler ile birlikte 180 kilobaz çift (kbp) dizide paklendiğini keşfetti (Lindskog, 1997). Bu üç lokusun yakınlığına rağmen, CA'nın ilgili izoformlarının farklı doku lokalizasyonu gösterdiği ve farklı ekspresyon süreçlerine tabi olduğu kanıtlanmıştır (Hassan vd, 2013). Özellikle CA I geninin transkripsiyonunun CA II ve III ün zıt yönünde gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Lindskog, 1997).

3.3.1. Farmakolojik hedef olarak CA I

CA enzimleri birçok hastalık için geçerli ve çekici bir ilaç hedefi olmuştur. Çünkü bu proteinin anormal seviyeleri sayısız semptomla direkt olarak etkilidir. Tıbbi kimya açısından CA'ların, orta büyüklükte tek zincirli protein olması, laboratuvar koşullarında stabil olma, geniş kullanımlarda uygun maliyet, bilinen tüm izoenzimlerin birincil yapısının bilinmesi, neredeyse bütün hCA izoenzimlerinin üç boyutlu yapısının bulunabilirliği, katalitik mekanizmasının aydınlatılması ve metal kofaktörlerine bağlı bileşiğin inhibisyon mekanizmasının anlaşılabilirliğinden dolayı, ilaç keşfi için uygun bir hedef olarak kapsamlı bir şekilde faydalanılmıştır (Krishnamurthy vd., 2008).

CA I yaygın olarak kırmızı kan hücrelerinde ve bağırsaklarda bulunmasına rağmen, bu izoform hala 'yetim hedef' olarak göz önünde bulundurulmaktadır. Ancak birçok kanıt, CA I in farklı patolojik süreçlerde yer aldığını göstermiştir. Örneğin, eritrositlerde CA I aktivitesinin azalması kronik asit zehirlenmesi ve aneminin bazı tipleri ile ilişkilidir (Gambhir vd., 2007).

Gao ve arkadaşları aşırı retina vasküler geçirgenliğinin, diyabetik maküler ödeme ve hücre dışı ortamda yüksek CA I seviyesinin artışının proliferatif diyabetik retinopati gibi göz hastalıklarını teşvik eden bir durum olduğunu ispatlamışlardır (Gao ve Rook, 2007; Alterio vd., 2012). Ayrıca, Hem kan-retinal hem de kan-beyin bariyerlerinde yüksek hücre dışı CA I seviyesi vazojenik ödem oluşturabilir (Gao ve Rook, 2007). Gastrointestinal yolla ilgili olarak da kolonik epitel hücrelerinde CA I in düşük seviyesinin kolorektal kanserin tahmini için özel bir belirteç olduğunu rapor etmişlerdir (Supuran ve Scozzafava, 2000). Bol miktarda eksprese edilmesine rağmen diğer gastrointestinal yollarda ve ayrıca karaciğer ve pankreasda da CA I in fonksiyonları hakkında bilgiye ulaşılamamıştır (Maren, 1967; Sly ve Hu, 1995). Son zamanlarda, Takakura ve arkadaşları, plazma örnekleri ile CA I peptit fragmentlerinin, prostat kanseri hastalarda sağlıklı kişilere oranla daha yüksek seviyede olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu proteinin aşırı ekspresyonunun, prostat kanseri hücrelerinde artmış bir CA I üretimi ve salınımı ile sıkı şekilde ilişkili olduğu hipotezini ileri sürmüşlerdir ve bu yüzden CA I plazma seviyesinin saptanmasının, prostat kanseri için potansiyel bir biyolojik belirteç olarak düşünülebileceğini savunmuşlardır (Takakura vd., 2012). Ayrıca CA I farklı proliferatif koşullarla örneğin von Hippel-Lindau tümörü, polikistik böbrek hastalıkları, asinar-duktal pankreatik karsinoma, otoimmün/sebebi bilinmeyen kronik pankreatit gibi hastalıklarda CA II ve IV ile ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple bu hastalıklardaki rolü dikkatli bir şekilde araştırılmalıdır (Supuran vd., 2003). Üstelik Chang ve arkadaşları anklioza spondilit den etkilenen hastalarda sinoviyal zarda CA I ekspresyonunun önemli derecede arttığını gözlemlemişlerdir. Bu durum kronik iltihaplı eklemler ve kemik oluşumu ile karakterize edilmiştir. CA I artmış hidrasyon iyonu ve CaCO_3 oranından sorumludur. CA I in aşırı ekspres edilmesi uygun olmayan minaralizasyona neden olabilir (Chang vd., 2012).

Diğer bir yandan CA I in daha düşük seviyesinin de patolojik süreç ile ilgisi var gibi görünmektedir. Örneğin tip II diyabet hastalarının eritrositlerinde CA I in düşük seviyede bulunduğu ispatlanmıştır. Bu durum metal bağlı su molekülü ve ortam arasında proton transfer sürecini hızlandırarak kataliz hızını arttıran CA I aktivatörleri tarafından desteklenen aktivite artışına yarar sağlayabilir (Gambhir vd., 2007). Sonuç olarak güçlü ve seçici CA modulatorlerinin (aktivatör/inhibitör) geliştirilmesi beklenmektedir.

3.4. Karbonik Anhidraz II

CA II, karbonik anhidrazın mükemmel bir izoformudur. Çünkü CA II baskın fizyolojik fonksiyonu ile 80 yıldan daha uzun bir süre önce ilk keşfedilen kırmızı kan hücresi izoformudur (Neri ve Supuran, 2011; Supuran, 2012). Sonradan, CA II'nin omurgalıların organ, doku ve

hücrelerinde bol bulunan sitozolik bir izoform olduğu bulunmuştur (Supuran, 2011b). Bunlar arasında insan CA II üretilen dokulardan akciğere karbondioksit/bikarbonatın dönüşümüne dahil edildi. Çünkü kanda oldukça bol bulunur ve CO₂ nin bikarbonat ve protona dönüşümü için oldukça yüksek katalitik aktivite gösterir ($k_{cat} = 1,40 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ve $k_{cat}/K_M = 1,50 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 20 °C ve pH 7,5) (Supuran, 2012). İnsanlar toplamda 0,2 mM kadar yüksek bir konsantrasyona sahip CA I ve CA II ye sahiptirler (Ridderstråle vd., 2002). Ancak hCA I'in katalitik aktivitesi, hCA II ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Ayrıca hCA I'i plazmadaki bikarbonat ve klorür inhibe eder. Bu durum, bu izoformun fizyolojik fonksiyonu ile ilgili birçok soru bırakmasına neden olmuştur (De Simone ve Supuran, 2012). hCA II'ye dönülecek olursa, bu yüksek aktiviteli izoform sadece gözlerin ön odasında bikarbonat bakımından zengin humor aköz ve beyin omurilik sıvısı gibi dokularda elektrolitlerin salınımına dahil değil (Kinsey, 1953), aynı zamanda vücudun her yerinde pH ve CO₂ homeostazından sorumludur (Maren, 1967). Diğer fonksiyonları ise böbrek tübüllerinde bikarbonat resorpsiyonu ve idrar oluşumu (Maren, 1967), glukoneogenez, lipogenez ve ürogenez gibi biyosentetik reaksiyonlar (Scozzafava, 2013), kemik erimesi ve kireçlenme (Hall vd., 1991) ve muhtemelen daha birçoğu anlaşılamamış fizyolojik süreçlerdir. Aslında bir ve daha fazla dokuda bu izoformun aktivitesinin düzenlenememesinin önemli patolojik sonuçları vardır. Örneğin, 1) Aşırı humor aköz göz içine salındığında göz içi basıncının artması ile oluşan glokom (Masini vd., 2013; Mincione vd., 2009), 2) Vücutta sıvı birikiminin yönettiği, idrarla yeterince sıvının atılamamasının neden olduğu ödem. Ayrıca bu süreçte böbreklerde CA II; CA IV, CA XII ve CA XIV ile birlikte yer almaktadır (Carta ve Supuran, 2013; Supuran, 2008b), 3) Epilepsi; bu hastalığa CA II ve diğer beyin CA izoformlarının dahil edilip edilmediği anlaşılamamıştır fakat alakasız olmadıkları düşünülmektedir. (Aggarwal vd., 2013), 4) CA II'nin yalnız ya da CA IX ve XII gibi izoformlar ile birlikte aşırı eksprese edilmesi sonucu gözlemlenen kanserin bazı formları (Parkkila vd., 2009; Monti vd., 2013). CA II nin ayrıca akut dağ hastalığında (AMS) (Kayser vd., 2012), damar sertliğinde (Oksala vd., 2010) ve kemik erimesinde (Kenny, 1985) rol oynadığı görülmektedir. CA II inhibitörleri, son iki patolojinin etkinlikleri hakkında çok az sayıda çalışma bulunmasına rağmen, AMS tedavisi için kullanılmaktadır (Pierce vd., 1991; Kenny, 1985).

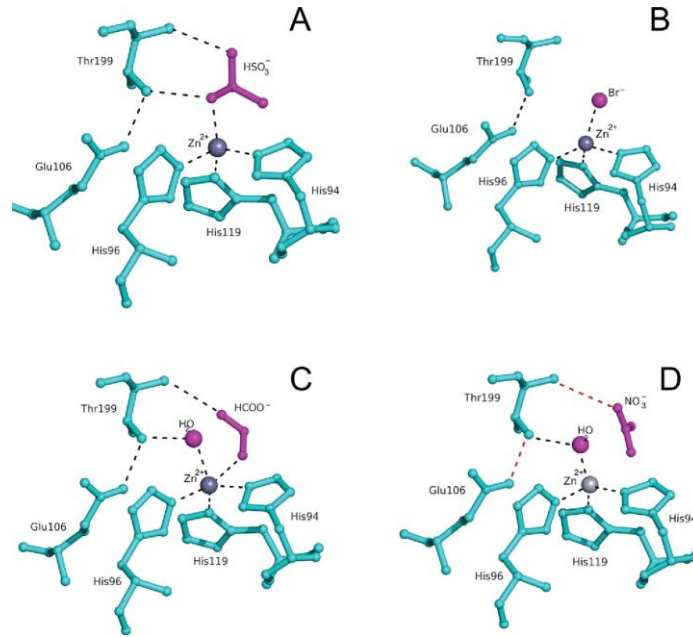
CA II çok sayıda hastalık için bir ilaç hedefidir. Bunların çoğu yukarıda belirtilmiştir. Bununla birlikte, CA II, çeşitli patolojik koşullarda, enzimin bulunduğu beyin ve beyin omurilik sıvısı (Takeuchi vd., 1997) veya gastrointestinal sistem (Pan vd., 2014) gibi organlarda görüntüleme için bir hedefir.

3.4.1. CA II inhibitörleri

Inhibitörlerle etkileşimi en fazla araştırılan izoformun hCA II olduğu vurgulanmaktadır ve şimdiye kadar birçok kinetik, spektroskopik ve kristalografik çalışmalar hCA II ile yapılmıştır (De Simone vd., 2013). Dahası şimdiye kadar tüm yeni CA inhibitörlerinin (CAI'ler) sınıfları bu izoform ile çalışılarak keşfedilmiştir.

hCA II nin aktif bölgesindeki Zn(II) iyonu üç His kalıntısı tarafından koordine edilir, dördüncü ligand bir su molekülü/hidroksit iyonudur. Metal iyonları üzerindeki pozitif yük anyonun bağlanması için itici bir güç oluşturur (Alterio vd., 2012; De Simone ve Supuran, 2012). Hem inorganik (Jönssons vd., 1993; Liljas vd., 1994) hem organik (karboksilatlar ve hidroksamatlar gibi) anyonlar CA inhibitörleri olarak rol oynarlar. Sülfonamit ve izoesterleri (sülfomatlar ve sülfamidler) de ayrıca anyonik türler olarak bağlanır (Alterio vd., 2012). hCA II nin yapısı bisülfidit (Zn(II) iyonunun tetrahedral geometrisi şekil 3.4A), bromür (Zn(II) iyonunun bozulmuş tetrahedral yapısı şekil 3.4B), format (Zn(II) iyonunun üçgen çift piramit yapısı şekil 3.4C) ve nitrat (Zn(II) iyonuna koordine edilmemiş bir inhibitör şekil 3.4D) ile kompleks oluşturmuştur. Şekil 4.2 bu tür basit inhibitörlerin bağlanma modlarının çok yönlülüğünü fark edebilmek için gösterilmiştir (Jönssons vd., 1993; Liljas vd., 1994). Normalde anyonların zayıf, milimolar hCA II inhibitörleri olduğu belirtilmelidir, ancak bunların araştırmaları önemlidir çünkü yeni CA inhibitörleri sınıflarının keşfedilmesine yol açabilirler. Örneğin son yıllarda tritiyokarbonatın (CS_3^{2-}) zayıf hCA II inhibitörü olduğu rapor edilmiş ve bunu takiben güçlü inhibitörler sınıfı olan ditiyokarbamatların (DTCler) keşfi gerçekleşmiştir (Carta vd., 2012).

Şimdiye kadar diğer hCA inhibitörleri olarak fenol (Innocenti vd., 2008), poliamin (Carta vd., 2010), sülfokumarin (Tars vd., 2013) ve kumarin türevleri bulunmuştur (Carta vd., 2012). Primer sülfonamidler ($\text{R-SO}_2\text{NH}_2$), hCA II inhibitörlerinin en çok araştırılan sınıfını temsil eder (Supuran vd., 2004). Sülfonamit grubunun CA aktif bölgesine bağlanmasından sorumlu anahtar faktörler, enzim-inhibitör komplekslerinin X-ışını kristalografisi vasıtasıyla aydınlatılmış ve CA inhibitörlerinin tasarımında bu grubun benzersiz özelliklerini açıklamak için bir gerekçe sağlamıştır (Alterio vd., 2012). İncelenen tüm komplekslerde sülfonamit türevlerinin bağlanmasının çoğunlukla bir protonu iyonlaşmış sülfonamit azotunun Zn^{2+} ile koordinasyonu ve sülfonamit grubunun Thr 199 kalıntısı ile yaptığı iki hidrojen bağı tarafından yönlendirildiği görülmüştür (Aggarwal vd., 2013; De Fiore vd., 2010).



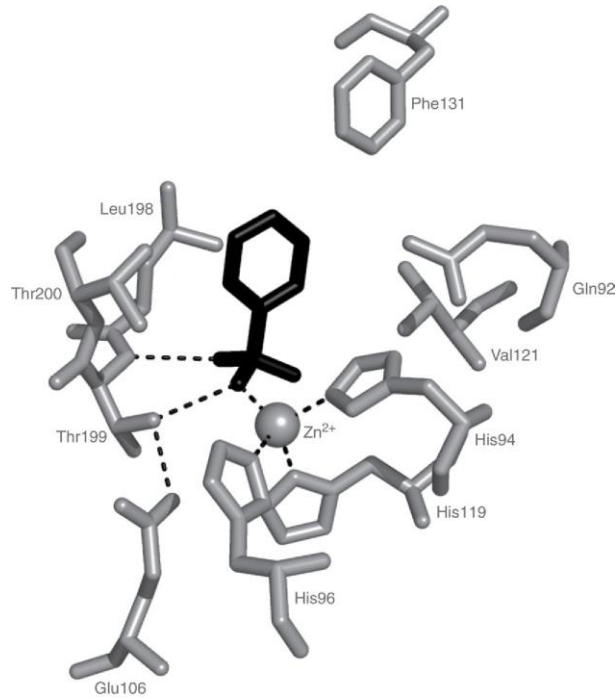
Şekil 3.4. hCA II izoenzimi ile çeşitli iyonların oluşturduğu yapılar (Supuran vd., 2015).

Çok sayıda çalışma sülfonamid grubunun CA aktif bölgesinin ideal bir ligantı olduğunu vurgular. Çünkü bu sınıf inhibitörlerde pozitif yüklü çinko iyonu ile negatif yüklü bir protonu iyonlaşmış azot bir araya gelir. Koordine azot atomunda bir protonun varlığı, bu azotla güçlü bir hidrojen bağı oluşturan Thr199OG1 atomunun hidrojen bağı alıcısı karakterine uymaktadır. Ancak sülfonamid türevlerinin CA aktif bölgesi ile etkileşiminde sülfonamid grubunun kendisinin oynadığı baskın rol ayrıca bazı olumsuz etkileri de bünyesinde barındırır. Gerçekten de R süstitüentinin doğasından kaynaklanan bağlanma termodinamiğindeki herhangi bir değişiklik, enzim-inhibitör afinitesi üzerinde küçük bir etkiye sahip olabilir ve sonuç olarak çok dikkatli bir deneysel tasarım gerektirir. Aslında çoğu primer sülfonamidler, güçlü hCA II inhibitörü özellikleri göstermektedir (Supuran vd., 2003; Supuran, 2011b). R parçasının doğasına bağlı olarak, aktif bölgenin hidrofilik ve/veya hidrofobik bölgeleriyle etkileşimi, ilave maddeyi stabilize ya da destabilize eder ve farklı inhibisyon kalıplarına sahip bileşiklere yol açar, oldukça basit aromatik sülfonamid olan benzosülfonamidin hCA II ye bağlanması Şekil 3.5 de gösterilmiştir (Alterio vd., 2012). Sülfamatlar ve sülfamidler, sülfamoil grupları ile izosterik çinko bağlama işlevleri içerirler ve sülfonamidlerle çok benzer şekilde hCA II'ye bağlanırlar (Winum vd., 2008). Sülfonamidler 60 yıldan uzun bir süredir CA inhibitörleri olarak klinikte kullanılmaktadırlar.

3.5. Antiglokoma Ajanları Olarak Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

3.5.1. Birinci nesil inhibitörler

Glokom göz hastalıklarının bir grubunu kapsayan bir terimdir, bunların ortak bir özelliği, artmış IOP'den kaynaklandığı düşünülen bir optik nöropati oluşumudur.

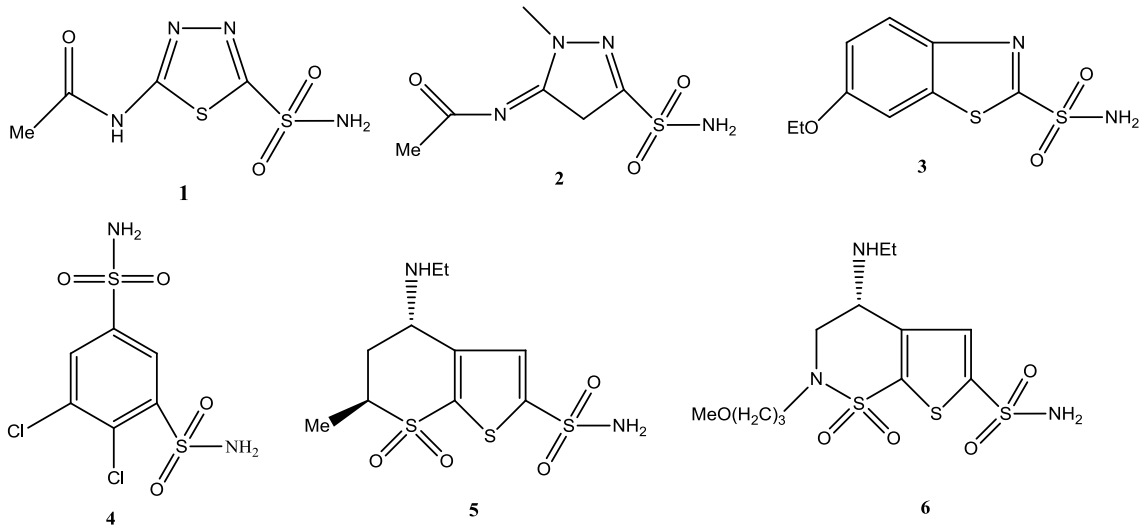


Şekil 3.5. Benzenesülfonamid bileşiğinin hCA II aktif bölgesi ile etkileşimi (Supuran vd., 2015).

Glokom, yüksek IOP ile bağlantılı olarak optik sinir başının ve görme alanı kaybının değişmesine yol açar. Glokomun önlenmesi ve geri döndürülemez görme kaybına yönelik tedavi stratejileri, topikal olarak etki eden veya sistemik hipotansif (düşük tansiyonlu) ilaçlar kullanılarak IOP'nin azaltılmasına dayanır (Masini vd., 2013; Mincione vd., 2009).

Asetazolamid **1**, metazolamid **2** ve etokzolamid **3** gibi heterosiklik sülfonamidler ve ek olarak aromatik bileşik diklorfenamid **4**, klinik olarak kullanılan CA inhibitörlerinin ilk jenerasyonunu temsil eder (Scozzavafa ve Supuran, 2014). Bu inhibitörler şu anda insanda bilinen 15 CA izoformunun hepsinde güçlü bir inhibisyon gösterirler. Klinik uygulamalarda daha az kullanılan etokzolamid hariç asetazolamid, metazolamid ve diklorfenamid sistemik CA inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Onlarca yıl önce keşfedilmiş olmalarına ve bir dizi yan etkileri olmalarına rağmen, ağırlıklı olarak antiglokom ilacı olarak kullanılmaktadırlar (Carta ve Scozzavafa, 2012).

Sistemik inhibitörler, birçok glokom oluşumunda artan IOP'yi azaltmada faydalıdır, çünkü, bu inhibitörler, glokomun en etkili fizyolojik tedavisini temsil etmektedirler. Ancak siliyer proses enzimlerini inhibe ederek, azaltılmış bir bikarbonat ve aköz humor salgısı elde edilir ve bu da IOP'nin % 25-30 oranında azalmasına neden olur. Bununla birlikte, yukarıda sözü edildiği gibi, bu bileşikler, tüm CA izoformlarının güçlü inhibitörleridir, yani göz dışında başka dokularda da mevcut olan çeşitli CA izoenzimlerinin inhibisyonuna neden olmalarından dolayı birçok yan etkiye sahiptirler.



En belirgin olanları uyuşma ve eller ve ayakların karıncalanması, metalik tat, depresyon, yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı, libido azalması, gastrointestinal tahriş, metabolik asidoz, böbrek taşı ve geçici miyopidir. Sonuç olarak, hasta uyumluluğu nedeniyle kullanımlarında kısıtlamalar bulunmaktadır. Bununla birlikte, asetazolamid ve diklorfenamid, günümüzde, adrenerjik antagonistlere veya prostaglandin analoglarına cevap vermeyen glokom tedavisinde kullanılan bileşenler arasındadırlar (Masini vd., 2013; Carta vd., 2012).

3.5.2. İkinci nesil inhibitörler: topikal olarak etkili sülfonamidler

CA inhibitörü olan topikal sülfonamidi doğrudan göz içine uygulama fikri, 1950'lerde Becker tarafından ele alınmıştır. Klinik olarak kullanılan bileşikler (1-4) deney hayvanlarının gözleri içine süspansiyon olarak uygulandığında negatif sonuç vermiştir ve sülfonamid CA inhibitörlerinin sistemik yolla antiglokom ilaçları olarak etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Becker, 1955). Birinci nesil sülfonamid CA inhibitörlerinin topikal yolla etkinliğinin olmaması, ilacın CA'ların bulunduğu siliyer süreçte ulaşamamasının göstergesidir (Maren, 1983). Kornea

yoluyla yetersiz ilaç penetrabilitesi, sülfonamidlerin (1-4) bu tür bir uygulama yolu için uygunsuz fizikokimyasal özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır.

1983 de Maren ve arkadaşları (Maren, 1983) nispeten dengeli lipid çözünürlüğüne ve yeterince güçlü hCA II inhibitörü özelliğine sahip, suda çözünebilen bir sülfonmidin topikal yolla etkili etkili bir IOP düşürücü olacağını öne sürdü. Fakat o zaman da, bu bileşik sınıfın biyoorganik kimyası keşfedilmediğinden, bu özelliklere sahip hiçbir inhibitör mevcut değildi (Supuran vd., 2004). Suda çözünür sülfonamid CA inhibitörleri daha sonra birkaç laboratuarda geliştirilmeye başlandı ve 1995 yılında ilk bu tür farmakolojik ajan olan dorzolamid (5), % 2 göz damlası olarak Merck tarafından klinik kullanım için piyasaya sürülmüştür. İkinci olarak yapısal olarak ilişkili olan brinzolamid (6) Alcon laboratuvarlarında keşfedilmiştir ve 1999 da glokomun topik tedavisi için onaylanmıştır (Sugrue, 2000). Bu iki bileşik şu anda bile topikal olarak CA inhibitörü olarak kullanılmaktadır.

Dorzolamid (5) ve brinzolamid (6) nanomolar seviyede hCA inhibitörleridir (1,2), ancak onlar diğer hCA izoformlarını da önemli derecede inhibe eder (Pinard vd., 2013). Bu bileşikler suda iyi çözünürler ancak, korneaya nüfuz etmek için ise yeterince yağda çözünürdürler ve topikal olarak göz içine doğrudan % 2 lik su çözeltisi veya günde iki kez % 1 lik süspansiyon olarak verilebilirler (Maren vd., 1983; Sugrue, 2000). Bu iki ilaç IOP yi düşürmede etkilidir ve sistemik olarak uygulanan ilaçlar ile birlikte az bir yan etkiye sahiptirler. Gözlerde batma, yanma ve kızarma, bulanık görme, kaşıntı ve acı tat gözlenen yaygın yan etkilerdir (Mincione vd., 2009). Son yan etki hariç hepsi muhtemelen dorzolamid'in zayıf bir bazın tuzu olarak çok kuvvetli bir asit ile verilmesinden dolayı ilaç solüsyonunun pH'sının oldukça asidik olmasından kaynaklanmaktadır (genellikle pH 5,5).

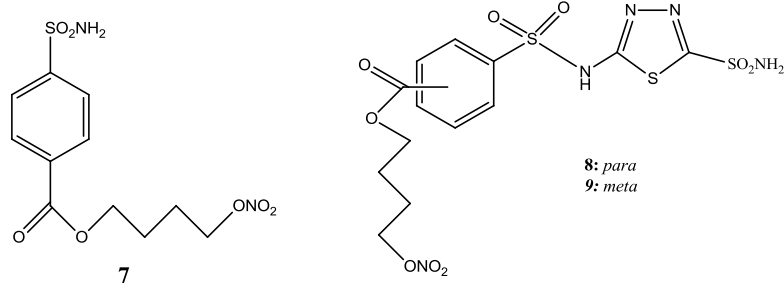
Yukarıda bahsedilen son yan etki muhtemelen, orofarenks (ağız boşluğu arasındaki bölüm) içine akan ilaç yüklü gözyaşı sıvısından ve tükürükte ve damak tomurcuklarında mevcut olan CA'nın inhibisyonunun kaynaklanmaktadır. Brinzolamid, dorzolamid ile karşılaştırıldığında daha az batma hissi verir, fakat daha bulanık görmeye neden olur. Ne yazık ki dorzolamid zaten kornea problemleri olan hastalarda böbrek rahatsızlıkları, iştahsızlık, depresyon, bunama ve geri dönüşümsüz kornea rahatsızlıkları bazı ciddi yan etkiler gösterir (Mincione vd., 2009). Günümüzde dorzolamid ve brinzolamid glokom tedavisinde kullanılan başlıca CA inhibitörleri olsalar bile yan etkilerinden dolayı yeni inhibitörlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

3.5.3. Üçüncü nesil inhibitörler

İyi bir suda çözünürlük ve IOP düşürücü etkileri olan yeni tür sülfonamid CA inhibitörleri (hCA II'yi hedef alan) elde etmek için 1999'da "Kuyruk yaklaşımı" rapor edilmiştir (Scozzafava vd., 2002). Suda çözünen işlevsellikleri, amino, imino veya hidroksil türevleri içeren aromatik/heterosiklik sülfonamid moleküllerine eklenmesinden oluşur.

Kuyruk yaklaşımı ile hazırlanan bileşikler, dorzolamide kıyasla, tavşanlarda topikal IOP düşürme etkilerinin iki ila üç kat daha etkili olduğunu göstermiştir. Suda iyi bir çözünürlüğe, düşük nanomolar aralıkta hCA II ve IV'e karşı inhibisyona, kornea yoluyla iyi nüfuz etmeye ve çok iyi bir IOP düşürücü ve tavşanlarda hem normotensif hem de glokomatöz özelliklere sahiplerdir (Scozzafava vd., 2002). Daha da önemlisi, bu etki, dorzolamidin benzer etkisine kıyasla, uzun bir süre devam etmektedir.

Ancak, kuyruk yaklaşımının, bileşiklerin çeşitli sınıflarına ait geniş bir CA inhibitörü aralığı elde etmek için genel ve çok yönlü bir yöntem olduğu kanıtlandı (De Simone vd., 2013). En ilgi çekici uygulamaları hibrit antiglokom ilaçlarının, sülfonamid kısımlarının yanı sıra ikinci bir farmakofor olarak NO veren gruplar veya prostaglandin PGF2alfa analogları sentezi ile ilgilidir.



NO, nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) tarafından üretilen radikal bir gazdır ve ayrıca vazodilatasyon, göz içindeki aköz humor salınımı, göz kan akışının lokal modülasyonu ve apoptoz ile retina gangliyon hücresi ölümünde yer alır. Bir hibrid ilaç molekülünde, bir sülfonamid CA inhibitörü ve NO'yu vermeyi mümkün kılan bir kısmı birleştirmek oldukça ilgi çekiciydi. Bu şekilde, son birkaç yıl içinde NO verici özelliklere sahip çok sayıda sülfonamid yayımlanmıştır ve 7-9 bunlara birer örnek teşkil eder (Fabrizi vd., 2012).

4. MATERİYAL VE METOD

4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

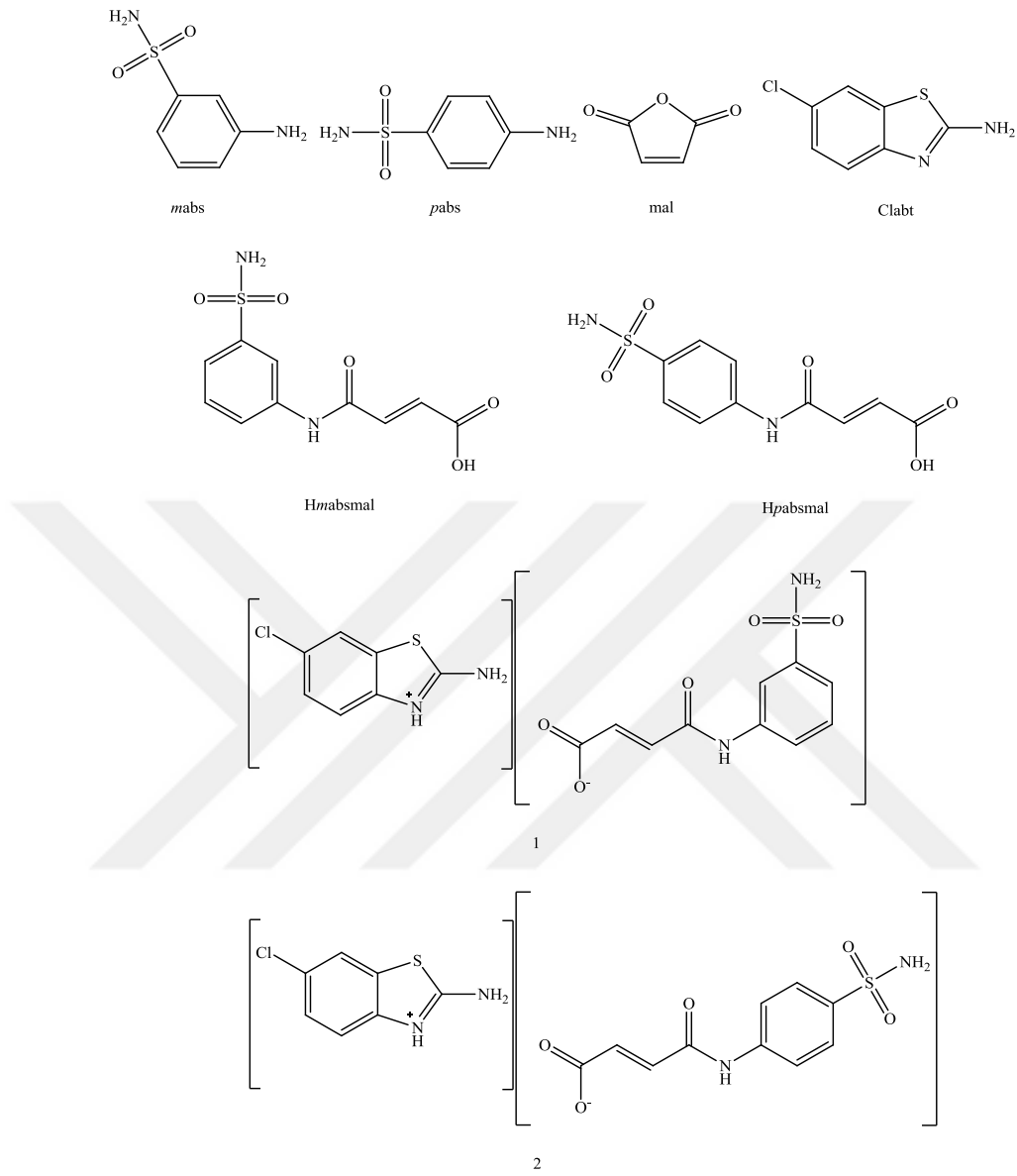
Tez çalışması için kullanılan siyanojen bromür ile aktive edilmiş sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, tris(hidroksimetil) aminometan (TRİS), sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum hidrojen fosfat, sodyum barbitat, sodyum bikarbonat hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, akrilamid, sülfürik asit, , N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brilliant blue G-250 ve R-250, sodyum hidroksit ve karbon dioksit gazı Merck ve Sigma Aldrich firmalarından temin edilmiştir.

İnhibisyon çalışmalarında kullanılan, fakültemiz kimya bölümü anorganik kimya laboratuvarında Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA ve Yrd. Doç. Dr. Halil İLKİMEN tarafından sentezlenen bileşiklerin formülü Şekil 4.1' de, isimleri de Çizelge 4.1' de verilmiştir.

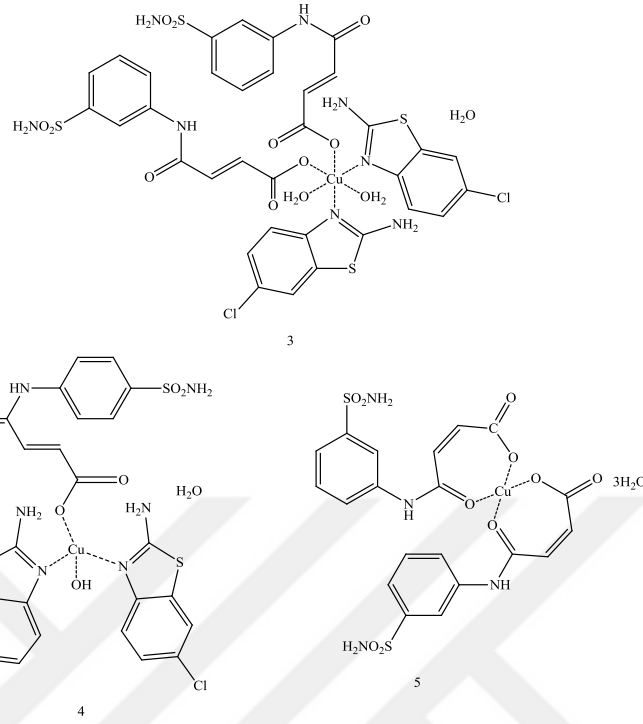
4.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıda belirtilen alet ve cihazlardan faydalanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Biyokimya Laboratuvarında bulunmaktadır.

Spektrofotometre:	Shimadzu UV-1700 Pharma Spec
Soğutmalı Santrifüj:	Sigma K30
Santrifüj:	Nüve NF800
pH metre:	WTW
Peristaltik Pompa:	Ismatec MS-4/8 Reglo Digital
Magnetik Karıştırıcı:	Heidolph MR 3001
Vorteks:	Vortex-Genie, Heidolph (modeline bak)
Hassas Terazî:	Ohaus-Adventurer
Otomatik Pipetler:	Biohit Proline
Elektroforez Sistemi:	WEALTEC Elite 300



Şekil 4.1. Çalışmalarda kullanılan bileşikler.



Şekil 4.1. Çalışmalarda kullanılan bileşikler (devam).

Çizelge 4.1. Çalışmalarda kullanılan bileşiklerin isimleri ve verilen kısaltmaları.

Kısaltma	Bileşiğin Adı
<i>mabs</i>	3-aminobenzensülfanilamit
<i>pabs</i>	4-aminobenzensülfanilamit
<i>mal</i>	Maleik anhidrit
<i>Hmabsmal</i>	(E)-4-okso-4-((3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoik asit
<i>Hpabsmal</i>	(E)-4-okso-4-((4-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoik asit
<i>Clabt</i>	2-amino-6-klorobenzotiyazol
1	2-amino-6-klorobenzotiyazol-3-yum (E)-4-okso-4-((3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoat
2	2-amino-6-klorobenzotiyazol-3-yum (E)-4-okso-4-((4-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoat
3	Diakuabis(2-amino-6-klorobenzotiyazol)bis((E)-4-okso-4-((3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato)bakır(II) hidrat
4	bis(2-amino-6-klorobenzotiyazol)hidrokso((E)-4-okso-4-((4-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato)bakır(II) hidrat
5	bis((E)-4-okso-4-((3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato-O,O')bakır(II) trihidrat

4.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

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 Tris, 950 mL saf suda çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH 7,4'e kadar titre edildi, hacim saf su ile 1L ye tamamlandı.
2. 0,2 M NaHCO₃, pH 8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO₃, 950 mL saf suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH 8,8'e kadar titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L ye tamamlandı.
3. 0,0025 M Veronal tamponu (hidrataz aktivitesi ölçümleri esnasında kullanılan tampon): 5,15 g sodyum barbital 950 mL saf suda çözülüp, pH 8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titre edildikten sonra hacim saf su ile 1 L ye tamamlandı.
4. 25mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄, pH 8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 950 mL saf suda çözülüp 1 N HCl ile pH 8,7'ye kadar titre edildikten sonra hacim saf su ile 1L ye tamamlandı.
5. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH 8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 mL saf suda çözülüp, 1 N HCl ile pH 8,7'ye kadar titre edildikten sonra hacim saf su ile 1L ye tamamlandı.
6. İzoenzimlerin elüsyonu için gerekli çözeltiler;
 0,025 M Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH 6,3 (kolona tutunmuş hCA I izoenzimin elüsyonu için kullanılan tampon): 8,875 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl 200 mL saf suda çözülüp 1N HCl ile pH 6,3'e kadar titre edildikten sonra hacim saf su ile 250 mL ye tamamlandı.
 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄, pH 5,6 (kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 9,187 g NaClO₄ ve 2,09 g NaCH₃COO.H₂O, 120 mL saf suda çözülüp 1 N HCl ile pH 5,6'ya getirildikten sonra, hacim saf su ile 150 mL ye tamamlandı.
7. SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponu: 0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 3 mL %1'lik SDS, 1 mL %100 lük gliserin ve 1 mL %0,1 lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacmin saf su ile 10 mL ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde merkaptotanol ilave edildi.

8. SDS- Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu: 1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %1'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL ye tamamlandı.

9. CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0 °C de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

10. 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 100 mL %95 lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf su ile 1 litreye tamamlandı.

11. Boyama çözeltisi (SDS-elektroforezde 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.

12. Yıkama çözeltisi (SDS-elektroforezde jelin yıkanması için kullanılan çözelti): %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

13. Sabitleştirme çözeltisi (SDS-elektroforezde jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

14. İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen (1)-(9) bileşiklerinin %1 lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5 er mg alınıp 5 mL dimetilsülfoksitde (DMSO) çözüldü.

15. %0,04 lük brom timol mavisi çözeltisi (hidrataz aktivitesi tayininde kullanılan çözelti): 0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra, hacminin saf su ile 250 mL ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

4.4. Yöntemler

4.4.1. Protein tayini

Kalitatif protein tayini

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

Bradford 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 absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde; 1 mL sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin 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 brilliant blue G-250 reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm de 3 mL lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL coomassie brilliant blue G-250 reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi. (Şekil 5.2)

4.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

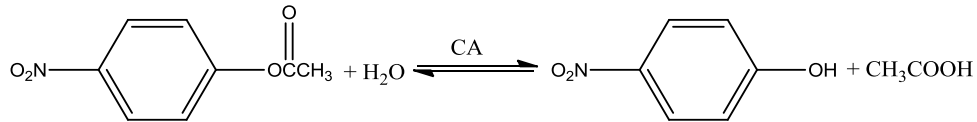
CO₂-Hidrataz aktivitesi tayini

Aktivite tayini Wilbur-Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂ in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH ın 8,2 den 6,3 e düşmesi için geçen süre pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da pH ı 8,2 olan veronal tamponu kullanıldı (Wilbur ve Anderson, 1948; Maren, 1960). Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c ye bölünmesi ile belirlendi.

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,1 mL brom timol çözeltisi, 0,5 mL su, 0,1 mL enzim çözeltisi ve 2,5 mL doymun CO₂ çözeltisi konuldu. İndikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönmesi için geçen süre ölçüldü(t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t₀). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi 4,2 mL de sabit tutulmuş oldu. Bu yönteme göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyon 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.

Esteraz aktivitesi tayini

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz (esterleri hidrolizleme) aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, 348 nm de absorbans veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolat'a hidroliz etmektedir.



348 nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat'ın her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong vd., 1966; Kandel vd., 1970; Landolfi vd., 1997). Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatın da bu dalga boyunda çok az absorpsiyonu olduğundan kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvarz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulup 25°C de 348 nm de 3 dakika süresince absorbansdaki değişim kaydedildi. 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-nitrofenil asetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine o miktarda inhibitör eklenip aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitrofenil asetat (substrat) çözeltisi taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL saf suya yavaş yavaş eklendi. Bu çözelti 3 mM lık olup, daha derişğini hazırlamak esterlin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Armstrong vd., 1966). Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris- SO_4 (pH 7,4) çözeltisiyle yapıldı (Kohn ve Wilchek, 1978).

4.4.3. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B üzerine tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir

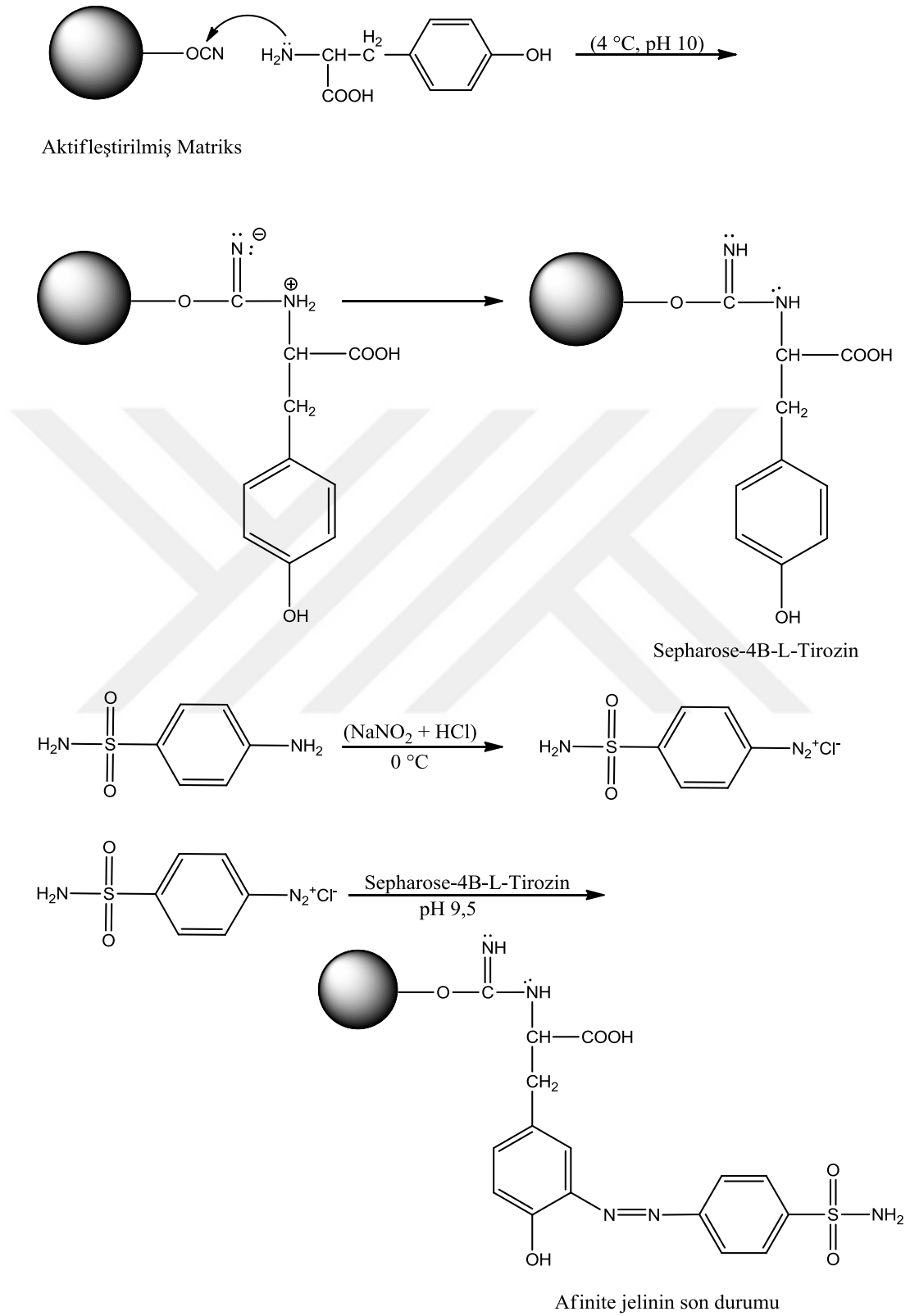
inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına katılarak söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır (Kohn ve Wilchek, 1978).

Siyanojen bromür ile aktifleştirilmiş sepharose-4B üzerine tirozin takılması

7,5 g CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B saf su ile iyice şişirildi ve saf su dekante edildi. Daha sonra pH 10 olan 250 mL NaHCO_3 tamponuna alındı. Aynı tamponun 20 mL sinde 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Bu işlemten sonra süspansiyon 4°C de iki saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat bu sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm de absorbans vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO_3 tamponu ile (pH 8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL si içerisine alındı (Arslan vd., 1997; Laemmli, 1970).

Sülfanilamid kenetlendirilmesi

25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO_2 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 değerine ayarlanarak sabit tutuldu. Üç saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris- SO_4 (pH 7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Cuatrecasas, 1970). Afinite jelinin hazırlanması esnasında gerçekleşen reaksiyonlar Şekil 4.2 de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Afinite jelinin hazırlanması.

4.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve hCA II enzimlerinin saflaştırılması

Hemolizat eldesi

Kullanılacak kan, antikoagulantlı kan torbasına alındıktan sonra 4 °C de muhafaza edildi ve en çok iki gün içerisinde kullanıldı. Eritrositleri ayırmak için kan 10 mL lik tüplere konuldu ve 2500 rpm de 15 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, 2500 rpm de 15 dk santrifüjlenip, üstteki kısımlar atıldı. Eritrositler 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'ı katı Tris ile 8,7 ye ayarlandı. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi (Rickli vd., 1964).

Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1,5cm²x50cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 25mM Tris-HCl/0,1M Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile dengelendi. Yukarıda tarif edildiği şekilde hazırlanan hemolizat kolona tatbik edildi. Hemolizatın kolona tatbiki bittikten sonra 25mM Tris-HCl/25mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. Yıkama işlemine 280 nm de köre karşı 0,05 absorbans değerine ulaşıncaya kadar devam edildi. Burada kör olarak yıkama tamponu kullanıldı. Yıkama işlemi sonucunda kolona tutunmuş olan karbonik anhidraz izoenzimleri dışındaki tüm safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra hCA I ve hCA II izoenzimlerinin elüsyonu için sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH 6,3) ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltileri kolondan geçirildi (Rickli vd., 1964). Elüatlar beşer mL lik fraksiyonlar halinde tüplere toplandı. Elüatlarda 280 nm de protein tayini ve CO₂-hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Aktivite gösteren fraksiyonlara diyaliz işlemi uygulandı.

Diyaliz işlemi

Biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir. Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının gözenekleri genellikle molekül ağırlığı 10.000 Da dan daha fazla olan makro moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle,

diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Dengeye ise çalışılan hacme 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 işlemi 1-2 gün sürdürülebilir (Temizkan ve Arda, 2004).

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (selofan, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Gözenek 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 (Temizkan ve Arda, 2004).

Çalışmamızda kolondan elüe edilen enzim çözeltileri diyaliz torbalarına doldurulmuş ve 4 °C de diyaliz tamponu kullanılarak diyaliz işlemi yapılmıştır. 24 saat boyunca işleme devam edilmiş ve her 4 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilmiştir. Diyaliz işlemleri sonucu elde edilen enzim saf hale getirilmiştir. Diyaliz sonucunda elde edilen enzim çözeltisi, *in vitro* inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere üçer mililitrelik tüplere konmuş ve -20 °C de derin dondurucuda depolanmıştır.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Elektroforez işlemi için %12' lik ayırma jeli ve %3,75' lik yığma jeli hazırlandı. Ayırma jeli; 3,15 mL su, 3,75 mL 1,0 M TRIS-HCl (pH 8,8), 3,00 mL %40 akrilamid, 100 µL %10 SDS, 100 µL %10 amonyum persülfat ve 6 µL TEMED karıştırılarak hazırlandı. Daha sonra cam plakalar arasına döküldü ve üzerine 1,0 mL 2-propanol ilave edildi. Jel katılaştıktan sonra 2-propanol akıtıldı.

Yığma jeli; 2,33 mL su, 375 µL 1,0 M TRIS-HCl (pH 6,8), 281 µL %40 akrilamid, 30 µL %10 SDS, 30 µL %10 amonyum persülfat ve 5 µL TEMED karıştırılmak suretiyle hazırlandı. Karışım ayırma jeli üzerine döküldü ve tarak yerleştirildi. Jel katılaştıktan sonra tarak yavaşça çıkartıldı.

Kuyulara yüklenecek numuneler 20 µg protein içerecek şekilde hazırlandı ve 30 µL olarak yüklendi. 30 µL' lik her bir numune için 5 µL numune yükleme çözeltisi kullanıldı ve 90 °C de 5dk. boyunca denatüre edildi. Bu işlemden sonra numuneler 12000 rpm de 10 sn. santrifüj

edildi ve kuyulara yüklendi. İki saat süreyle, 100 V' luk akım uygulandı. Daha sonra jel, boyama çözeltisine alınarak yaklaşık 2 saat çalkalandı. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jel şeffaflaşmaya kadar yıkama çözeltisinde bekletildi. Son olarak bantların fotoğrafı çekildi (Şekil 5.3) (Laemmli, 1970).

4.4.5. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 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 hCA I ve hCA II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı. Tablo ve grafiklerde verilen [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 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 IC_{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 absorbsiyon sabiti (ϵ) $5,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dir. p-nitrofenil asetatın molar absorbsiyon sabiti ise $0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbans degerinin 5 değerine bölümü ortamdaki p-nitrofenol (p-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir (Armstrong vd., 1966).

$$p\text{-nitrofenol konsantrasyonu (M)} = \text{Okunan absorbans degeri} / 5 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$p\text{-nitrofenol konsantrasyonu (mM)} = \text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre 1 dakikada oluşan p-nitrofenol miktarını bulmak için 3'e bölünür. Toplam hacim 3 mL olduğuna göre 1 dakikada oluşan p-nitrofenol miktarı şu şekilde bulunur:

$$\begin{aligned} p\text{-nitrofenol miktarı} &= ((\text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ mM}) / 3 \text{ dakika}) \times 3 \text{ mL} \\ &= \text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)} \end{aligned}$$

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin bulunması

K_i değerlerini bulmak için eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Esteraz aktivitesi için yukarıda belirtildiği gibi;

$$p\text{-nitrofenol miktarı} = \text{Okunan absorbans değeri} / 5 \text{ (}\mu\text{mol/dakika)}$$

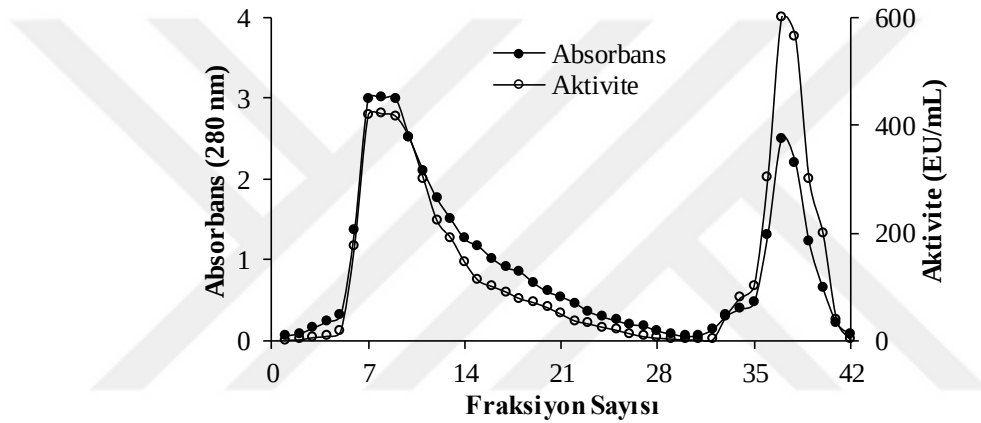
değeri, V (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver-Burk grafiklerini çizmek için bu değerler $1/V$ değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat konsantrasyonu grafikte kullanılmak üzere $1/[S]$ değerlerine dönüştürüldü. Bu değerlerden faydalanan her bir inhibitörün, hCA I ve hCA II izoenzimleri için ayrı ayrı Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden K_M ve $V_{\max}$ değerleri bulundu. Bu değerler yarışmasız inhibitörler için kullanılan aşağıdaki eşitlikte yerine konularak K_i değerleri hesaplandı.

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

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Afinite kolonunun dengelenmesi, insan kanından elde edilen hemolizatin kolona tatbik edilmesi ve yıkama işlemlerinden sonra hCA I izoenzimi 0,025 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl (pH 6,3) tamponu ile, hCA II izoenzimi 0,1M CH_3COONa /0,5 M NaClO_4 (pH 5,6) tamponu ile kolondan elüe edildi. Elüatlar beşer mililitrelik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm de kalitatif protein tayini yapıldı (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılmasına ilişkin grafik.

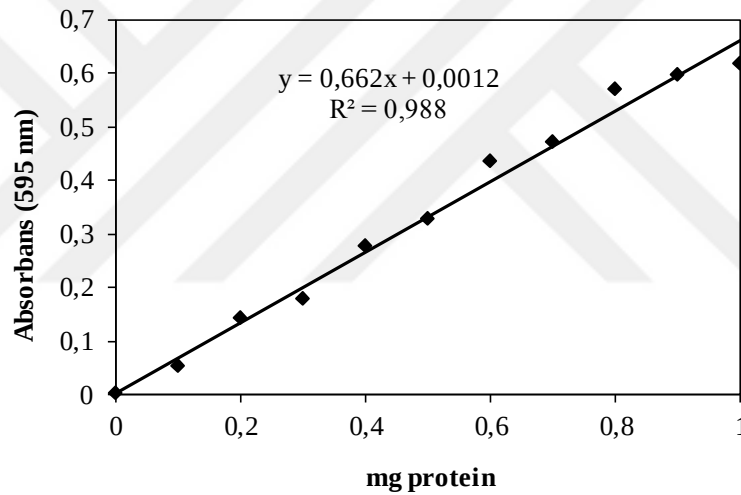
Saflaştırılan fraksiyonlarda spesifik aktivite ölçümü yapıldı. Sonuçlar Çizelge 5.1' de verilmiştir.

Çizelge 5.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar.

Saflaştırma Basamağı	Aktivite (EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	125,16	100,0	18,24	1824	12516	6,86	100	1
Afinite kolonu (hCA I)	421,12	5,00	0,38	1,9	2105,6	1108,21	16,82	161,54
Afinite kolonu (hCA II)	599,95	5,00	0,25	1,25	2999,75	2399,8	23,97	349,83

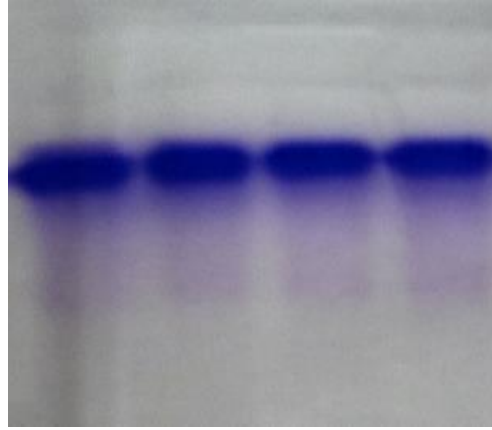
Elde edilen elüatlardan aktivite gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesi tayini ve esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Ayrıca Bradford metoduyla kantitatif olarak protein miktarı tayini yapıldı. Kolondan alınan fraksiyonlar için aktivite ölçümleri daha önce tarif edildiği şekilde yapıldı. Protein tayini ise 100 µL enzim çözeltisi için yapıldı. Hemolizatta aktivite tayini ve protein miktarı ölçümünde ise her bir hemolizattan 1 mL alınıp 10 mL ye seyreltilmiş ve bundan 100 µL alınarak ölçümler yapılmıştır.

Bradford metoduyla yapılan kantitatif protein tayininde öncelikle bir standart eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart grafikten faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları bulundu. (Şekil 5.2)



Şekil 5.2. Bradford metodu için hazırlanan kalibrasyon grafiği.

Son olarak afinite kolonundan elüe edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez işlemi dördüncü bölümde anlatıldığı gibi uygulandı. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi. (Şekil 5.3)



Şekil 5.3. SDS-PAGE sonuçları. (Soldan sağa sırasıyla standart hCA I, saflaştırılan hCA I, standart hCA II, saflaştırılan hCA II).

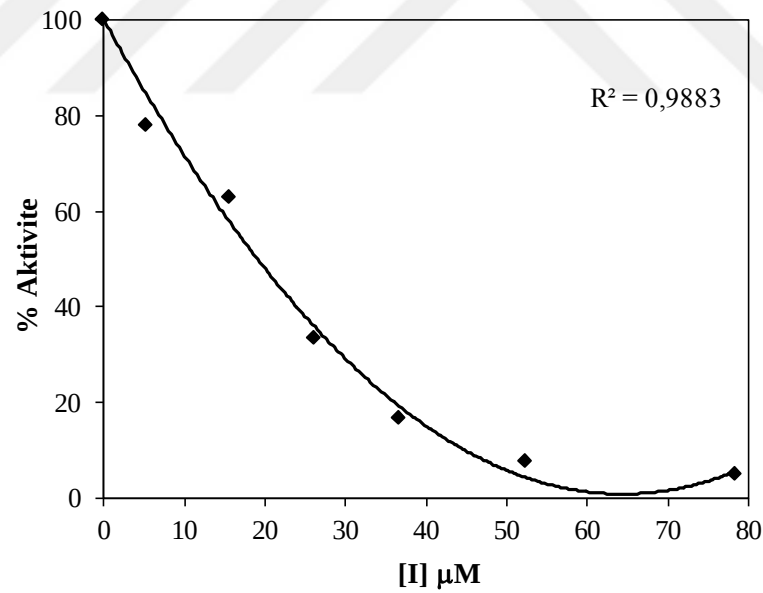
5.2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimleri (hCA I ve hCA II) Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

5.2.1. Sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 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 hCA I ve hCA II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümleri yapıldı. Hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisine sahip olan bileşiklerin sonuçlarına ilişkin çizelgeler ve grafikler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 5.2. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **2** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

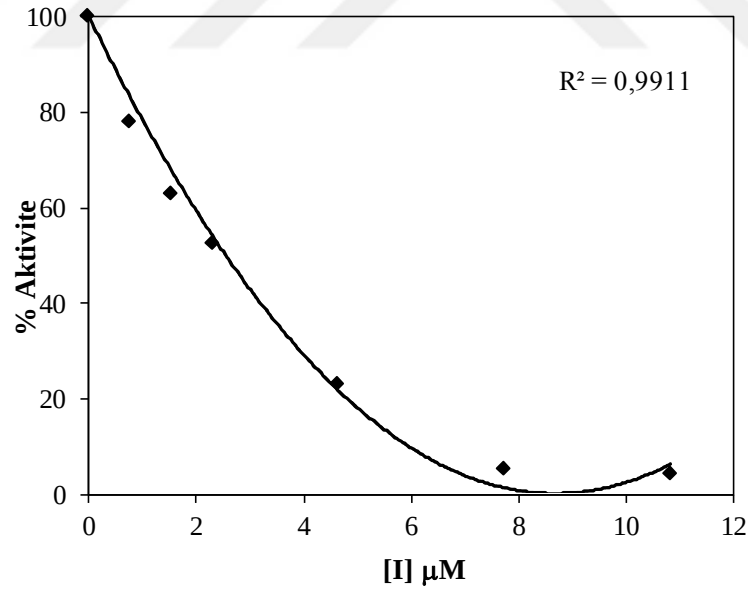
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
2	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	10	590	2500	5,23	77,78
	1000	100	30	570	2500	15,70	62,96
	1000	100	50	550	2500	26,17	33,33
	1000	100	70	530	2500	36,64	16,67
	1000	100	100	500	2500	52,34	7,41
	1000	100	150	450	2500	78,51	4,76



Şekil 5.4. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.3. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **3** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

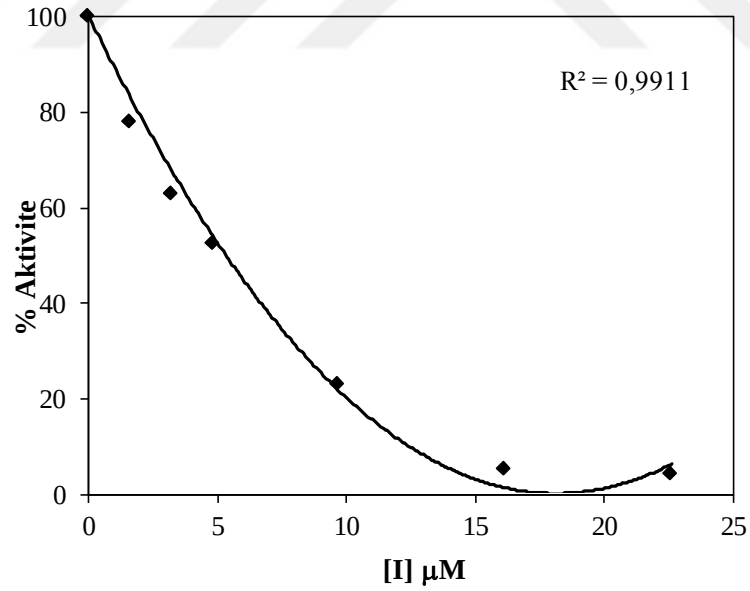
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat. (μL)	[I] μM	% Aktivite
3	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	5	595	2500	0,77	77,78
	1000	100	10	590	2500	1,55	62,97
	1000	100	15	585	2500	2,32	52,38
	1000	100	30	570	2500	4,64	23,08
	1000	100	50	550	2500	7,74	5,35
	1000	100	70	530	2500	10,84	4,21



Şekil 5.5. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.4. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **4** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

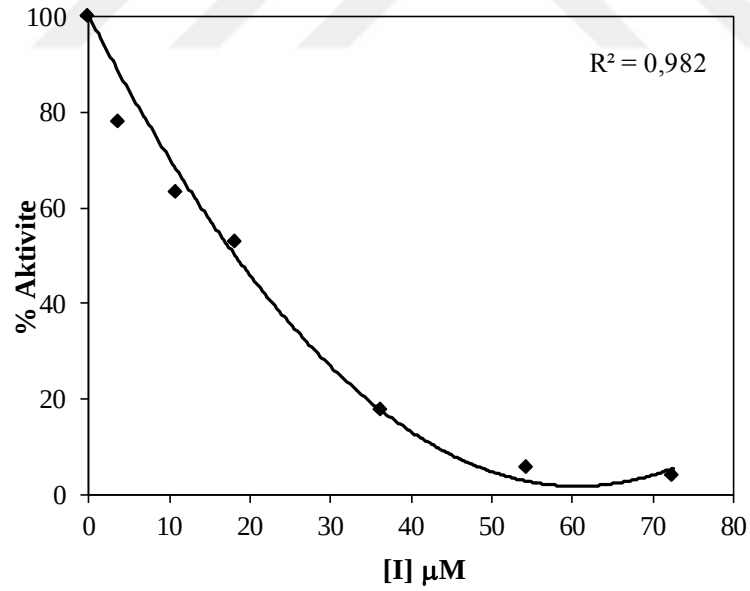
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
4	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	5	595	2500	1,62	77,78
	1000	100	10	590	2500	3,23	62,97
	1000	100	15	585	2500	4,85	52,38
	1000	100	30	570	2500	9,69	23,08
	1000	100	50	550	2500	16,15	5,35
	1000	100	70	530	2500	22,61	4,21



Şekil 5.6. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.5. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **5** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

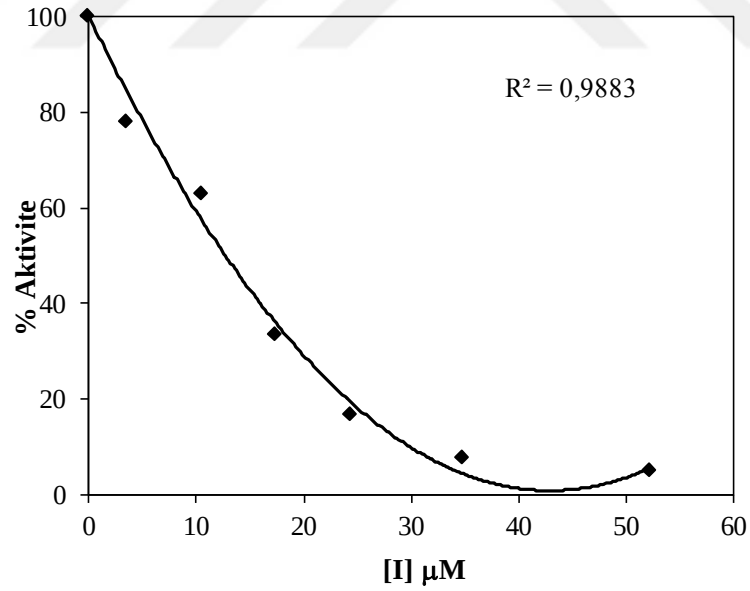
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
5	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	10	590	2500	3,63	78,00
	1000	100	30	570	2500	10,89	63,33
	1000	100	50	550	2500	18,15	52,86
	1000	100	100	500	2500	36,29	17,50
	1000	100	150	450	2500	54,43	5,71
	1000	100	200	400	2500	72,58	3,75



Şekil 5.7. hCA I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **5** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.6. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **2** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

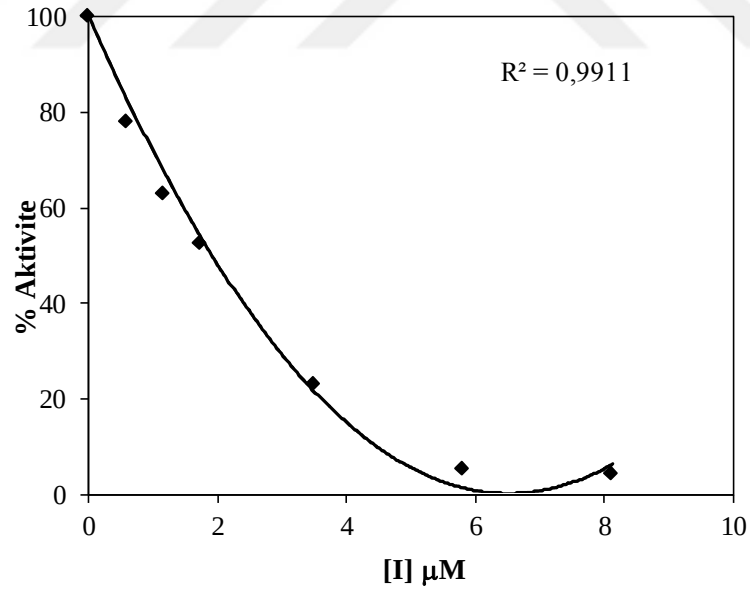
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
2	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	10	590	2500	3,49	77,78
	1000	100	30	570	2500	10,47	62,96
	1000	100	50	550	2500	17,45	33,33
	1000	100	70	530	2500	24,42	16,67
	1000	100	100	500	2500	34,89	7,41
	1000	100	150	450	2500	52,34	4,76



Şekil 5.8. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.7. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **3** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

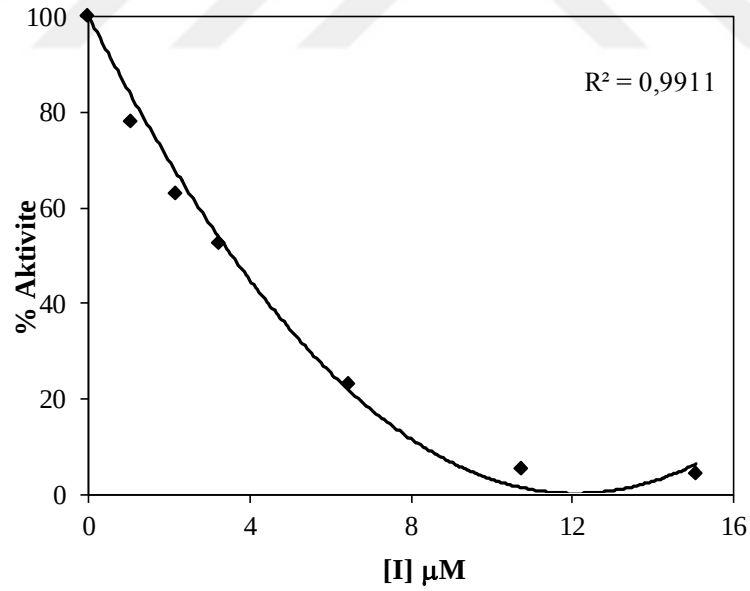
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
3	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	5	595	2500	0,58	77,78
	1000	100	10	590	2500	1,16	62,97
	1000	100	15	585	2500	1,74	52,38
	1000	100	30	570	2500	3,48	23,08
	1000	100	50	550	2500	5,81	5,35
	1000	100	70	530	2500	8,13	4,21



Şekil 5.9. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.8. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla **4** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

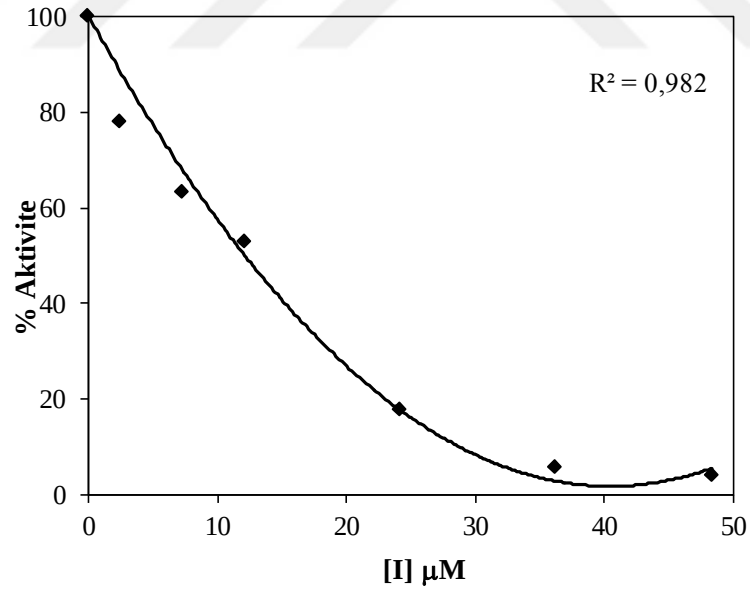
İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
4	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	5	595	2500	1,08	77,78
	1000	100	10	590	2500	2,15	62,97
	1000	100	15	585	2500	3,23	52,38
	1000	100	30	570	2500	6,46	23,08
	1000	100	50	550	2500	10,76	5,35
	1000	100	70	530	2500	15,07	4,21



Şekil 5.10. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine **4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.9. Hidrataz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

İnhibitör	Tampon (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Su (μL)	Substrat (μL)	[I] μM	% Aktivite
5	1000	-	-	600	2500	-	-
	1000	100	-	500	2500	0,00	100,00
	1000	100	10	590	2500	2,42	78,00
	1000	100	30	570	2500	7,26	63,33
	1000	100	50	550	2500	12,10	52,86
	1000	100	100	500	2500	24,19	17,50
	1000	100	150	450	2500	36,29	5,71
	1000	100	200	400	2500	48,39	3,75



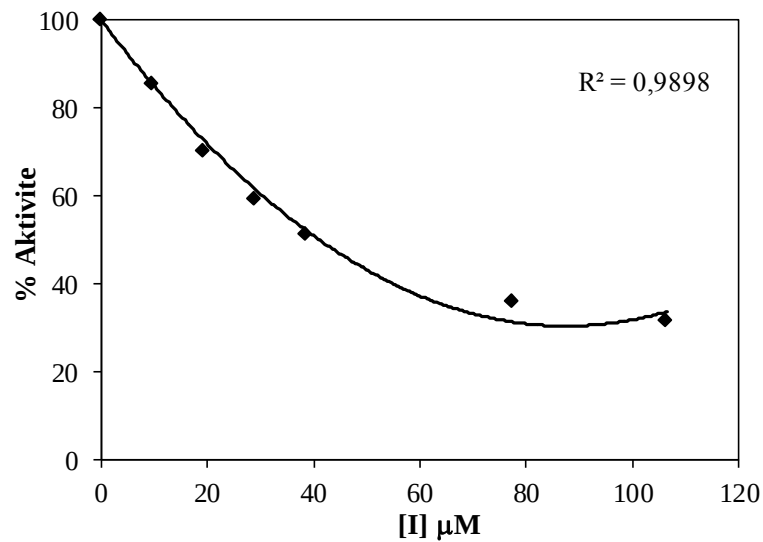
Şekil 5.11. hCA II izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.

5.2.2. Sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 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 IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Çizelge 5.10. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **mABS** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

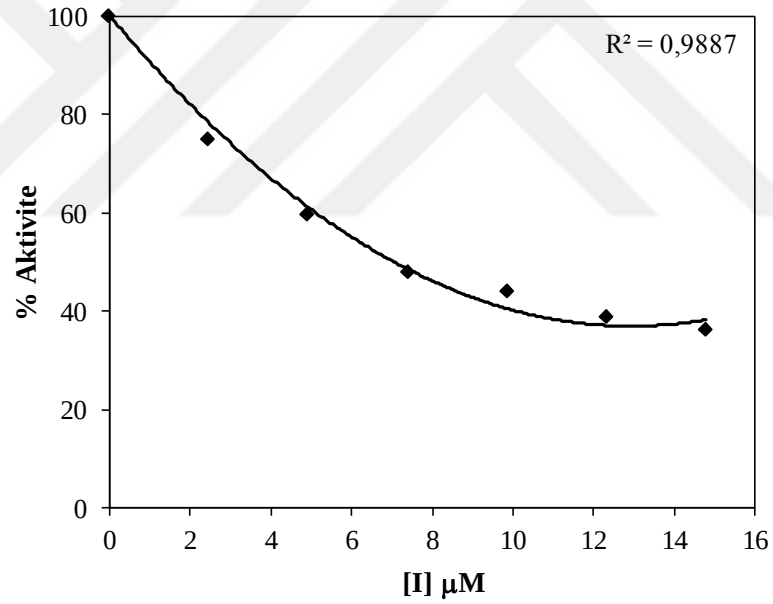
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
mABS	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	85,53	9,68
	1000	1300	100	20	580	70,39	19,36
	1000	1300	100	30	570	59,21	29,04
	1000	1300	100	40	560	51,32	38,72
	1000	1300	100	80	520	36,18	77,43
	1000	1300	100	110	490	31,58	106,47



Şekil 5.12. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **mABS** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.11. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **HmABSMAL** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

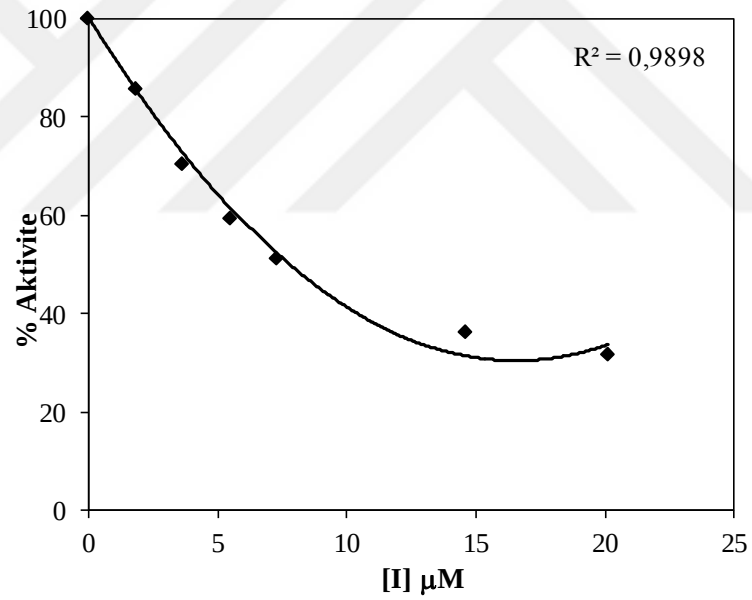
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
HmABSMAL	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	74,77	2,47
	1000	1300	100	20	580	59,46	4,93
	1000	1300	100	30	570	47,75	7,40
	1000	1300	100	40	560	44,14	9,87
	1000	1300	100	50	550	38,74	12,33
	1000	1300	100	60	540	36,04	14,80



Şekil 5.13. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **HmABSMAL** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.12. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **1** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

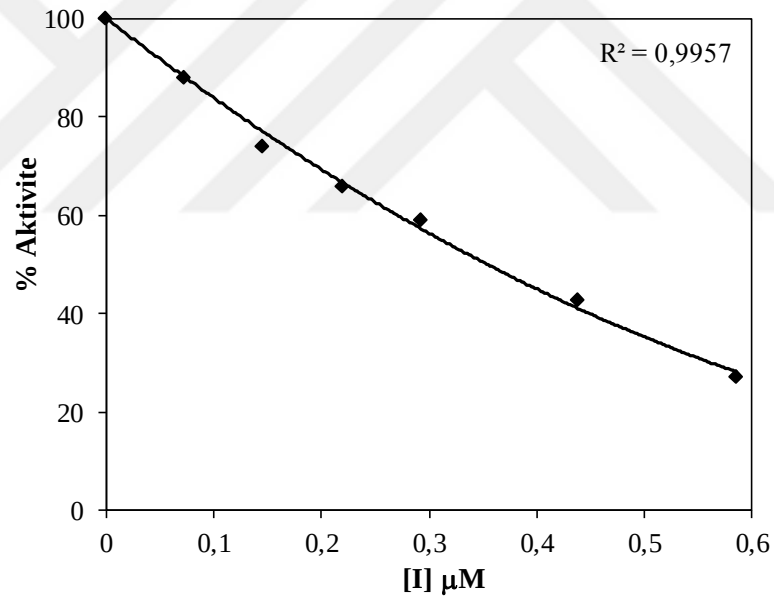
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
1	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	85,53	1,83
	1000	1300	100	20	580	70,40	3,66
	1000	1300	100	30	570	59,21	5,50
	1000	1300	100	40	560	51,32	7,33
	1000	1300	100	80	520	36,18	14,65
	1000	1300	100	110	490	31,58	20,15



Şekil 5.14. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.13. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **2** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

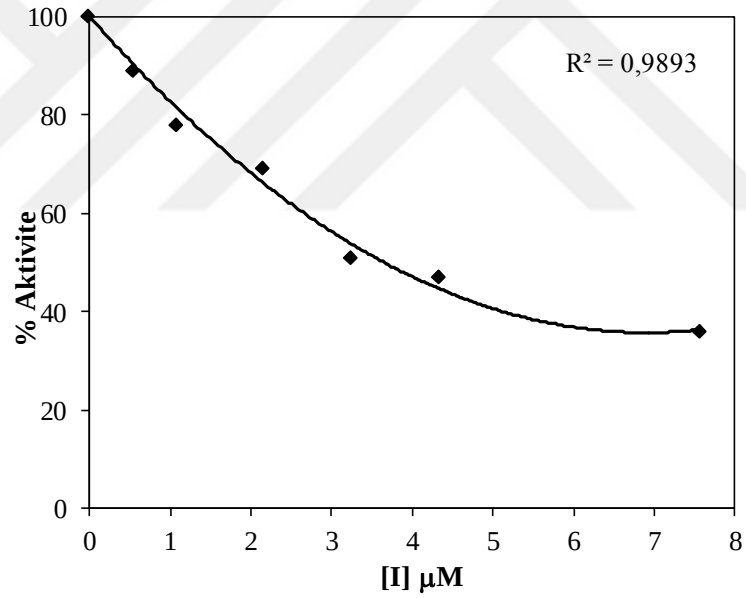
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
2	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	5	595	87,77	0,07
	1000	1300	100	10	590	73,94	0,15
	1000	1300	100	15	585	65,96	0,22
	1000	1300	100	20	580	59,04	0,29
	1000	1300	100	30	570	42,55	0,44
	1000	1300	100	40	560	27,13	0,59



Şekil 5.15. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **2** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.14. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **3** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

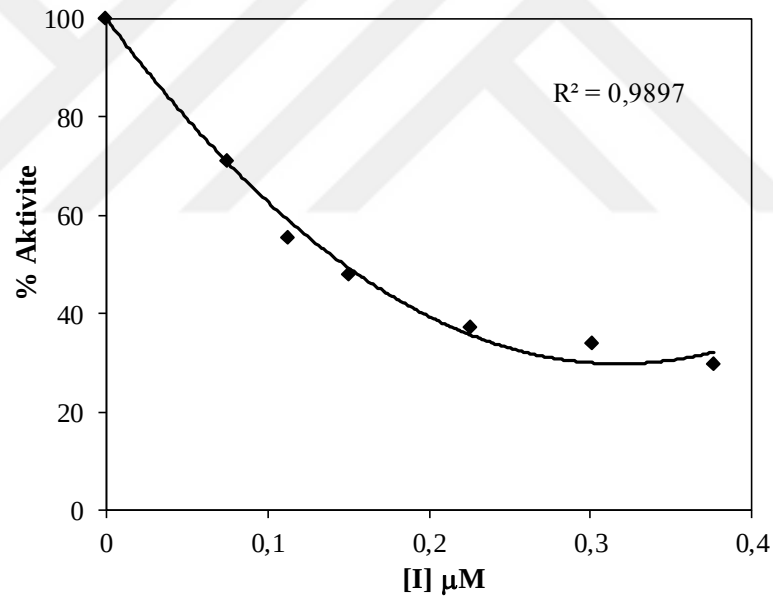
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
3	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	89,00	0,54
	1000	1300	100	20	580	78,00	1,08
	1000	1300	100	40	560	69,00	2,17
	1000	1300	100	60	540	51,00	3,25
	1000	1300	100	80	520	47,00	4,33
	1000	1300	100	140	460	36,00	7,59



Şekil 5.16. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.15. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **4** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

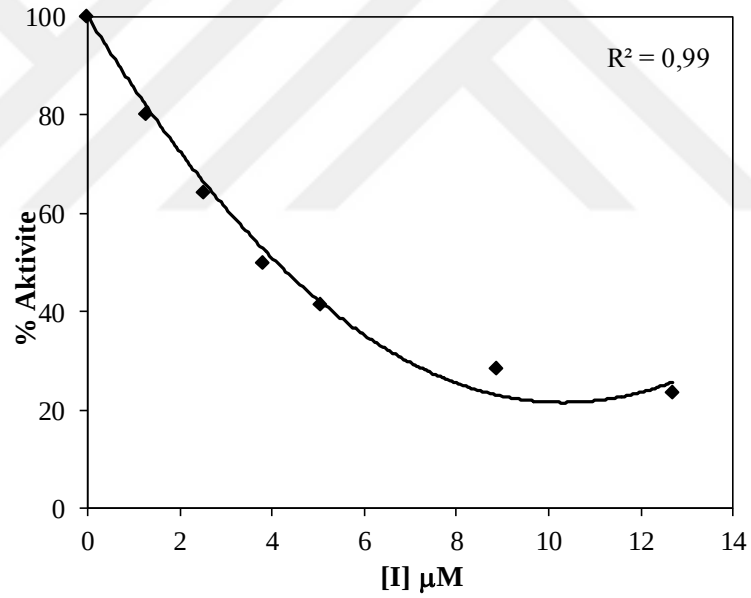
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
4	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	71,07	0,08
	1000	1300	100	15	585	55,37	0,11
	1000	1300	100	20	580	47,93	0,15
	1000	1300	100	30	570	37,19	0,23
	1000	1300	100	40	560	33,88	0,30
	1000	1300	100	50	550	29,75	0,38



Şekil 5.17. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.16. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

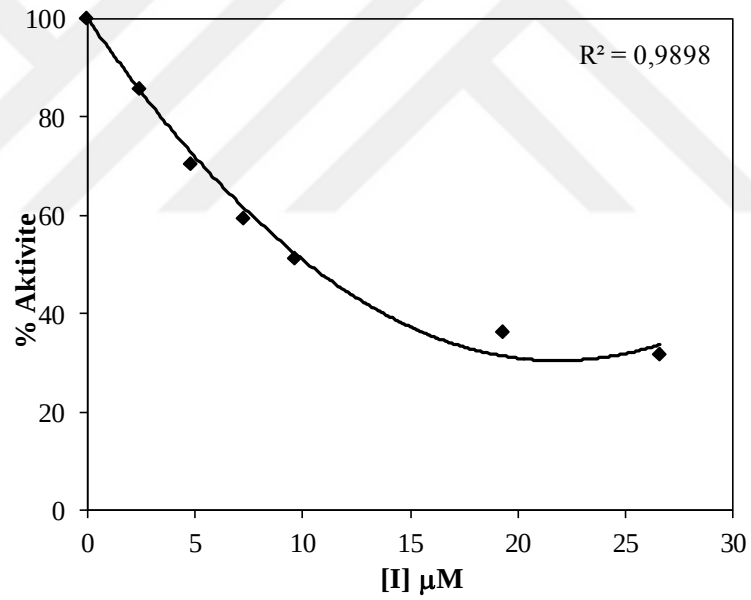
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
5	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	80,19	1,27
	1000	1300	100	20	580	64,15	2,54
	1000	1300	100	30	570	50,00	3,81
	1000	1300	100	40	560	41,51	5,08
	1000	1300	100	70	530	28,30	8,89
	1000	1300	100	100	500	23,58	12,70



Şekil 5.18. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.17. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **mABS** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

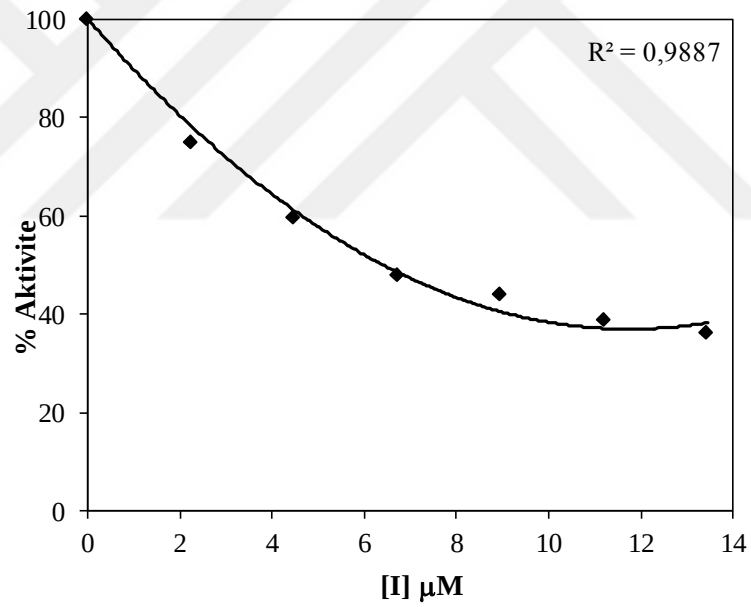
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
mABS	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	85,53	2,42
	1000	1300	100	20	580	70,40	4,84
	1000	1300	100	30	570	59,21	7,26
	1000	1300	100	40	560	51,32	9,68
	1000	1300	100	80	520	36,18	19,36
	1000	1300	100	110	490	31,58	26,62



Şekil 5.19. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **mABS** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.18. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **HmABSMAL** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

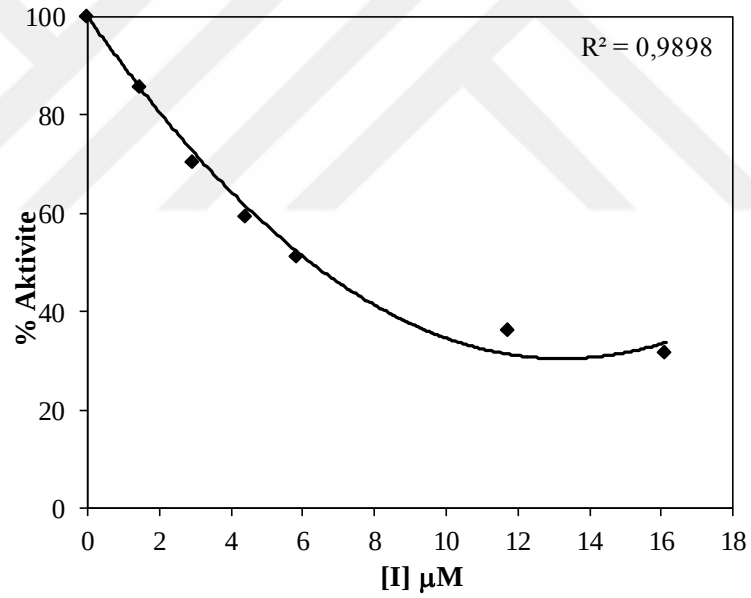
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
HmABSMAL	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	74,77	2,24
	1000	1300	100	20	580	59,46	4,49
	1000	1300	100	30	570	47,75	6,73
	1000	1300	100	40	560	44,14	8,97
	1000	1300	100	50	550	38,74	11,21
	1000	1300	100	60	540	36,04	13,46



Şekil 5.20. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **HmABSMAL** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.19. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **1** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

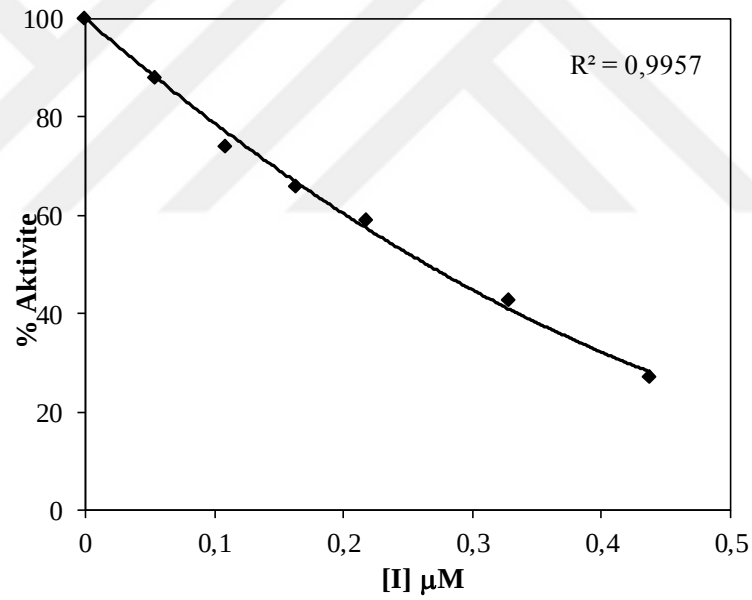
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
1	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	85,53	1,47
	1000	1300	100	20	580	70,40	2,93
	1000	1300	100	30	570	59,21	4,40
	1000	1300	100	40	560	51,32	5,86
	1000	1300	100	80	520	36,18	11,72
	1000	1300	100	110	490	31,58	16,12



Şekil 5.21. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **1** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.20. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

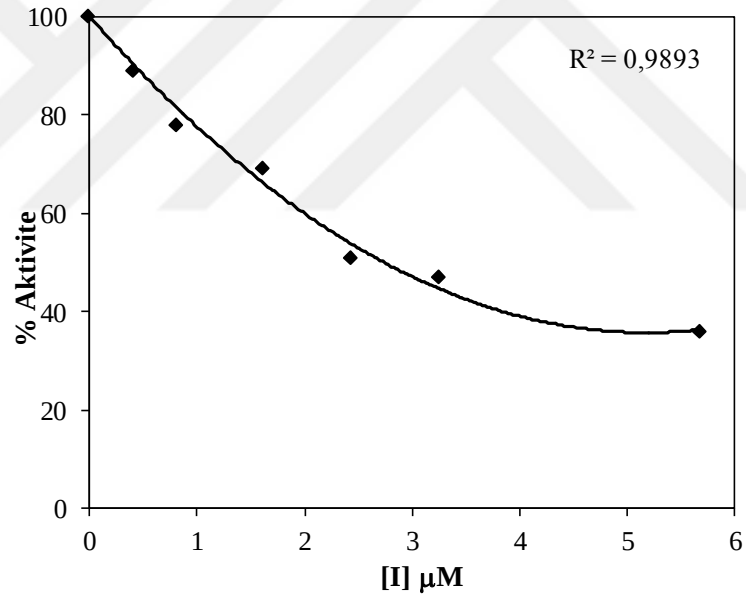
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
2	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	5	595	87,77	0,06
	1000	1300	100	10	590	73,94	0,11
	1000	1300	100	15	585	65,96	0,16
	1000	1300	100	20	580	59,04	0,22
	1000	1300	100	30	570	42,55	0,33
	1000	1300	100	40	560	27,13	0,44



Şekil 5.22. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 2 bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.21. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **3** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

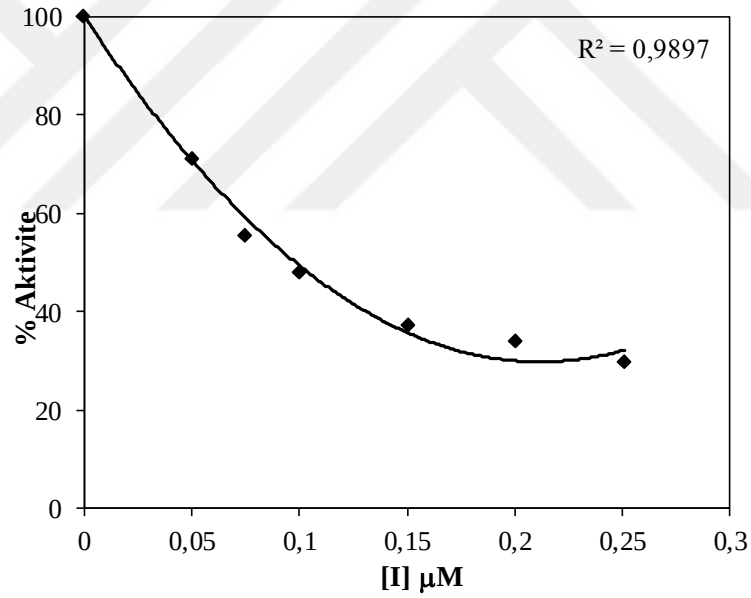
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
3	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	89,00	0,41
	1000	1300	100	20	580	78,00	0,81
	1000	1300	100	40	560	69,00	1,63
	1000	1300	100	60	540	51,00	2,44
	1000	1300	100	80	520	47,00	3,25
	1000	1300	100	140	460	36,00	5,69



Şekil 5.23. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **3** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.22. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **4** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

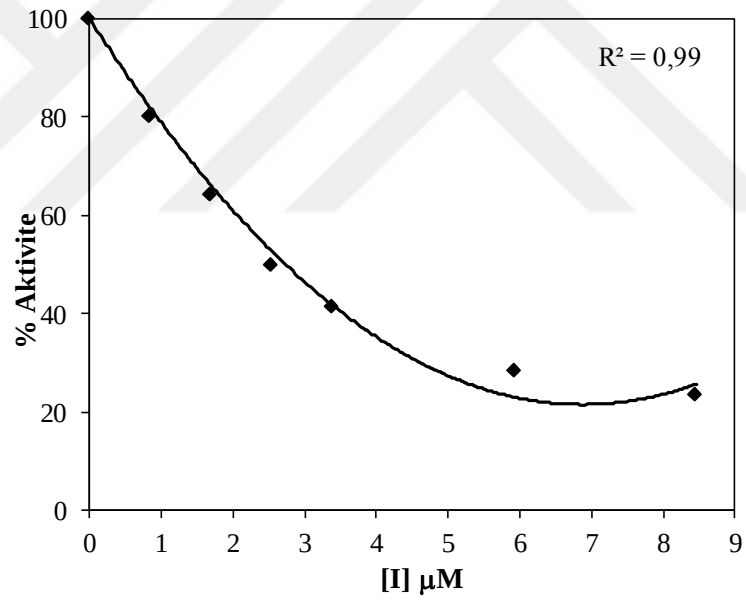
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
4	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	71,07	0,05
	1000	1300	100	15	585	55,37	0,08
	1000	1300	100	20	580	47,93	0,10
	1000	1300	100	30	570	37,19	0,15
	1000	1300	100	40	560	33,88	0,20
	1000	1300	100	50	550	29,75	0,25



Şekil 5.24. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **4** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.23. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	%Aktivite	[I] (μM)
5	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
	1000	1300	100	10	590	80,19	0,85
	1000	1300	100	20	580	64,15	1,69
	1000	1300	100	30	570	50,00	2,54
	1000	1300	100	40	560	41,51	3,39
	1000	1300	100	70	530	28,30	5,93
	1000	1300	100	100	500	23,58	8,47



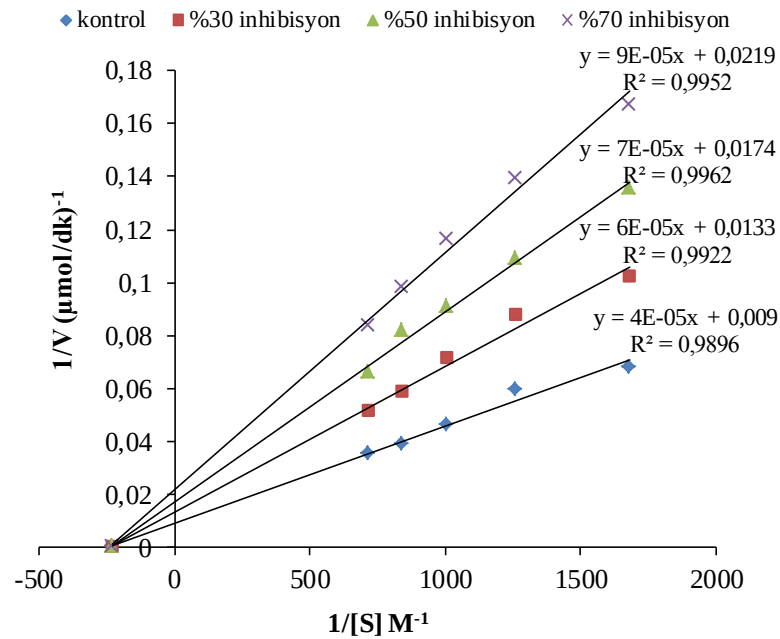
Şekil 5.25. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.

5.2.3. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkilerinden K_i sabitlerinin belirlenmesi

K_i değerlerini bulmak için eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu amaçla bölüm 4.4.2.2 de anlatıldığı gibi hazırlanan p-nitrofenil asetat çözeltisinden istenilen konsantrasyonu sağlayacak şekilde kuvars küvetlere beş farklı miktarda ilave edildi. Daha sonra Tris-SO₄ tamponundan 1,3 mL ve enzim çözeltisinden 0,1 mL ilave edildi. Toplam hacim 3 mL olacak şekilde saf su eklendi, inhibitörlü çalışmalarda ise saf suyun hacmi eklenen inhibitör miktarı kadar azaltılarak hacim 3 mL de sabit tutulmuş oldu. Bu işlemler tamamlandıktan sonra 348 nm de 3 dk boyunca absorbansdaki değişim kaydedildi. Kullanılan çözelti miktarları ve buna karşılık gelen substrat konsantrasyonları ile eklenen inhibitör miktarları aşağıdaki çizelgelerde verilmektedir. Ölçülen absorbans değerlerinden faydalanarak aktivite birimleri (reaksiyon hızları) $\mu\text{mol/dakika}$ cinsinden bölüm 4.4.5.3 de anlatıldığı gibi hesaplandı. Bütün inhibitörler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı. K_i çizelgeleri ve elde edilen grafikler aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 5.24. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **mABS** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

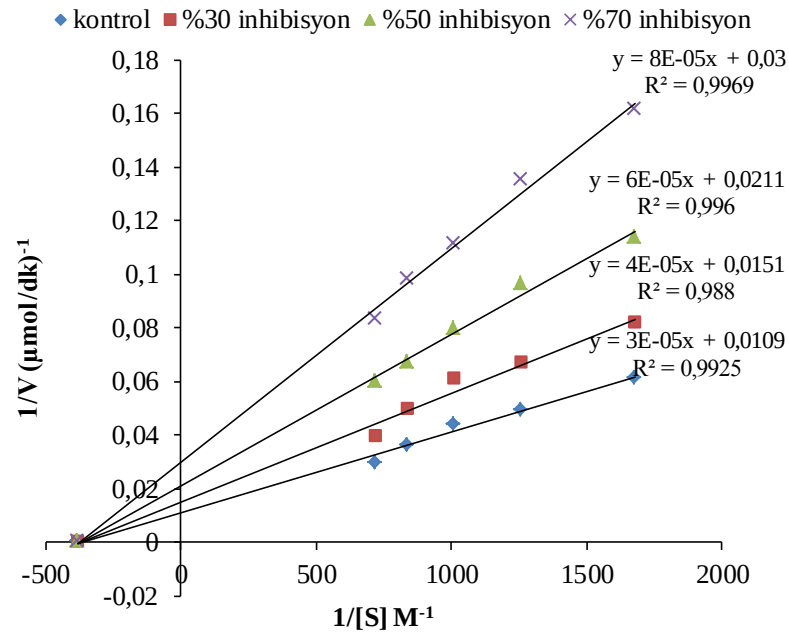
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
mABS	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,068
	600	1300	100	5	995	1,68x10 ³	0,102
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,135
	600	1300	100	30	970	1,68x10 ³	0,167
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,060
	800	1300	100	5	795	1,26x10 ³	0,088
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,109
	800	1300	100	30	770	1,26x10 ³	0,139
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,046
	1000	1300	100	5	595	1,01x10 ³	0,071
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,091
	1000	1300	100	30	570	1,01x10 ³	0,116
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,039
	1200	1300	100	5	395	0,84x10 ³	0,059
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,082
	1200	1300	100	30	370	0,84x10 ³	0,098
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,035
	1400	1300	100	5	195	0,72x10 ³	0,052
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,066
	1400	1300	100	30	170	0,72x10 ³	0,083



Şekil 5.26. **mABS** bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.25. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **HmABSMAL** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

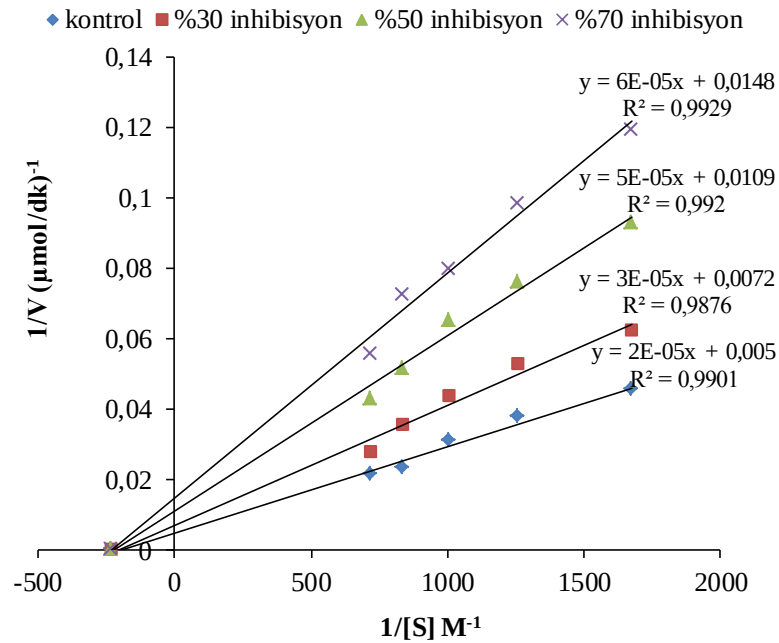
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
HmABSMAL	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,061
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,082
	600	1300	100	30	970	1,68x10 ³	0,114
	600	1300	100	60	940	1,68x10 ³	0,161
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,049
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,067
	800	1300	100	30	770	1,26x10 ³	0,096
	800	1300	100	60	740	1,26x10 ³	0,135
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,044
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,061
	1000	1300	100	30	570	1,01x10 ³	0,079
	1000	1300	100	60	540	1,01x10 ³	0,111
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,036
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,050
	1200	1300	100	30	370	0,84x10 ³	0,067
	1200	1300	100	60	340	0,84x10 ³	0,098
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,030
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,040
	1400	1300	100	30	170	0,72x10 ³	0,060
	1400	1300	100	60	140	0,72x10 ³	0,083



Şekil 5.27. **HmABSMAL** bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.26. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **1** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

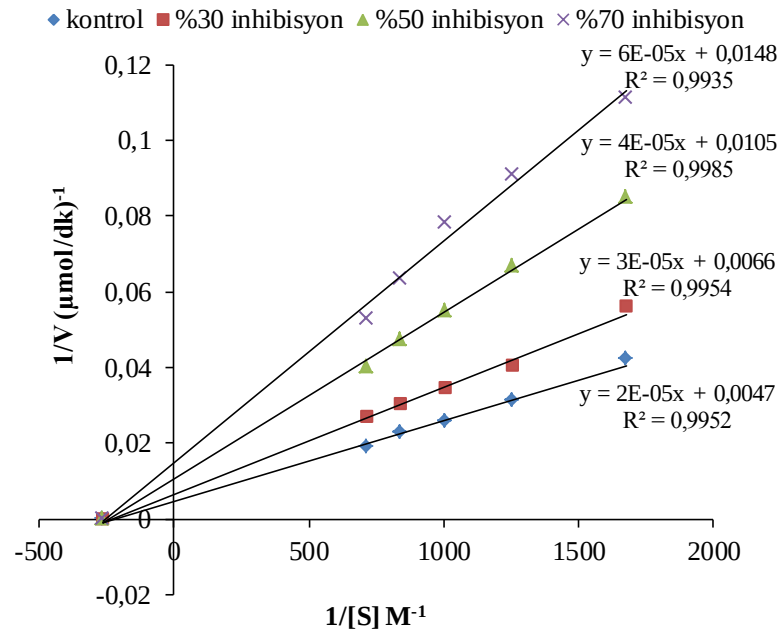
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
1	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,045
	600	1300	100	15	985	1,68x10 ³	0,063
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,093
	600	1300	100	110	890	1,68x10 ³	0,119
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,038
	800	1300	100	15	785	1,26x10 ³	0,053
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,076
	800	1300	100	110	690	1,26x10 ³	0,098
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,031
	1000	1300	100	15	585	1,01x10 ³	0,044
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,065
	1000	1300	100	110	490	1,01x10 ³	0,079
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,024
	1200	1300	100	15	385	0,84x10 ³	0,035
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,052
	1200	1300	100	110	290	0,84x10 ³	0,073
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,021
	1400	1300	100	15	185	0,72x10 ³	0,028
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,043
	1400	1300	100	110	90	0,72x10 ³	0,056



Şekil 5.28. **1** bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.27. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **2** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

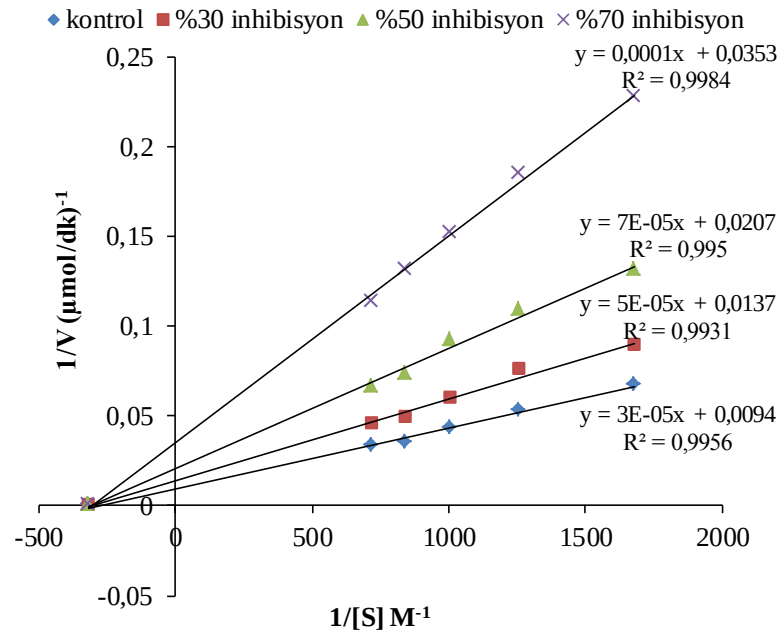
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
2	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,042
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,056
	600	1300	100	30	970	1,68x10 ³	0,085
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,111
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,031
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,041
	800	1300	100	30	770	1,26x10 ³	0,067
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,091
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,026
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,035
	1000	1300	100	30	570	1,01x10 ³	0,055
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,078
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,023
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,030
	1200	1300	100	30	370	0,84x10 ³	0,047
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,063
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,019
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,027
	1400	1300	100	30	170	0,72x10 ³	0,040
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,053



Şekil 5.29. **2** bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.28. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **3** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

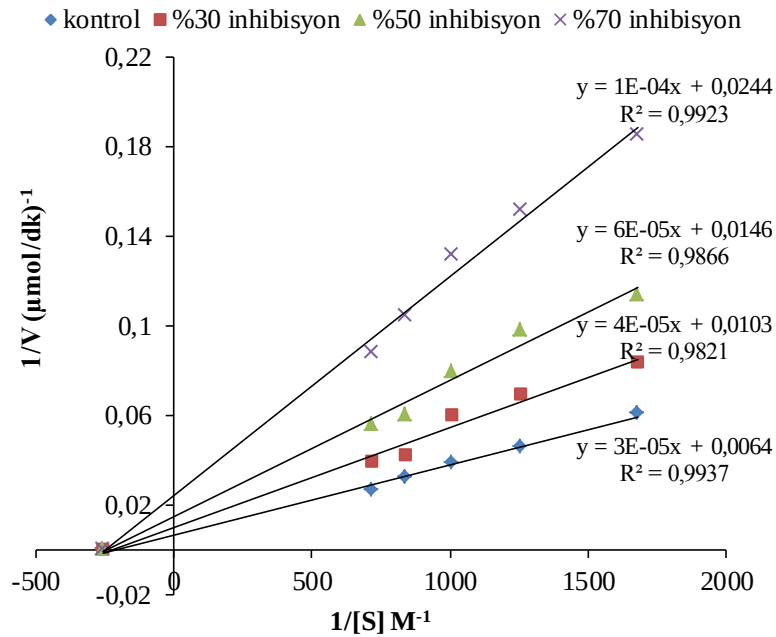
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
3	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,068
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,089
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,132
	600	1300	100	140	860	1,68x10 ³	0,227
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,053
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,076
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,109
	800	1300	100	140	660	1,26x10 ³	0,185
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,043
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,060
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,093
	1000	1300	100	140	460	1,01x10 ³	0,152
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,035
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,049
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,074
	1200	1300	100	140	260	0,84x10 ³	0,132
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,033
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,046
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,067
	1400	1300	100	140	60	0,72x10 ³	0,114



Şekil 5.30. **3** bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.29. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **4** bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

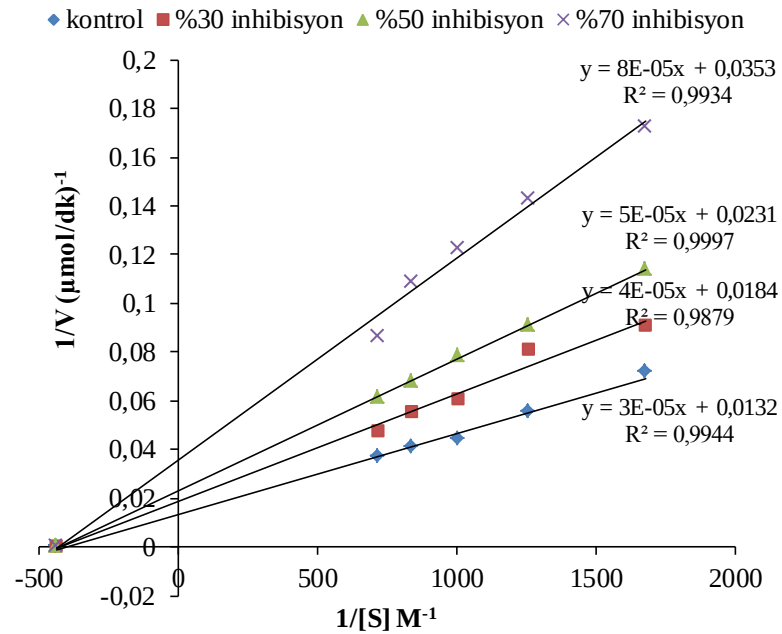
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
4	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,061
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,083
	600	1300	100	15	985	1,68x10 ³	0,114
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,185
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,046
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,069
	800	1300	100	15	785	1,26x10 ³	0,098
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,152
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,038
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,060
	1000	1300	100	15	585	1,01x10 ³	0,079
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,132
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,032
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,042
	1200	1300	100	15	385	0,84x10 ³	0,060
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,104
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,027
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,039
	1400	1300	100	15	185	0,72x10 ³	0,056
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,088



Şekil 5.31. **4** bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.30. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA I izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

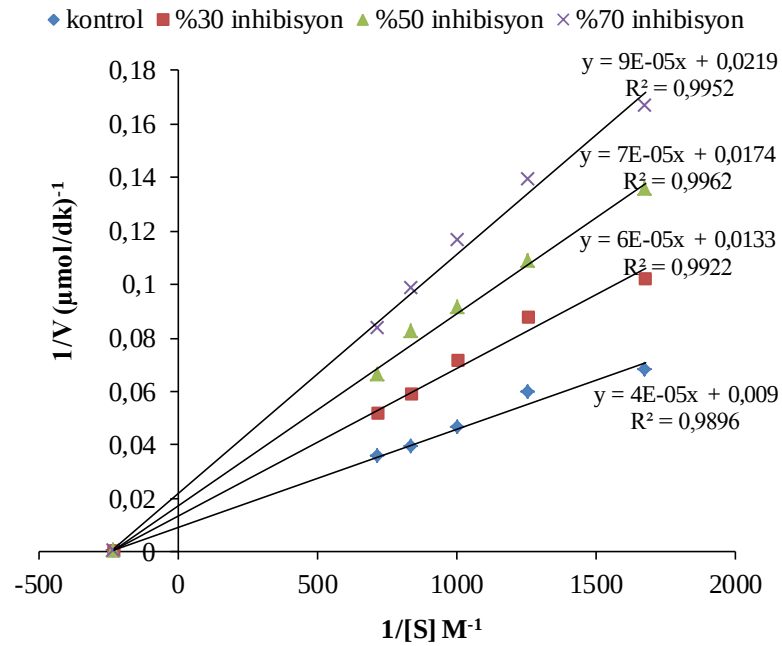
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
5	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,071
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,091
	600	1300	100	20	980	1,68x10 ³	0,114
	600	1300	100	70	930	1,68x10 ³	0,172
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,055
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,081
	800	1300	100	20	780	1,26x10 ³	0,091
	800	1300	100	70	730	1,26x10 ³	0,143
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,044
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,060
	1000	1300	100	20	580	1,01x10 ³	0,078
	1000	1300	100	70	530	1,01x10 ³	0,122
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,041
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,055
	1200	1300	100	20	380	0,84x10 ³	0,068
	1200	1300	100	70	330	0,84x10 ³	0,109
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,037
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,048
	1400	1300	100	20	180	0,72x10 ³	0,061
	1400	1300	100	70	130	0,72x10 ³	0,086



Şekil 5.32. 5 bileşiğinin hCA I için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.31. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **mABS** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

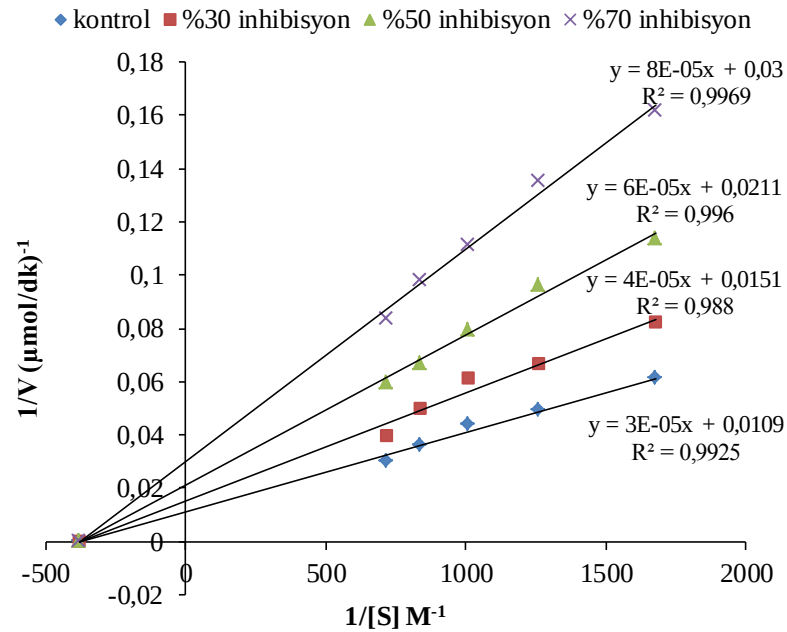
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
mABS	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,068
	600	1300	100	5	995	1,68x10 ³	0,102
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,135
	600	1300	100	30	970	1,68x10 ³	0,167
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,060
	800	1300	100	5	895	1,26x10 ³	0,088
	800	1300	100	10	890	1,26x10 ³	0,109
	800	1300	100	30	870	1,26x10 ³	0,139
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,046
	1000	1300	100	5	595	1,01x10 ³	0,071
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,091
	1000	1300	100	30	570	1,01x10 ³	0,116
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,039
	1200	1300	100	5	395	0,84x10 ³	0,059
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,082
	1200	1300	100	30	370	0,84x10 ³	0,098
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,035
	1400	1300	100	5	195	0,72x10 ³	0,052
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,066
	1400	1300	100	30	170	0,72x10 ³	0,083



Şekil 5.33. **mABS** bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.32. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **HmABSMAL** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

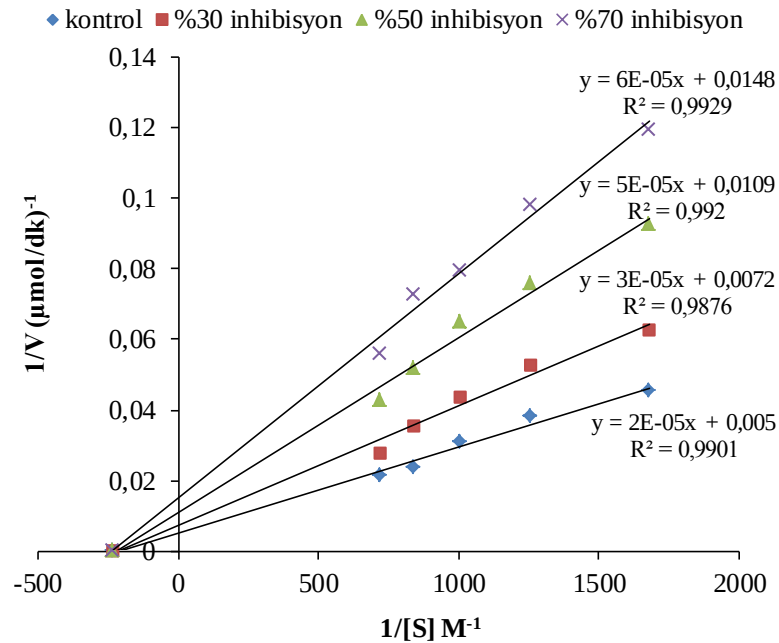
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
HmABSMAL	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,061
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,082
	600	1300	100	30	970	1,68x10 ³	0,114
	600	1300	100	60	940	1,68x10 ³	0,161
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,049
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,067
	800	1300	100	30	770	1,26x10 ³	0,096
	800	1300	100	60	740	1,26x10 ³	0,135
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,044
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,061
	1000	1300	100	30	570	1,01x10 ³	0,079
	1000	1300	100	60	540	1,01x10 ³	0,111
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,036
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,050
	1200	1300	100	30	370	0,84x10 ³	0,067
	1200	1300	100	60	340	0,84x10 ³	0,098
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,030
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,040
	1400	1300	100	30	170	0,72x10 ³	0,060
	1400	1300	100	60	140	0,72x10 ³	0,083



Şekil 5.34. **HmABSMAL** bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.33. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **1** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

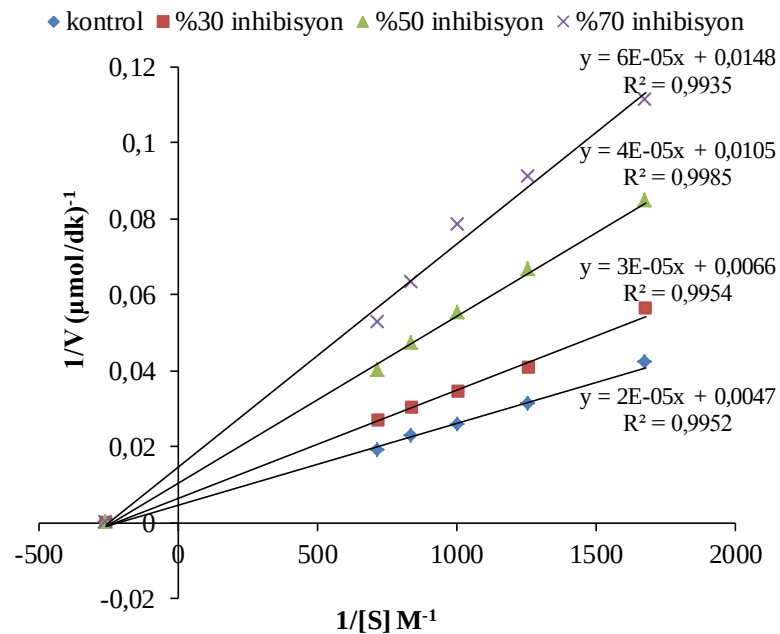
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
1	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,045
	600	1300	100	15	985	1,68x10 ³	0,063
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,093
	600	1300	100	110	890	1,68x10 ³	0,119
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,038
	800	1300	100	15	785	1,26x10 ³	0,053
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,076
	800	1300	100	110	690	1,26x10 ³	0,098
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,031
	1000	1300	100	15	585	1,01x10 ³	0,044
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,065
	1000	1300	100	110	490	1,01x10 ³	0,079
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,024
	1200	1300	100	15	385	0,84x10 ³	0,035
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,052
	1200	1300	100	110	290	0,84x10 ³	0,073
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,021
	1400	1300	100	15	185	0,72x10 ³	0,028
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,043
	1400	1300	100	110	90	0,72x10 ³	0,056



Şekil 5.35. **1** bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.34. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 2 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

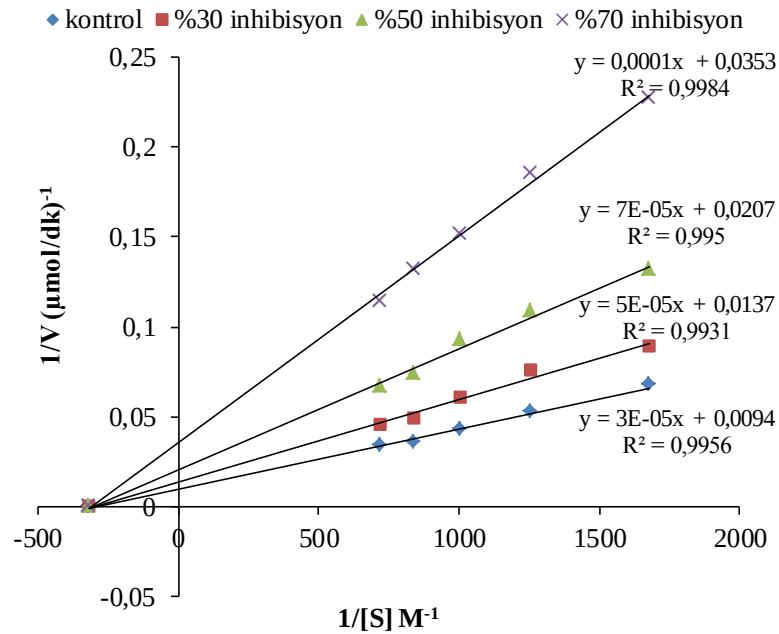
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
2	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,042
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,056
	600	1300	100	30	970	1,68x10 ³	0,085
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,111
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,031
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,041
	800	1300	100	30	770	1,26x10 ³	0,067
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,091
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,026
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,035
	1000	1300	100	30	570	1,01x10 ³	0,055
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,078
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,023
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,030
	1200	1300	100	30	370	0,84x10 ³	0,047
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,063
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,019
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,027
	1400	1300	100	30	170	0,72x10 ³	0,040
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,053



Şekil 5.36. 2 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.35. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **3** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

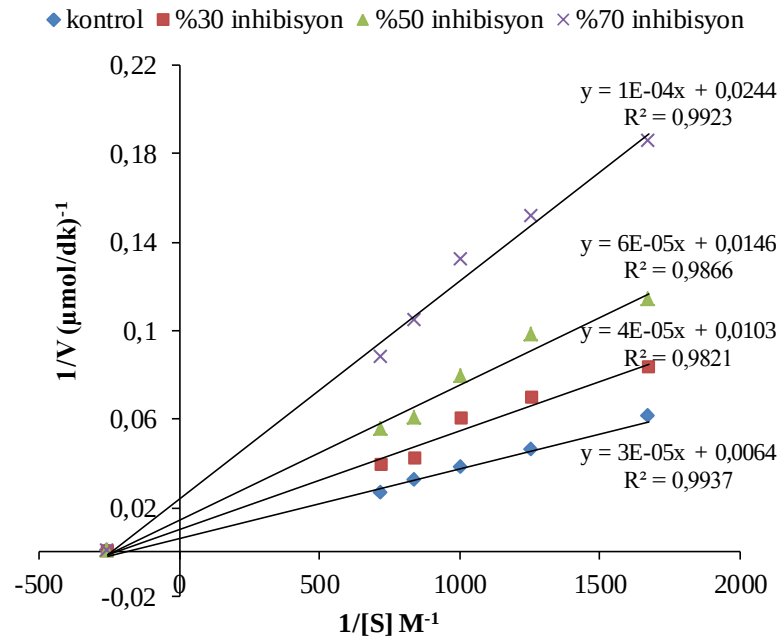
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
3	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,068
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,089
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,132
	600	1300	100	140	860	1,68x10 ³	0,227
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,053
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,076
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,109
	800	1300	100	140	660	1,26x10 ³	0,185
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,043
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,060
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,093
	1000	1300	100	140	460	1,01x10 ³	0,152
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,035
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,049
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,074
	1200	1300	100	140	260	0,84x10 ³	0,132
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,033
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,045
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,067
	1400	1300	100	140	60	0,72x10 ³	0,114



Şekil 5.37. **3** bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.36. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **4** bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

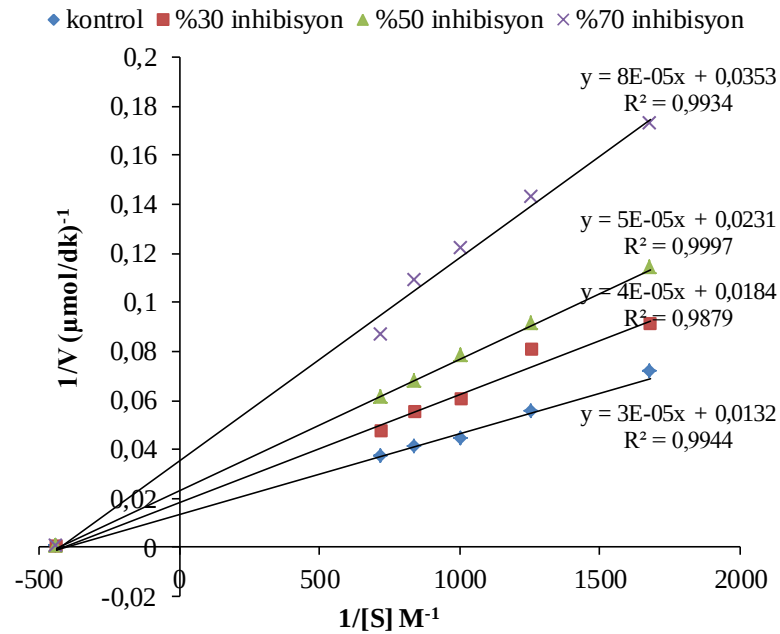
İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
4	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,061
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,083
	600	1300	100	15	985	1,68x10 ³	0,114
	600	1300	100	40	960	1,68x10 ³	0,185
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,046
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,069
	800	1300	100	15	785	1,26x10 ³	0,098
	800	1300	100	40	760	1,26x10 ³	0,152
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,038
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,060
	1000	1300	100	15	585	1,01x10 ³	0,079
	1000	1300	100	40	560	1,01x10 ³	0,132
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,032
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,042
	1200	1300	100	15	385	0,84x10 ³	0,060
	1200	1300	100	40	360	0,84x10 ³	0,104
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,026
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,039
	1400	1300	100	15	185	0,72x10 ³	0,056
	1400	1300	100	40	160	0,72x10 ³	0,088



Şekil 5.38. **4** bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.37. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla 5 bileşiğinin hCA II izoenzimi üzerindeki K_i sabitini belirlemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

İnhibitör	Substrat (μL)	Tris-SO ₄ Tamponu (μL)	Enzim (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[S] (M ⁻¹)	1/V (μmol/dk) ⁻¹
5	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,071
	600	1300	100	10	990	1,68x10 ³	0,091
	600	1300	100	20	980	1,68x10 ³	0,114
	600	1300	100	70	930	1,68x10 ³	0,172
	800	1300	100	-	800	1,26x10 ³	0,055
	800	1300	100	10	790	1,26x10 ³	0,081
	800	1300	100	20	780	1,26x10 ³	0,091
	800	1300	100	70	730	1,26x10 ³	0,143
	1000	1300	100	-	600	1,01x10 ³	0,044
	1000	1300	100	10	590	1,01x10 ³	0,060
	1000	1300	100	20	580	1,01x10 ³	0,078
	1000	1300	100	70	530	1,01x10 ³	0,122
	1200	1300	100	-	400	0,84x10 ³	0,041
	1200	1300	100	10	390	0,84x10 ³	0,055
	1200	1300	100	20	380	0,84x10 ³	0,068
	1200	1300	100	70	330	0,84x10 ³	0,109
	1400	1300	100	-	200	0,72x10 ³	0,037
	1400	1300	100	10	190	0,72x10 ³	0,048
	1400	1300	100	20	180	0,72x10 ³	0,061
	1400	1300	100	70	130	0,72x10 ³	0,086



Şekil 5.39. 5 bileşiğinin hCA II için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 5.38. Bileşiklerin hidrataz ve esteraz IC₅₀ değerleri ile esteraz K_i değerleri.

Bileşik	Hidrataz IC ₅₀ (μM)		Esteraz IC ₅₀ (μM)		K _i (μM)	
	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II
AAZ*	0,39	0,20	0,42	0,31	0,26	0,14
mABS*	-	-	41,11	10,27	6,80	1,70
pABS*	30,44	5,67	28,14	5,36	26,32	4,14
MAL	-	-	-	-	-	-
ClABT**	-	-	850,00	820,00	-	-
CuClABT**	-	-	290,00	270,00	-	-
HmABSMAL	-	-	7,05	6,41	3,70	3,36
HpABSMAL*	84,07	56,48	1,64	1,51	1,02	0,93
CuHpABSMAL*	13,34	10,58	1,43	1,03	0,98	0,91
1	-	-	7,78	6,22	4,38	3,50
2	19,03	12,69	0,35	0,27	1,63	0,12
3	2,55	1,91	3,65	2,74	1,58	1,19
4	5,32	3,55	0,15	0,09	0,06	0,04
5	18,14	12,09	4,10	2,74	1,92	1,28

* (Yenikaya vd., 2016), ** (İlkimen vd., 2015)

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz E.C. 4.2.1.1) eritrositleri de içine alan, pek çok dokuda pH düzenleyici olarak karakterize edilen ve aktif bölgesinde Zn⁺² iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi; canlılarda CO₂'in hidratasyonu ve HCO₃⁻'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.

Aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler güçlü karbonik anhidraz inhibitörleri arasında yer alırlar. Sülfonamidler, R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahip bileşiklerdir. Sülfonamidlerin güçlü karbonik anhidraz inhibitörleri olduğunun keşfedilmesinden sonra birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan hCA II izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Glokom hastalığının oral olarak tedavisinde şimdiye kadar dört çeşit sistemik inhibitör kullanılmıştır. Bu bileşikler asetazolamit, metazolamit, etokzolamit ve diklorfenamit bileşikleridir. Sistemik inhibitörler, silyer epitelyumda bulunan hCA II izoenzimini inhibe ederek HCO_3^- oranında bir azalma sağlar. HCO_3^- oranındaki azalmaya bağlı olarak göz içi sıvısının (humor aköz) salgılanmasında da %25-30 oranında azalma sağladığından bu bileşikler glokom tedavisinde etkilidirler. Fakat bu ilaçlar oral yoldan alındığı için gözün yanında diğer dokulardaki karbonik anhidraz enzimlerini de etkilemekte ve dolayısıyla vücutta uyuşukluk, el ve ayak parmaklarında karıncalanma, tat değişikliği ve böbrek taşları oluşumu gibi birçok yan etkiye sebep olmaktadır. Bu durum da sentezlenen bu inhibitörlerin topikal olarak göze uygulanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Fakat bu bileşikler sudaki çözünürlük problemlerinden dolayı henüz damla haline getirilememiş ve ağızdan alınmaktadırlar.

Topikal karbonik anhidraz inhibitörü olarak ilk önce dorzolamit bileşiği sentezlenmiş ve 1995 de kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra yapı olarak dorzolamide benzeyen brinzolamit bileşiği sentezlenmiş ve 1999 da kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçlar daha öncekilerle kıyaslandığında göze lokal olarak uygulanması sebebiyle yalnızca istenilen karbonik anhidraz enzimlerini inhibe etmekte, dolayısıyla daha az yan etkiye sebep olmaktadır. Son yıllardaki çalışmalarda ise dorzolamit ve brinzolamit bileşiklerinin de göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur.

Özetle, sistemik ve topikal karbonik anhidraz inhibitörleri tedavide etkili ilaçlar olmakla birlikte birçok yan etkilerinin bulunmasından dolayı yeni inhibitörlerin sentezine ihtiyaç duyulmuştur. Bu tez çalışmasında, fakültemiz anorganik kimya araştırma laboratuvarında sentezlenen, aminobenzotiyazol, maleik anhidrit ve *m*-/*p*-aminobenzen-sülfonamit türevlerini içeren Cu(II) komplekslerinin, insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak çalışılmıştır.

hCA I izoenziminin spesifik aktivitesi 1108,21 EU/mg protein olup %16,82 verimle saflaştırılmış, hCA II izoenziminin spesifik aktivitesi 2399,80 EU/mg protein olup %23,97 verimle saflaştırılmıştır.

Enzim aktivitesi tayini iki farklı yöntemle yapılmıştır. Bunlardan birincisi enzimin hidrataz aktivitesinin ölçümüdür. Bu yöntemde CO_2 'in su ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H_2CO_3 'in H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışarak ortamın pH'ını değiştirme süresi ölçülmektedir. Bu aktivite tayininde gözlenen inhibisyon türü yarışmalı inhibisyonudur. Bunun nedeni ise substrat olan CO_2 molekülünün doğrudan aktif bölgede bulunan Zn^{+2} iyonuna bağlı

olan OH grubuna bağlanmasıdır. Sülfonamit inhibitörleri de aynı bölgeye bağlanacağından inhibitörle substrat enzime bağlanma konusunda bir yarışma halindedir.

Bir diğer aktivite tayin yöntemi ise esteraz aktivitesi ölçümüdür. Bu yöntem, karbonik anhidraz enziminin ester bağlarını parçalaması esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenol bileşiğine hidroliz etmekte, oluşan bu bileşik de 348 nm de absorpsiyon vermektedir. Bu aktivite tayininde ise yarışmasız inhibisyon türü gözlenmektedir. Bunun nedeni ise substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetat bileşiğinin enzimin aktif bölgesine çok yakın bir amino asit olan histidin imidazol halkasına bağlanması, sülfonamit inhibitörlerinin ise aktif bölgede bulunan Zn^{+2} iyonuna bağlı OH grubuna bağlanmasıdır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlandığı için herhangi bir yarışma durumu söz konusu değildir.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede IC_{50} değerleri kullanılmaktadır. Yeni sentezlenen bileşiklerin insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri glokom tedavisinde klinikte lokal olarak kullanılan %1 lik çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik etmek suretiyle araştırıldı. Yapılan deneylerde hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde **pABS**, **HpABSMAL**, **CuHpABSMAL** ve **2-5** bileşiklerinin inhibisyon etkisi gösterdiği, diğer bileşiklerin inhibisyon etkisi göstermediği görülmüştür (Çizelge 5.38).

Yeni sentezlenen bileşiklerin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri yine klinikte lokal olarak kullanılan %1 lik çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Başlangıç maddesi olan **MAL** hariç bu bileşiklerin, karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi ve IC_{50} değerleri hesaplandı.

K_i değerlerinin bulunması için ise beş farklı substrat konsantrasyonunun her biri için üçer farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçümleri yapıldı ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden hareketle K_i sabitleri belirlendi.

Çizelge 5.38 hidrataz aktivitesi açısından incelendiğinde özellikle **3** ve **4** bileşiklerinin oldukça güçlü inhibitörler olduğu görülmektedir. Bununla birlikte meta konumunda sülfonamit grubu bulunduran **mABS**, **HmABSMAL** ve **1** bileşiklerinin hCA I ve hCA II' nin hidrataz aktivitesini inhibe etmemişlerdir. Ancak diğer meta sülfonamit türevleri olan **3** ve **5** bileşikleri ise hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Esteraz aktivitesi bakımından inceleme yapıldığında ise **4** bileşiğinin en güçlü inhibitör olduğu, hatta kontrol bileşiği olan

AAZ'den bile güçlü olduğu göze çarpmaktadır. Benzer şekilde **2** bileşiği de güçlü bir inhibitör olup **AAZ**'ye yakın bir inhibisyon potansiyeline sahiptir. Esteraz aktivitesi üzerinde tüm bileşikler etki göstermekle birlikte meta sülfonamit türevi olan **mABS** bileşiği **pABS** bileşiğinden, **HmABSMAL** bileşiği **HpABSMAL** bileşiğinden daha zayıf inhibisyon etkisine sahiptir. Ayrıca para sülfonamit türevleri olan **2** ve **4** bileşikleri meta sülfonamit türevleri olan **1**, **3** ve **5** bileşiklerinden daha güçlü inhibitör özellik göstermişlerdir. Özetle hCA I ve hCA II esteraz aktivitesi üzerinde para sülfonamit türevlerinin daha baskın olduğu görülmektedir. Bileşiklerin K_i değerlerindeki değişimin de esteraz IC_{50} değerleri ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Ayrıca inhibitör etkiye sahip tüm bileşikler hCA II izoenzimini hCA I den daha güçlü bir şekilde inhibe etmişlerdir.

Özetle yeni sentezlenen inhibitör bileşikler, oldukça güçlü inhibitörler olup glokom tedavisi için daha ileri çalışmalar olan *in vivo* çalışmalarda kullanılmaya aday bileşiklerdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aggarwal, M., Kondeti, B., Mc Kenna, R. (2013). Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 23, 717-724.
- Alkan, Z., İlkimen, H., Yenikaya, C., Kaygısız, Y., Bülbül, M., Tunç, T., Sarı, M. (2016). A novel proton transfer salt of 2-amino-6-sulfamoylbenzothiazole and its metal complexes: the evaluation of their inhibition effects on human cytosolic carbonic anhydrases. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 32(1), 231-239.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C.T., De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem. Rev.*, 112, 4421-4468.
- Alterio, V., Langella, E., Viparelli, F., Vullo, D., Ascione, G., Dathan, N.A., Morel, F.M.M., Supuran, C.T., De Simone, G., Monti, S.M. (2012). Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CdCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie*, 94, 1232-1241.
- Andersson, B., Nyman, P.O., Strid, L. (1972). Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 670-677.
- Armstrong, J., Mc, D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T. (1966). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137-5149.
- Arslan, O. (2003). *Biyomoleküller Teori ve Uygulamalarıyla*, Balıkesir.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ. (1997). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Tr. J. of Med. Sci.*, 27, 559.
- Basnyat, B., Gertsch, J.H., Johnson, E.W., Castro-Marin, F., Inoue, Y., Yeh, C. (2003). Efficacy of low-dose acetazolamide (125 mg BID) for the prophylaxis of acute mountain sickness: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *High. Alt. Med. Biol.*, 4, 45-52.
- Becker, B. (1955). The mechanism of the fall in intraocular pressure by the carbonic anhydrase inhibitor Diamox. *Am. J. Ophthalmol.*, 39, 177-183.
- Bertucci, A., Moya, A., Tambutté, S., Allemand, D., Supuran, C.T., Zoccola, D. (2013). Carbonic anhydrases in anthozoan corals-a review. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 1437-1450.
- Bourne, R.R., Stevens, G.A., White, R.A., Smith, J.L., Flaxman, S.R., Price, H., Jonas, J.B., Keefe, J., Leasher, J., Naidoo, K., Pesudovsk, K., Resnikoff, S., Taylor, H.R. (2013). Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. *Lancet Glob. Health*, 1(6), 339-349.
- Bourne, R.R.A., Taylor, H.R., Flaxman, S.R., Keefe, J., Leasher, J., Naidoo, K., Pesudovs, K., White, R.A., Wong, T.Y., Resnikoff, S., Jonas, J.B. (2010). Number of People Blind or Visually Impaired by Glaucoma Worldwide and in World Regions 1990 – 2010: A Meta-Analysis. *Plos One*, 11(10), DOI: 10.1371/journal.pone.0162229.
- 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, 248-254.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carta, F., Aggarwal, M., Maresca, A., Scozzafava, A., McKenna, R., Masini, E., Supuran, C.T. (2012). Dithiocarbamates strongly inhibit carbonic anhydrases and show antiglaucoma action in vivo. *J. Med. Chem.*, 55, 1721-1730.
- Carta, F., Innocenti, A., Hall, R.A., Mühlischlegel, F.A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2011). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the b-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with branched aliphatic-/aromatic carboxylates and their derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 2521-2526.
- Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2012). Novel coumarins and 2-thioxo-coumarins as inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 2266-2273.
- Carta, F., Maresca, A., Suarez Covarrubias, A., Mowbray, S.L., Jones, T.A., Supuran, C.T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Characterization and inhibition studies of the most active b-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*, Rv3588c. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 6649-6654.
- Carta, F., Supuran, C.T. (2013). Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005–2013). *Expert Opin. Ther. Pat.*, 23 681-691.
- Carta, F., Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2012). Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007–2011. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, 22, 79-88.
- Carta, F., Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Kaila, K., Supuran, C.T., (2010), Polyamines inhibit carbonic anhydrases by anchoring to the zinc-coordinated water molecule, *J. Med. Chem.* 53, s.5511-5522.
- Chang, X., Zheng, Y., Yang, Q. (2012). Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res. Ther.*, 14, 176.
- Chauhan, B.C., O’Leary, N., Almobarak, F.A., Reis, A.S., Yang, H., Sharpe, G.P., Hutchison, D.M., Nicolel, M.T., Burgoyne, C.F. (2013). Enhanced detection of open-angle glaucoma with an anatomically accurate optical coherence tomography-derived neuroretinal rim parameter. *Ophthalmology*, 120(3), 535-543.
- Clare, B. W., Supuran, C.T. (2006). A perspective on quantitative structure–activity relationships and carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2, 113-137.
- Conroy, C.V. (1997). Sulfonamides do not reach the retina in therapeutic amounts after topical application to the cornea. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 13, 465-472.
- Cuatrecasas, P. (1970). Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059-3065.
- Datta, R., Waheed, A., Bonapace, G., Shah, G.N., Sly, W.S. (2009). Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis-inducing mutations in carbonic anhydrase IV. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, 3437-3442.
- De Simone, G., Alterio, V., Supuran, C.T. (2013). Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert. Opin. Drug Discov.*, 8, 793-810.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Simone, G., Di Fiore, A., Supuran, C.T. (2008). Are Carbonic Anhydrase Inhibitors Suitable for Obtaining Antiobesity Drugs? *Curr. Pharm. Des.*, 14, 655-660.
- De Simone, G., Supuran, C.T. (2007). Antiobesity Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 879-884.
- De Simone, G., Supuran, C.T. (2012). (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J. Inorg. Biochem.*, 111, 117-129.
- Del Giudice, R., Monti, D.M., Truppo, E., Arciello, A., Supuran, C.T., De Simone, G., Monti, M.S. (2013). Human carbonic anhydrase VII protects cells from oxidative damage. *Biol. Chem.*, 394, 1343-1348.
- Del Prete, S., Vullo, D., Scozzafava, A., Capasso, C., Supuran, C.T. (2014). Cloning, characterization and anion inhibition study of the d-class carbonic anhydrase (TweCA) from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 531-537.
- Deutsch, H.F. (1987). Carbonic anhydrase. *Int. J. Biochem.*, 19, 101-113.
- Di Fiore, A., Monti, S.M., Hilvo, M., Parkkila, S., Romano, V., Scaloni, A., Pedone, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T., De Simone, G. (2009). Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. *Proteins*, 74, 164-175.
- Di Fiore, A., Truppo, E., Supuran, C.T., Alterio, V., Dathan, N., Botorabi, F., Parkkila, S., Monti, S.M., De Simone, G. (2010). Crystal structure of the C183S/C217S mutant of human CA VII in complex with acetazolamide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 5023-5026.
- Fabrizi F, Mincione F, Somma T, Scozzafava G, Galassi F, Masini E, Impagnatiello, F., Supuran, C.T. (2012). A new approach to antiglaucoma drugs: carbonic anhydrase inhibitors with or without NO donating moieties. Mechanism of action and preliminary pharmacology. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 27, 138-147.
- Gambhir, K.K., Ornasir, J., Headings, V., Bonar, A. (2007). Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. *Biochem. Genet.*, 45, 431-439.
- Gao, B.B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S.J., Srinivasan, V.J., Wojtkowski, M., Fujimoto, J.J., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Bursell, S.E., Aiello, L.P., Feener, E.P. (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat. Med.*, 13, 181-188.
- Garway-Heath, D.F., Crabb, D.P., Bunce, C., Lascaratos, G., Amalfitano, F., Anand, N., Azuara-Blanco, A., Bourne, R.R., Broadway, D.C., Cunliffe, I.A., Diamond, J.P., Fraser, S.G., Ho, T.A., Martin, K.R., McNaught, A.I., Negi, A., Patel, K., Russell, R.A., Shah, A., Spry, P.G., Suzuki, K., White, E.T., Wormald, R.P., Xing, W., Zeyen, T.G. (2015). Latanoprost for open-angle glaucoma (UKGTS): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet*, 385(9975), 1295-1304.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güzel, Ö., Maresca, A., Scozzafava, A., Salman, A., Balaban, A.T., Supuran, C.T. (2009). Discovery of low nanomolar and subnanomolar inhibitors of the mycobacterial b-carbonic anhydrases Rv1284 and Rv3273. *J. Med. Chem.*, 52, 4063-4067.
- Hall, T.J., Higgins, W., Tardif, C., Chambers, T.J. (1991). A comparison of the effects of inhibitors of carbonic anhydrase on osteoclastic bone resorption and purified carbonic anhydrase isozyme II. *Calcif. Tissue Int.*, 49, 328-332.
- Heijl, A., Leske, M.C., Bengtsson, B., Hyman, L., Bengtsson, B., Hussein, M. (2002). Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch. Ophthalmol.*, 120(10), 1268-1279.
- Hen, N., Bialer M, Yagen B, Maresca A, Aggarwal M, Robbins AH, McKenna, R., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2011). Anticonvulsant 4-aminobenzenesulfonamide derivatives with branched-alkylamide moieties: x-ray crystallography and inhibition studies of human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII, and XIV. *J. Med. Chem.*, 54, 3977-3981.
- Henriques, O.M. (1928). Über die gesch windigkeiten der anhydrierung bzw. Der hydratisierung der kohlen saurekom ponenten im blute. *Biochemische. Zeitschrift.*, 200, 1-4.
- Hilvo, M., Innocenti, A., Monti, S.M., De Simone, G., Supuran, C.T., Parkkila, S. (2008). Recent advances in research on the most novel carbonic anhydrases, CA XIII and XV. *Curr. Pharm. Des.*, 14, 672-678.
- Imtaiyaz Hassan, M., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., Sly, W.S. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 1570-1582.
- Innocenti, A., Supuran, C.T. (2010). Paraoxon, 4-nitrophenyl phosphate and acetate are substrates of α - but not of β -, γ - and ζ -carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 6208-6212.
- İlksen, H., Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., Tunca, E., Dal, H., Baş, M. (2015). Synthesis and characterization of complexes of a novel proton transfer salt and their inhibition studies on carbonic anhydrase isoenzymes. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 30, 195-203.
- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors: interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 1583-1587.
- Jönsson, B.M., Håkansson, K., Liljas, A. (1993). The structure of human carbonic anhydrase II in complex with bromide and azide. *FEBS Lett.*, 322, 186-190.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, M.A. (2006). *Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.*
- Kandel, M., Gonall, A.G., Wong, S., Kondel, S.I. (1970). Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. *J. Biol. Chem.*, 245, 2444-2450.
- Kass, M.A., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., Johnson, CA, Keltner, J.L., Miller, J.P. (2002). The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, 120(6), 701-713.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kayser, B., Dumont, L., Lysakowski, C., Combescure, C., Haller, G., Tramèr, M.R. (2012). Reappraisal of acetazolamide for the prevention of acute mountain sickness: a systematic review and meta-analysis. *High. Alt. Med. Biol.*, 13, 82-92.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ. (2004). *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Ankara.*
- Kenny, A.D. (1985). Role of carbonic anhydrase in bone: plasma acetazolamide concentrations associated with inhibition of bone loss. *Pharmacology*, 31, 97-107.
- Kinsey, V.E. (1953). Comparative chemistry of aqueous humor in posterior and anterior chambers of rabbit eye. *Arch. Ophthalmol.*, 50, 401-417.
- Kohn, J., Wilchek, M.A. (1978). Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 84, 7-14.
- Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R. (2008). Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chem. Rev.*, 108, 946-1051.
- Laemmli, D.K. (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G., Milanese, C. (1997). Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 38, 169-172.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., (2005), *Principles of Biochemistry*, (çev: Kılıç, N.), Palme Yayıncılık, Ankara.
- Lehtonen, J.M., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivelä, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S. (2004). Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J. Biol. Chem.*, 279, 2719-2727.
- Liljas, A., Håkansson, K., Jonsson, B.H., Xue, Y. (1994). Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. Recent crystallographic analyses. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10.
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Ther.*, 74, 1-20.
- Loewen, N.A., Zhang, X., Tan, O., Francis, B.A., Greenfield, D.S., Schuman, J.S., Varma, R., Huang, D. (2015). Combining measurements from three anatomical areas for glaucoma diagnosis using Fourier-domain optical coherence tomography. *Br. J. Ophthalmol.*, 99(9), 1224-1229.
- Lowe, N., Brady, H.J., Barlow, J.H., Sowden, J.C., Edwards, M., Butterworth, P.H. (1990). Structure and methylation patterns of the gene encoding human carbonic anhydrase I. *Gene*, 93, 277-283.
- Maren, T.H. (1960). A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26-29.
- Maren, T.H. (1967). Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47(4), 595-781.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maren, T.H., Jankowska, L., Sanyal, G. (1983). Edelhauser HF. The transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion. *Exp. Eye Res.*, 36, 457-480.
- Masini, E., Carta, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2013). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 23, 705-716.
- Matsui, H., Murakami, M., Wynns, G.C., Conroy, C.W., Mead, A., Maren, T.H., Sears, M.L. (1996). Membrane carbonic anhydrase (IV) and ciliary epithelium. Carbonic anhydrase activity is present in the basolateral membranes of the non-pigmented ciliary epithelium of rabbit eyes. *Exp. Eye Res.*, 62, 409-417.
- Meldrum, N.U., Roughton, F.J.W. (1932). Some properties of carbonic anhydrase, the CO₂ enzyme present in blood. *J. Physiol.*, 75, 15-16.
- Minakuchi, T., Nishimori, I., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). Molecular cloning, characterization and inhibition studies of the Rv1284 b-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* with sulfonamides and a sulfamate. *J. Med. Chem.*, 52, 2226-2232.
- Mincione, F., Benedini, F., Biondi, S., Cecchi, A., Temperini, C., Formicola, G., Paciolo, I., Scozzafava, A., Masini, E., Supuran, C.T. (2011). Synthesis and crystallographic analysis of new sulfonamides incorporating NO-donating moieties with potent antiglaucoma action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 3216-3221.
- Mincione, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2008). The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Curr. Pharm. Des.*, 14, 649-654.
- Mincione, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors as ophthalmologic drugs. In: Supuran CT, Winum J-Y editors. *Drug design of zinc-enzyme inhibitors: functional, structural, and disease applications*. Wiley New Jersey.
- Monti, S.M., Supuran, C.T., De Simone, G. (2013). Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008–2013). *Expert Opin. Ther. Pat.*, 23, 737-749.
- Murray, K.R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2004). *Harper Biyokimya*, (çev: N. Dikmen., T. Özgünen.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Neri, D., Supuran, C.T. (2011). Interfering with pH regulation in tumors as a therapeutic strategy. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 10, 767-777.
- Netland, P.A. (2008). *Glaucoma medical therapy*, Oxford University Press Inc., New York.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Maresca, A., Carta, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2010). The b-carbonic anhydrases from *Mycobacterium tuberculosis* as drug targets. *Curr. Pharm. Des.*, 16, 3300-3309.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with anions. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 24, 70-76.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 7229-7236.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization, and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitor. *J. Med. Chem.*, 50, 381-388.
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Vullo, D., Scozzafava, A., Innocenti, A., Supuran, C.T. (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization, and inhibition studies of a new b-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.*, 52, 3116-3120.
- Nishimori, I., Onishi, S., Takeuchi, H., Supuran, C.T. (2008). The a and b classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets. *Curr. Pharm. Des.*, 14, 622-630.
- Oksala, N., Levula, M., Pelto-Huikko, M., Kytömäki, L., Soini, J.T., Salenius, J., Kähönen, M., Karhunen, P.J., Laaksonen, R., Parkkila, S., Lehtimäki, T. (2010). Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques-Tampere Vascular Study. *Ann. Med.*, 42, 360-370.
- Pan, J., Lau, J., Mesak, F., Hundal, N., Pourghiasian, M., Liu, Z., Bénard, F., Dedhar, S., Supuran, C.T., Lin, K.S. (2014). Synthesis and evaluation of 18F-labeled carbonic anhydrase IX inhibitors for imaging with positron emission tomography. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 29, 249-255.
- Pan, P., Vermelho, A.B., Capaci Rodrigues, G., Scozzafava, A., Tolvanen, M.E., Parkkila, S., Capasso, C., Supuran, C.T. (2013). Cloning, characterization, and sulfonamide and thiol inhibition studies of an a-carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *J. Med. Chem.*, 56(4), 1761-1771.
- Parkkila, S., Innocenti, A., Kallio, H., Hilvo, M., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian a-carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 4102-4106.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran C.T. (2004). Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 19, 199-229.
- Pastorekova, S., Zatovicova, M., Pastorek, J. (2008). Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition. *Curr. Pharm. Des.*, 14, 685-698.
- Pierce, W.M., Nardin, G.F., Fuqua, M.F., Sabah-Maren, E., Stern, S.H. (1991). Effect of chronic carbonic anhydrase inhibitor therapy on bone mineral density in white women. *J. Bone Miner Res.*, 6, 347-354.
- Pinard, M.A., Boone, C.D., Rife, B.D., Supuran, C.T., McKenna, R. (2013). Structural study of interaction between brinzolamide and dorzolamide inhibition of human carbonic anhydrases. *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 7210-7215.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H., Edsall, J.T. (1964). Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes. *J. Biol. Chem.*, 239, 1065-1078.
- Ridderstråle, Y., Fierke, C.A., Roush, E.D., Wistrand, P.J. (2002). Localization of a protein inhibitor of carbonic anhydrase in pig tissues. *Acta Physiol. Scand.*, 176, 27-31.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Roy, P., Reavey, E., Rayne, M., Roy, S., Abed El Baky, M., Ishii, Y., Bartholomew, C. (2010). Enhanced sensitivity to hydrogen peroxide-induced apoptosis in Evi1 transformed Rat1 fibroblasts due to repression of carbonic anhydrase III. *FEBS Journal*, 277, 441-452.
- Schlicker, C., Hall, R.A., Vullo, D., Middelhauf, S., Gertz, M., Supuran, C.T., Mühlischlegel, F.A., Steegborn, C. (2009). Structure and inhibition of the CO₂-sensing carbonic anhydrase Can2 from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J. Mol. Biol.*, 385, 1207-1220.
- Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2014). Glaucoma and the applications of carbonic anhydrase inhibitors. In: McKenna R, Frost S, editors. *Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Scozzafava, A., Conway, J. (2004). *Carbonic anhydrase: its inhibitors and activators*, CRC Press, Boca Raton.
- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, 16, 1627-1664.
- Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Supuran, C.T. (2002). Carbonic anhydrase inhibitors. A general approach for the preparation of water soluble sulfonamides incorporating polyamino-polycarboxylate tails and of their metal complexes possessing long lasting, topical intraocular pressure lowering properties. *J. Med. Chem.*, 45, 1466-1476.
- Scozzafava, A., Supuran, C.T., Carta, F. (2013). Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 23, 725-735.
- Segel, H.I. (1976). *Biochemical Calculations*, John Wiley and Sons, USA.
- Skaat, A., De Moraes, C.G., Bowd, C., Sample, P.A., Girkin, C.A., Medeiros, F.A., Ritch, R., Weinreb, R.N., Zangwill, L.M., Liebman, J.M. (2016). African Descent and Glaucoma Evaluation Study (ADAGES). *Ophthalmology*, 123(7), 1476-1483.
- Sly, W.S., Hu, P.Y. (1995). Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 375-401.
- Smith, K.S., Ferry, J.G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 335-366.
- Smith, K.S., Jakubzick, C., Whittam, T.S., Ferry, J.G. (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 15184-15189.
- Soylu, T. (2001). Göz Hastalıkları ve Cerrahisi. http://doktorlar.gen.tr/web/h_glokom.htm
- Stevens, G.A., White, R.A., Flaxman, S.R., Price, H., Jonas, J.B., Keeffe, J., Leasher, J., Naidoo, K., Pesudovs, K., Resnikoff, S., Taylor, H., Bourne, R.R. (2013). Global prevalence of vision impairment and blindness: magnitude and temporal trends, 1990-2010. *Ophthalmology*, 120(12), 2377-2384.
- Sugrue, M.F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog. Retin Eye Res.*, 19, 87-112.
- Supuran, C.T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 27, 759-772.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 23, 146-189.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. (2004). Development of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors (CAIs). In: Supuran CT, Scozzafava A, Conway J editors. *Carbonic anhydrase-its inhibitors and activators*, CRC Press, Boca Raton.
- Supuran, C.T., Di Fiore, A., De Simone, G. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 13, 383-392.
- Supuran, C.T. (2007). Carbonic Anhydrases as Drug Targets - An Overview. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 825-833.
- Supuran, C.T. (2008a). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 7, 168-181.
- Supuran, C.T. (2008b). Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr. Pharm. Des.*, 14, 641-648.
- Supuran, C.T. (2011a). Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Front. Pharmacol.*, 2, 1-6.
- Supuran, C.T. (2011b). Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future Med. Chem.*, 3, 1165-1180.
- Supuran, C.T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 27, 759-772.
- Supuran, C.T., Di Fiore, A., Alterio, V., Monti, S.M., De Simone, G. (2010). Recent advances in structural studies of the carbonic anhydrase family: the crystal structure of human CA IX and CA XIII. *Curr. Pharm. Des.*, 16, 3246-3254.
- Supuran, C.T., Di Fiore, A., De Simone, G. (2008). Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin. Emerg. Drugs*, 13, 383-392.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2000). Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1,3,4-thiadiazole-2 sulfonamide derivatives as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 35(9), 867-874.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2001). Carbonic Anhydrase Inhibitors,. *Curr. Med. Chem.*, 1, 61-97.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 4336-4350.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.*, 23, 146-189.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2000). Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert. Opin. Ther. Targets*, 10, 575-600.
- Swenson, E.R., Teppema, L.J. (2007). Prevention of acute mountain sickness by acetazolamide: as yet an unfinished story. *J. Appl. Physiol.*, 102, 1305-1307.
- Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Imada, K., Oda, Y., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S., Ono, M. (2012). Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol.*, 2012, 1-10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takeuchi, R., Matsuda, H., Yonekura, Y., Sakahara, H., Konishi, J. (1997). Non-invasive quantitative measurements of cerebral blood flow using technetium-99m-l,l-ECD SPECT activated with acetazolamide: quantification analysis by equal-volume-split 99mTc-ECD consecutive SPECT method. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17, 1020-1032.
- Tang, Y., Xu, H., Du, X., Lit, L., Walker, W., Lu, A., Ran, R., Gregg, J.P., Reilly, M., Pancioli, A., Khoury, J.C., Sauerbeck, L.R., Carrozzella, J.A., Spilker, J., Clark, J., Wagner, K.R., Jauch, E.C., Chang, J.D., Verro, P., Broderick, J.P., Sharp F.R. (2006). Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 26, 1089-1102.
- Tars, K., Vullo, D., Kazaks, A., Leitans, J, Lends A, Grandane A, Zalubovskis, R., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2013). Sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2- dioxides): a class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases. *J. Med. Chem.*, 56, 293-300.
- Temizkan, G., Arda, N. (2004). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Tham, Y.C., Li, X., Wong, T.Y., Ouigley, H.A., Aung, T., Cheng, C.Y. (2014). Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*, 121, 2081-2090.
- Thiry, A., Dogne, J.M., Masereel, B., Supuran, C.T. (2006). Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 566-573.
- Thiry, A., Dogné, J.M., Supuran, C.T. (2008). Masereel B. Anticonvulsant sulfonamides/sulfamates/sulfamides with carbonic anhydrase inhibitory activity: drug design and mechanism of action. *Curr. Pharm. Des.*,14, 661-671.
- Voet, D., Voet, J.G. (2004). *Biochemistry*, John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Vullo, D., Nishimori, I., Minakuchi, T., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2011). Inhibition studies with anions and small molecules of two novel b-carbonic anhydrases from the bacterial pathogen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 3591-3195.
- Wilbur, K.M., Anderson, N.G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 176, 147-154.
- Winum, J.Y., Rami, M., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med. Res. Rev.*, 28, 445-463.
- Winum, J., Rami, M., Scozzafava, A., Montero, J., Supuran, C.T. (2008). Carbonic anhydrase IX: A new druggable target for the design of antitumor agents. *Med. Res. Rev.*, 28, 445-463.
- Winum, J., Scozzafava, A., Montero, J., Supuran, C.T. (2006). New Zinc Binding Motifs in the Design of Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Med. Chem.*, 6, 921-936.
- Winum, J.Y., Kohler, S., Supuran, C.T. (2010). *Brucella* carbonic anhydrases: new targets for designing anti-infective agents. *Curr. Pharm. Des.*,16, 3310-3316.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.T. (2008). Design of zinc binding functions for carbonic anhydrase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.*, 14, 615-621.
- Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P.D., Shi, Y., Morel, F.M. (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452, 56-61.
- Yenikaya, C., İlkimen, H., Demirel, M.M., Ceyhan, B., Bülbül, M., Tunca, E. (2016). Preparation of two maleic acid sulfonamide salts and their copper(II) complexes and antiglaucoma activity studies. *J. Braz. Chem. Soc.*, 27, 1706-1714.
- Yu, M., Lin, C., Weinreb, R.N., Lai, G., Chiu, V., Leung, C.K. (2016). Risk of visual field progression in glaucoma patients with progressive retinal nerve fiber layer thinning: a 5-year prospective study. *Ophthalmology*, 123, 1201-1210.
- Zhang, X., Loewen, N., Tan, O., Greenfield, D.S., Schuman, J.S., Varma, R., Huang, D. (2016). Predicting Development of Glaucomatous Visual Field Conversion Using Baseline Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. *Am. J. Ophthalmol.*, 163, 29-37.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : TUNCA Yasemin
Doğum Tarihi ve Yeri : 22.07.1992 Burhaniye/Balıkesir
e-mail : yaseminkaygisiztunca@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2018
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2014

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI, SSCI, AHCI)

1. Alkan Alkaya, Z., İlkimen, H., Yenikaya, C., Kaygısız, Y., Bülbül, M., Tunç, T., Sarı, M. (2017). A novel proton transfer salt of 2-amino-6-sulfamoylbenzothiazole and its metal complexes: the evaluation of their inhibition effects on human cytosolic carbonic anhydrases. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32, 231-239.

Uluslararası Diğer Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Karaçam, H., Tunca, E., Kaygısız, Y., İmdat, G., Bülbül, M., (2015), Investigation of the effects of some edible mushroom extracts on human carbonic anhydrase isozymes, Hacettepe Journal of Biology & Chemistry, 43, 187-193.