

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN  
KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN  
AKTİVİTELERİ ÜZERİNE BAZI ANTİÜLSER,  
GLUKOKORTİKÖİD VE ÜROLOJİK İLAÇLARIN  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Uğur GÜLLER**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Prof. Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU  
2011  
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK  
ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ  
ÜZERİNE BAZI ANTİÜLSER, GLUKOKORTİKÖİD VE  
ÜROLOJİK İLAÇLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Uğur GÜLLER**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2011**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Antiülser, Glukokortikoid ve Ürolojik İlaçların Etkilerinin İncelenmesi

Prof.Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU danışmanlığında, Uğur GÜLLER tarafından hazırlanan bu çalışma 08/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU

İmza

Üye : Doç.Dr Orhan ERDOĞAN

İmza

Üye : Doç.Dr Şükrü BEYDEMİR

İmza

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

**Enstitü Müdürü**

Prof.Dr. Ömer AKBULUT

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi  
İNSAN ERİTROSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II  
İZOENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ANTİÜLSER, GLUKOKORTİKOİD VE  
ÜROLOJİK İLAÇLARIN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Uğur GÜLLER  
Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU

Bu çalışmada hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve bazı antiülser, glukokortikoid ve ürolojik sınıfı ilaçların enzimlerin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla hemolizat hazırlanarak Sepharose 4B L-tirozin sülfanilamid afinite kolonu kullanılarak hCA-I ve II aynı kolondan tek basamakta saflaştırıldı. İnsan eritrositlerinden CA I izoenzimi 2531,65 EÜ/mg protein spesifik aktivite, 353,58 kat ve %41,94 verimle, CA II izoenzimi 4927,01 EÜ/mg protein spesifik aktivite, 688,13 kat ve %56,62 verimle elde edildi. Daha sonra SDS-PAGE yöntemi ile saflaştırılan izoenzimlerin saflığı kontrol edilerek inhibisyon çalışmaları yapıldı. İzoenzimlerin aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Famotidin, hiyosin-N-butil bromür, nizatidin, omeprazol sodyum, pantoprazol sodyum, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyum antiülser ilaçlarının hCA I'in hidrataz aktivitesinde IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,09; 3,15; 1,85; 0,65; 0,24; 2,02 ve 1,125 mM olarak hCA II'nin ise famotidin 0,292; nizatidin 4,17; ranitidin HCl 3,15 ve esomeprazol sodyum 2,26 mM olarak bulundu. Hiyosin-N-butil bromür, omeprazol sodyum ve pantoprazol sodyumun ise hidrataz aktivitesinde hCA II üzerine inhibisyon etkisi olmadığı belirlendi. Hidrataz metodunda glukokortikoidlerin hCA I için IC<sub>50</sub> değerleri budesonid 0,08; deksametazon sodyum fosfat 0,344; metilprednizolon sodyum süksinat 0,998 ve prednizolon 3,24 mM olarak bulunmasına karşın flutikazon propiyonat ve metilprednizolon asetat düzenli inhibisyon göstermediği gözlemlendi. hCA II için sadece metilprednizolon sodyum süksinatın 1,82 mM IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu, diğer glukokortikoidlerin ise düzenli inhibisyonu olmadığı belirlendi. Ürolojik ilaçlardan levofloksasinin hidrataz metodunda hCA I ve hCA II için sırasıyla 0,52 ve 0,886 mM IC<sub>50</sub> değerine sahip olduğu, neostigmin metil sülfatın ise ne hidrataz nede esteraz metodunda düzenli inhibisyonu olmadığı belirlendi. Esteraz aktivitesinde antiülser ilaçlardan famotidin ve hiyosin N-butil bromürün hCA I için IC<sub>50</sub> değeri 0,29 ve 7,7 mM ve K<sub>i</sub> değerleri 0,177±0,04 ve 2,19±0,302 mM olarak ve hCA II için famotidin için IC<sub>50</sub> değeri 0,93 mM ve K<sub>i</sub> 0,431±0,10 mM olarak bulundu. Esomeprazol sodyumun esteraz metodunda her iki enzimi de aktive ettiği diğer antiülserlerin ise düzenli inhibisyonu olmadığı tespit edildi. İnhibisyon gösteren antiülserlerin inhibisyon türleri ise yarışmalı olarak belirlendi. Glukokortikoidlerden budesonid, flutikazon propiyonat ve metilprednizolon sodyum süksinatın hCA I için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,133; 0,03 ve 1,22 mM ve K<sub>i</sub> değerleri 0,093±0,022; 0,0365±0,016 ve 1,149±0,35 mM olarak ve hCA II için IC<sub>50</sub> değerleri 0,155; 0,054 ve 18,73 mM ve K<sub>i</sub> değerleri 0,295±0,04; 0,054±0,018 ve 11,09±5,02 mM olarak bulundu. Deksametazon sodyum fosfatın ise her iki enzimde aktive ettiği diğer glukokortikoidlerin ise düzenli inhibisyonu olmadığı tespit edildi. İnhibisyon türleri ise budesonidin yarışmasız, metilprednizolon sodyum süksinatın yarışmalı ve flutikazon propiyonatın hCA I'e yarışmalı hCA II'ye yarışmasız olarak belirlendi.

**2011, 83 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** hCA I, hCA II saflaştırma, antiülser, glukokortikoid, ürolojik, inhibisyon

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF ANTIULCER, GLUCOCORTICOIDS AND UROLOGICAL DRUGS' EFFECTS ON ACTIVITY OF CARBONIC ANHYDRASE I AND CARBONIC ANHYDRASE II PURIFIED FROM HUMAN ERYTHROCYTES

Uğur GÜLLER

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr.Ö.İrfan KÜFREYOĞLU

In this study purification of hCA I and hCA II isozymes and investigation effects of some antiulcer, glucocorticoids and urological drugs on hydrates and esterase activity of these isozymes were aimed. For this purpose hemolysate was prepared, hCA I and hCA II were purified together on single step by using Sepharose 4B L-tyrosine sulfanylamine affinity chromatography. hCA I was obtained 353.58 fold with specific activity of 2531.65 EU/mg protein and 41.94% yield, hCA II was obtained 688.13 fold with a specific activity of 4927.01 EU/mg protein and 56.62% yield. Afterwards purity of isozymes was controlled by SDS-PAGE and inhibition studies were performed. For drugs, which inhibited activities of enzymes % Activity-[inhibitor] graphs were drawn and  $I_{50}$  values were calculated. For hCA I hydrates activity  $I_{50}$  values of famotidine, hyoscine N-butyl bromide, nizatidine, omeprazole sodium, pantoprazole sodium, ranitidine HCl and esomeprazole sodium drugs were obtained as; 0.09; 3.15; 1.85; 0.65; 0.24; 2.02 and 1.125 mM and for hCA II hydrates activity  $I_{50}$  values of famotidine 0.292, nizatidine 4.17, ranitidine HCl 3.15 and esomeprazole sodium 2.26 mM had found respectively. It was determined that hyoscine N-butyl bromide, omeprazole sodium and pantoprazole sodium did not show inhibition effects on hydrates activity of hCA II. By hydrates activity,  $I_{50}$  values on hCA I of glucocorticoids were found as 0.08 for budesonide, 0.344 for dexametazon sodium phosphate, 0.998 for metylprednisolon sodium suksinat, and 3.24 mM for prednisolone. But fluticasone propionat and metilprednisolon acetate did not show regular inhibition. It was determined that for hCA II only metilprednisolon acetate had  $I_{50}$  as 1.82 mM and other glucocorticoids did not have regular inhibition effects too. It was seen that in urological drugs levofloxacin had  $I_{50}$  as 0.52 for hCA I and 0.86 mM for hCA II and neostigmine methyl sulphate did not show any inhibition effect on isozymes. It was found that  $I_{50}$  values of antiulcer drugs famotidine and hyoscine N-butyl bromide on esterase activity for CA I were 0.29 and 7.7 mM,  $K_i$  values were  $0.177 \pm 0.04$  mM and  $2.19 \pm 0.302$  mM, for hCA II  $I_{50}$  was 0.93 mM and  $K_i$  was  $0.431 \pm 0.10$  mM. esomeprazole sodium activated two enzyme in esterase activity and other antiulcers did not have inhibition. Inhibition types of antiulcers were determined as competitive. Budesonide, fluticasone propionat and metylprednisolon sodium suksinat had  $I_{50}$  values for hCA I 0.133, 0.03 and 1.22 mM,  $K_i$  values  $0.093 \pm 0.022$ ,  $0.0365 \pm 0.016$  and  $1.149 \pm 0.35$  mM and for hCA II  $I_{50}$  values 0.155, 0.054 and 18.73 mM,  $K_i$  values  $0.295 \pm 0.04$ ,  $0.054 \pm 0.018$  and  $11.09 \pm 5.02$  mM. It was found that dexametazon sodium phosphate activated both isozymes and other glucocorticoids did not have regular inhibition. Inhibition type of budesonide was uncompetitive, metilprednisolon sodium süksinat was competitive and fluticasone propionat was competitive for hCA I and uncompetitive for hCA II.

**2011, 83 pages**

**Keywords:** hCA I, hCA II purification, antiulcer, glucocorticoids, urological, inhibition

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarım esnasında bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Atatürk Üniversitesi Rektör Yardımcısı ve Fen Fakültesi Dekanı Sayın Prof.Dr. Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU'na, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla her konuda beni destekleyen tez çalışmalarını birlikte yürüttüğümüz değerli hocam Sayın Doç.Dr. Şükrü BEYDEMİR'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca katkılarından dolayı Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Sayın Prof.Dr. Hasan ÖZDEMİR'e ve Sayın Doç.Dr. İlhami GÜLÇİN'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım esnasında her türlü yardımlarını esirgemeyen Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr. Murat ŞENTÜRK'e, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'ndan çalışma arkadaşlarım Sayın Bülent ŞENGÜL, Sayın Ebru AKKEMİK, Sayın Arş. Gör. Zuhâl ALİM ve Sayın Arş. Gör Pınar TAŞER'e ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde çalışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca bu güne kadar eğitimime katkı sağlayan adını burada saymadığım tüm hocalarıma üzerimdeki emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında maddi-manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı başta ağabeyim Ali Rıza GÜLLER olmak üzere tüm aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Uğur GÜLLER

Haziran, 2011

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.2. Karbonik Anhidraz.....	8
1.3. İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan İlaçlar.....	13
1.3.1. Glukokortikoid ilaçlar.....	14
1.3.2. Antiülser ilaçlar.....	17
1.3.3. Ürolojik ilaçlar.....	19
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	22
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	26
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	26
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	27
3.1.3.a. Enzimin hidrataz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler.....	27
3.1.3.b. Enzimin esteraz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler.....	27
3.1.3.c. Afinite jeli hazırlanırken kullanılan çözeltiler.....	28
3.1.3.d. Enzimin saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler.....	28
3.1.3.e. Kantitatif protein tayininde kullanılan çözelti.....	29
3.1.3.f. SDS-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler.....	29
3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini.....	31
3.2. Yöntemler.....	31
3.2.1. Afinite jelinin hazırlanması.....	31

3.2.1.a.	Afinite kolonunun paketlenmesi.....	32
3.2.2.	Enzim saflaştırma çalışmaları.....	33
3.2.2.a.	Hemolizatin hazırlanması.....	33
3.2.2.b.	Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu.....	33
3.3.	Enzim Aktivitesi Tayini.....	34
3.3.1.	Hidrataz aktivitesi .....	34
3.3.2.	Esteraz aktivitesi.....	35
3.4.	Protein Tayini.....	37
3.4.1.	Kalitatif protein tayini.....	37
3.4.2.	Kantitatif protein tayini.....	37
3.5.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroföresi İle Enzim Saflığının Kontrolü.....	38
3.6.	hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Antiülser, Glukokortikoid ve Ürolojik Sınıftaki İlaçların Etkilerinin Belirlenmesi	39
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>41</b>
4.1.	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik.....	41
4.2.	İnsan Eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin afinite kolonu kullanarak saflaştırılması sonuçları .....	41
4.2.1.	İnsan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları.....	42
4.2.2.	SDS-PAGE sonuçları.....	44
4.3.	İnsan Eritrosit CA-I ve CA-II İzoenzimleri İle İlgili Yapılan Kinetik Çalışmaların Sonuçları.....	44
4.3.1.	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine antiülser ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	44
4.3.1.a.	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri kullanılarak antiülser ilaçların IC <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları.....	45
4.3.1.b.	hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren antiülser ilaçların K <sub>i</sub> sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....	51
4.3.2.	hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine glukokortikoid	

ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	53
4.3.2.a. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri kullanılarak glukokortikoid ilaçların IC <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları.....	53
4.3.2.b. hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren glukokortikoid ilaçların K <sub>i</sub> sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları.....	58
4.3.3. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine ürolojik ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları.....	61
4.3.3.a. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri kullanılarak ürolojik ilaçların IC <sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları.....	62
4.4. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antiülser, glukokortikoid ve ürolojik ilaçlarının IC <sub>50</sub> ve K <sub>i</sub> değerlerinin belirlenmesi ile ilgili toplam sonuçlar	63
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	66
<b>KAYNAKLAR</b> .....	77
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	83

## SİMGELER DİZİNİ

CA	Karbonik anhidraz enzimi
E.C.	Enzim kod numarası
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
ES	Enzim substrat kompleksi
E.Ü.	Enzim Ünitesi
hCA-I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA-II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
I <sub>50</sub>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K <sub>i</sub>	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten sabiti
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum per sülfat
RNA	Ribonükleik asit
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
V <sub>max</sub>	Maksimum hız

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Lineweaver-Burk Grafiği.....	8
Şekil 1.2.	Karbonik anhidraz enziminin solunum olayındaki önemi .....	10
Şekil 1.3.	Karbondioksit ve bikarbonatın dokulardaki taşınması ve ikisi arasındaki dengenin gösterilmesi.....	11
Şekil 1.4.	Antiülser ilaçların açık yapıları .....	20
Şekil 1.5.	Glukokortikoid ilaçların açık yapıları .....	21
Şekil 1.6.	Ürolojik ilaçların açık yapıları.....	21
Şekil 3.1.	CNBr Sepharose 4B-L-tirozin afinite jeli hazırlanırken meydana gelen reaksiyonların açık gösterimi.....	31
Şekil 3.2.	<i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	35
Şekil 4.1.	Coomassie Brilliant Blue G-250 yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.....	41
Şekil 4.2.	İnsan eritrosit CA I ve II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılmasına ait elüsyon grafiği .....	42
Şekil 4.3.	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS- poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı .....	44
Şekil 4.4.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Famotidin] grafiği .....	45
Şekil 4.5.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Famotidin] grafiği .....	45
Şekil 4.6.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Hiyosin-N-butil bromür] grafiği .....	46
Şekil 4.7.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Hiyosin-N-butil bromür] grafiği.....	46
Şekil 4.8.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Nizatidin] grafiği .....	47
Şekil 4.9.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Nizatidin] grafiği .....	47

Şekil 4.10.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Omeprazol sodyum] grafiği .....	48
Şekil 4.11.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Omeprazol sodyum] grafiği .....	48
Şekil 4.12.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Pantoprazol sodyum] grafiği.....	49
Şekil 4.13.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Pantoprazol sodyum] grafiği.....	49
Şekil 4.14.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Ranitidin] grafiği.....	50
Şekil 4.15.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Ranitidin] grafiği.....	50
Şekil 4.16.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Esomeprazol sodyum] grafiği.....	51
Şekil 4.17.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Esomeprazol sodyum] grafiği.....	51
Şekil 4.18.	hCA-I enziminin üç farklı sabit famotidin konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 4.19.	hCA-II izoenziminin üç farklı sabit famotidin konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	52
Şekil 4.20.	hCA-I izoenziminin üç farklı sabit hiyosin-N-butil bromür konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 4.21.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Budesonid] grafiği.....	54
Şekil 4.22.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Budesonid] grafiği.....	54
Şekil 4.23.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Deksametazon sodyum fosfat] grafiği.....	55

Şekil 4.24.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Deksametazon sodyum fosfat] grafiği.....	55
Şekil 4.25.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Flutikazon propiyonat] grafiği.....	56
Şekil 4.26.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Flutikazon propiyonat] grafiği.....	56
Şekil 4.27.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Metilprednizolon asetat] grafiği.....	57
Şekil 4.28.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Prednizolon] grafiği.....	57
Şekil 4.29.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Metilprednizolon sodyum süksinat] grafiği.....	58
Şekil 4.30.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Metilprednizolon sodyum süksinat] grafiği.....	58
Şekil 4.31.	hCA-I izoenziminin üç farklı sabit metilprednizolon sodyum süksinat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	59
Şekil 4.32.	hCA-II izoenziminin üç farklı sabit metilprednizolon sodyum süksinat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	59
Şekil 4.33.	hCA-I enziminin üç farklı sabit budesonid konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 4.34.	hCA-II enziminin üç farklı sabit budesonid konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 4.35.	hCA-I enziminin üç farklı sabit flutikason propionat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	61
Şekil 4.36.	hCA-II enziminin üç farklı sabit flutikason propionat konsantrasyonu	

	ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	61
Şekil 4.37.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Neostigmin metil sülfat] grafiği.....	62
Şekil 4.38.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Neostigmin metil sülfat] grafiği.....	62
Şekil 4.39.	hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (%) Aktivite-[Levofloksasin] grafiği.....	63
Şekil 5.1.	CA inhibitörlerinin bağlanma modelleri.....	73

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	3 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin miktarları.....	35
Çizelge 3.2.	1 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin miktarları.....	36
Çizelge 4.1.	İnsan eritrositlerinden elde edilen hemolizattan afinite kromatografisi ile CA-I ve CA-II izoenzimlerinin saflaştırma sonuçları.....	43
Çizelge 4.2.	hCA-I ve II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlarının %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC <sub>50</sub> değerleri).....	64
Çizelge 4.3.	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antiülser ve glukokortikoid ilaçların K <sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon türleri.....	65
Çizelge 5.1.	hCA-I ve II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlarının %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC <sub>50</sub> değerleri).....	76
Çizelge 5.2.	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antiülser ve glukokortikoid ilaçların K <sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon türleri.....	77

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Yaşam için gerekli koşullardan biride organizmanın yeterli ve seçici olarak kimyasal tepkimeleri katalizleme yeteneğinde olmasıdır. Bilindiği gibi canlı sistemler çevredeki enerjiyi kullanırlar. Örneğin: Oksijen varlığında sukrozun CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O ya dönüşümü oldukça ekzergonik bir süreçtir, salınan serbest enerjiyi görme, tatma, hareket ve düşünmede kullanılabilir. Bununla birlikte bir torba şeker, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O ya hiçbir dönüşüm olmaksızın yıllarca saklanabilir. Bu kimyasal süreç termodinamik olarak tercih edilir olmasına karşın çok yavaştır. Fakat sukroz insanlar tarafından tüketildiği zaman saniyeler içerisinde kimyasal enerjiyi sağlar. Fark katalizdir. Kataliz olmasaydı, yaşamın devam etmesi için gerekli olan kimyasal tepkimeler uygun zaman aralığında meydana gelmeyebilirdi (Lehninger *et al.* 2005).

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimer) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleşir. Biyomoleküllerin kararlılığı şu önemli sonucu sağlamaktadır; hücre içinde enzimi olmayan bir reaksiyon hemen hemen vuku bulmaz, kendiliğinden reaksiyonlar meydana gelmezler. Bunun anlamı, enzimler protein yapısında olduğu ve DNA tarafından şifrelendiği için, bir hücredeki tüm olaylar DNA seviyesinde düzenlenip, kontrol edilmektedir demektir. Buradan, enzimleri sadece katalizör özelliği ile nitelemenin eksik bir tanımlama olacağı anlaşılmaktadır. Gerçekten, bu moleküller, bir hücreyi diğerlerinden farklı kılan özelliklerine ait bilgilerin DNA'dan aktarılmasının en önemli araçlarıdır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler, en dikkate değer ve oldukça özellikli proteinlerdir. Enzimler çoğu kez sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha önemli olağanüstü katalitik güce sahiptir. Substratları için yüksek özgüllüğe sahiptirler, kimyasal tepkimeleri müthiş derecede hızlandırır ve pH ve sıcaklığın optimum olduğu koşullarda sıvı çözeltilerde işlev görürler. Biyolojik olmayan katalizörlerin çok azı bu özelliklerin hepsine sahiptir. Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizlerler, böylece kimyasal enerjiyi korur, dönüştürür ve basit ölçülerden biyolojik makromoleküller üretilir (Lehninger *et al.* 2005).

Bazı enzimler, enzimatik reaksiyonu için gerekli olan, bir protein olmayan kofaktörlerle birleşirler. Sıklıkla karşılaşılan kofaktörler arasında  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$  gibi metal iyonları ve koenzim olarak B12 vitamini gibi vitaminler ya da genellikle vitamin türevi olan organik moleküller yer alır. Örneğin  $NAD^+$  koenzimi niyasin,  $FAD^+$  koenzimi riboflavin içerir. Holoenzim, enzimle birlikte koenzimi, apoenzim ise holoenzimin protein kısmını ifade eder. Uygun kofaktör yoksa apoenzim biyolojik aktivite göstermez. Prostetik grup ise enzimden ayrılmayan enzimin yapısına sıkı bağlı bir koenzimdir. Örneğin; Karboksilaz enziminin üç boyutlu yapısına bağlı biyotin gibi. Enzimlerin üzerine etki ettikleri ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere substrat denir. Enzimler genelde belirli bir substratla etkileşirler, sadece tek tip kimyasal reaksiyon katalizlerler ve bu yönleriyle oldukça spesifiktirler. Birçok enzim hücre içinde farklı kısımlarda eksprese olmaktadır. Böylece bir reaksiyonun substratı ve ürünü diğer reaksiyonlardan izole olur, reaksiyon için uygun ortam sağlanmış olur ve hücredeki binlerce enzim amaca uygun olarak organize edilmiş olur (Harvey *et al.* 2007).

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir cep ya da yuva bulunur. Aktif bölge substrata komplementer olan üç boyutlu bir yüzey oluşturan aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES, sonradan enzim ve ürüne parçalanan enzim-ürüne (EP) dönüşür (Harvey *et al.* 2007).

Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre  $10^3$  ila  $10^8$  kere daha hızlı olarak oldukça etkindir. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ila 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat sayısına 'turnover sayısı' denir (Harvey *et al.* 2007).

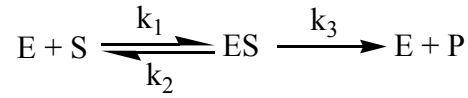
Bir kısım enzimler substrat adının sonuna '-az' son eki getirilerek adlandırılırken (örneğin üreaz) bazıları da ilk bulucuların ortaya attıkları isimlerle tanınır (örneğin tripsin). Ancak bu isimlerin çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında eksik bilgi verdiği için Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından sistematik bir sınıflandırma yapılmıştır. Ayrıca her enzim için 4 rakamlı enzim kod numarası öngörülmüştür (Lehninger *et al.* 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırılmıştır;

- 1. Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.
- 3. Hidrolazlar:** Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrid, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.
- 4. Liyazlar:** Hidrolizden farklı bir mekanizmayla substratlardan grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.
- 5. İzomerazlar:** Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.
- 6. Ligazlar:** ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim aktivitesi düzenlenebilir, yani enzimler ürün oluşum hızı ve hücrenin ihtiyacını karşılayacak şekilde aktive veya inhibe edilebilirler (Harvey *et al.* 2007).

1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten, enzimli reaksiyonların ilk basamağında bir ES oluşmasından ve enzimlerin doygunluk özelliğinden yola çıkarak, bir model geliştirdiler (Keha ve Küfrevioğlu 2009). Bu modelde, enzim substratıyla geri dönüşümlü olarak bağlanarak sonradan enzimi serbest olarak bırakarak ürüne yıkılan bir ES kompleksi meydana getirir. Bir substrat molekülünü kapsayan model aşağıda gösterilmiştir.



E: Enzim

S: Substrat

ES: Enzim-Substrat kompleksi

P: Ürün

$k_1, k_2, k_3$ : hız sabitleri

Michaelis-Menten denklemi reaksiyon hızının substrat konsantrasyonu ile nasıl değiştiğini göstermektedir.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$V_0$ = ilk hız

$V_{\max}$ = maksimum hız

$K_M$ = Michaelis-Menten sabiti=  $(k_1+k_2)/k_1$

$[S]$ = substrat konsantrasyonu

Michaelis-Menten hız denklemi kurulurken aşağıdaki varsayımlar kabul edilmiştir:

i. E ve S'in göreceli konsantrasyonları: Substrat konsantrasyonu  $[S]$ , enzim konsantrasyonundan  $[E]$ , çok daha fazladır, böylece herhangi bir zamanda enzim tarafından bağlanan substrat miktarı küçüktür.

**ii.** Denge durumu varsayımı: [ES] zamanla değişmez (denge-denge varsayımı), yani ES oluşum hızı, ES yıkım hızına (E+S ve E+P) eşittir. Genel bir kural olarak, bir reaksiyon serisindeki bir ara ürünün sentez hızı, yıkım hızına eşitse bu ara ürünün denge durumunda olduğu söylenir.

**iii.** İlk hız: Enzim reaksiyonu analizlerinde sadece ilk hızlar kullanılır, yani reaksiyonun hızı enzim ve substrat karıştırılır karıştırılmaz ölçülür. Bu esnada ürün konsantrasyonu küçüktür ve bu yüzden P'den S'ye geri dönen reaksiyon hızı ihmal edilebilir (Lehninger *et al.* 2005).

Enzimlerin  $K_M$  değerleri çok farklılık gösterir. Birçok enzim için bu değer  $10^{-1}$  ile  $10^{-6}$  M arasındadır.  $K_M$  değeri enzim konsantrasyonuna bağlı değildir. Substratın yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle değişebilir. Birden fazla substrata sahip enzimlerde, her substrat için ayrı bir  $K_M$  değeri vardır.

$K_M$  değerinin iki anlamı vardır. Birincisi;  $K_M$ , enzimin aktif bölgelerinin yarısının dolduğu substrat konsantrasyonudur. İkincisi;  $K_M$  değerinin



denklemleriyle gösterilen katalizleme mekanizması basamaklarının hız sabitleriyle ilişkisi vardır. Yukarıda  $K_M = (k_2 + k_3)/k_1$  eşitliğini gösterilmiştir.

$k_2 \gg k_3$  olduğu zaman  $K_M$ , ES'nin ayrışma sabitine eşittir. Bu durumda  $K_M$ , ES kompleksinin bir sağlamlık ölçüsüdür. Yüksek  $K_M$  zayıf bağlanmayı, düşük bir  $K_M$  kuvvetli bağlanmayı ifade eder.

$V_{max}$  enzimin katalitik aktivitesinin bir ifadesidir.  $V_{max}$  teriminin birimi ürüne çevrilen substratın mol sayısı/birim zaman'dır. Enzimlerin  $V_{max}$  değerleri de birbirlerinden çok farklıdır. Aynı zamanda substratların yapısı, pH, sıcaklık ve iyonik şiddetle de değişirler.

Enzimlerin hem "*in vivo*" hem de "*in vitro*" aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına "**inhibisyon**" adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere "**inhibitor**" denir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktiviteyi kontrol eden en küçük moleküller biyolojik sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için önemlidirler. Birçok kimyasal madde ilaç ve zehirli bileşikler de fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır.

Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur.  $V_{max}$  (enzimatik reaksiyonda ulaşılabilecek maksimum hız) azalır,  $K_M$  (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) değişmeden kalır. Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir, bunlar;

- Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon
- Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon
- Yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_M$  değeri artar.

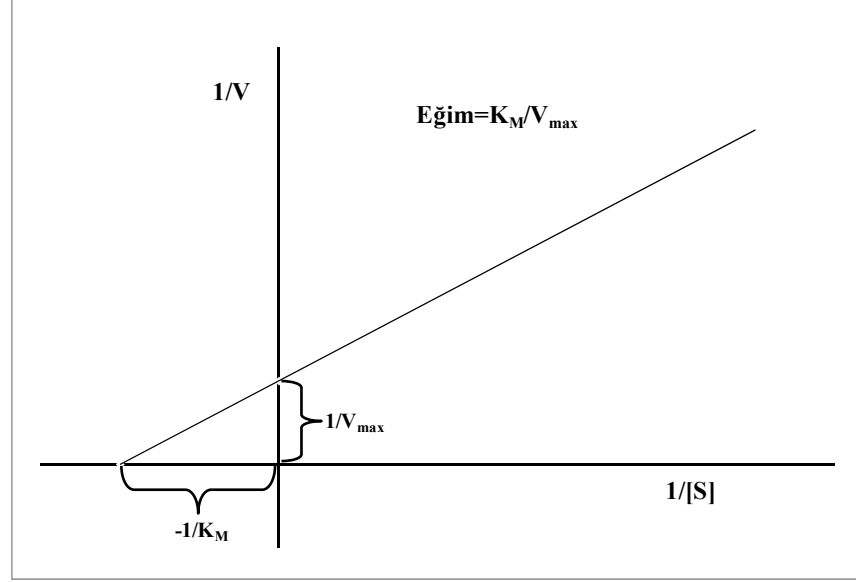
Yine dönüşümlü tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken,  $K_M$  sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında  $V_{max}$  azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla S kompleksi ortamdaki sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu dengesini daha fazla sağa kaydırır ve  $K_M$  değeri küçülür.

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir çeşidi olan lineer karışık tip inhibisyon dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir. Allosterik enzimlerin kinetiği Michaelis-Menten kinetiğinden farklılık gösterir.

İnhibisyon çeşidinin ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver-Burk grafikleridir (Şekil 1.1). Bu yöntemde  $1/V-1/[S]$  grafikleri sabit

inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilir. Kesim noktalarında değerlendirmeler yapılır (Keha ve Küfrevioğlu 2009).



Şekil 1.1. Lineweaver-Burk Grafiği (Keha ve Küfrevioğlu 2009)

## 1.2.Karbonik Anhidraz

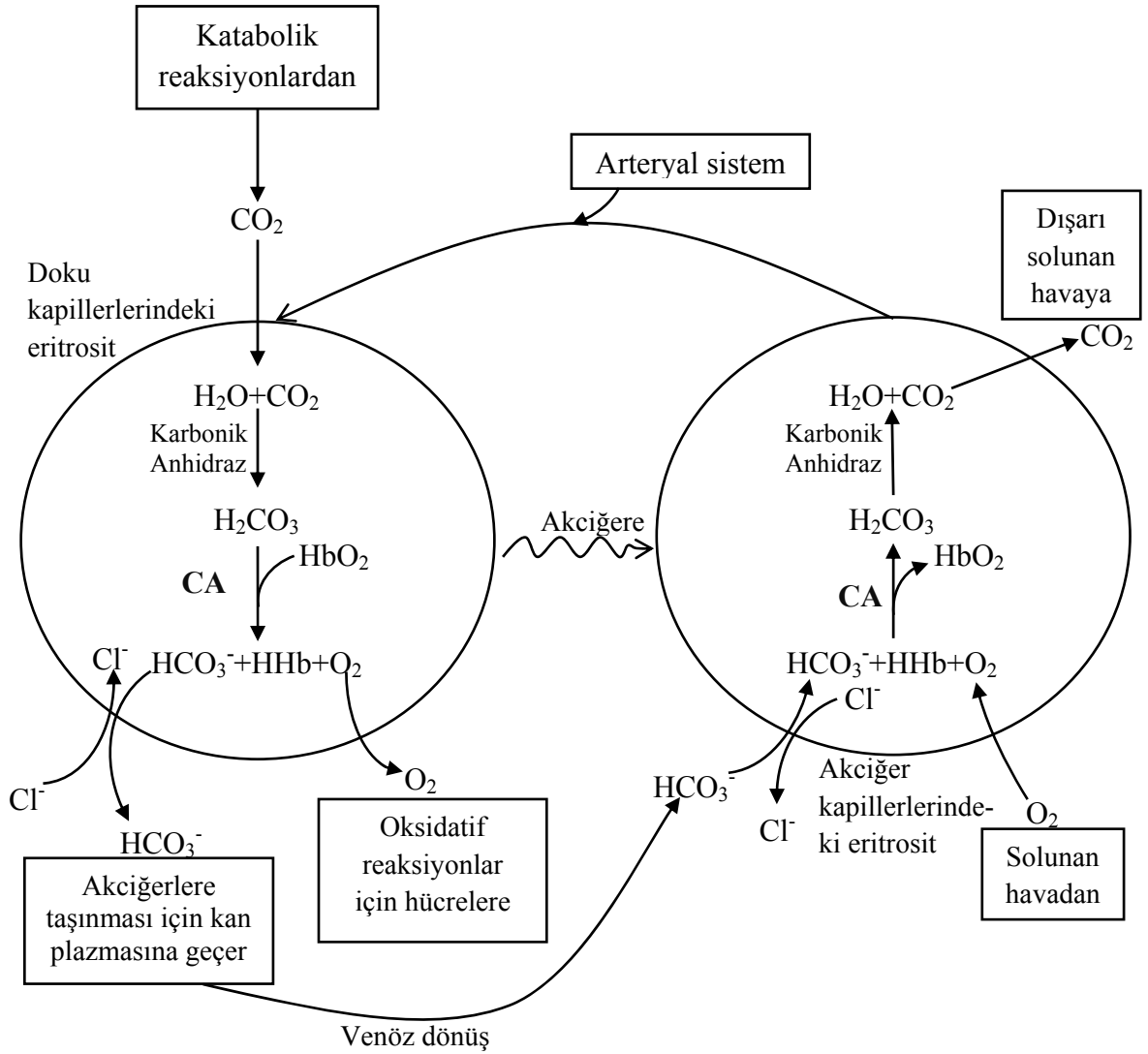
Karbonik anhidraz enzimi tüm memelilerde, alglerde ve bitkilerde bulunur. (Hewett-Emmett and Tashian 1996).



Bu reaksiyon karbonik anhidraz yokluğunda önemli oranda gerçekleşmesine rağmen katalizlenmeyen reaksiyon hızı çok yavaştır (Henry 1996). Çünkü reaktanları ve ürünleri birçok fizyolojik ve biyolojik süreç için hayati öneme sahiptir, karbonik anhidraz birçok hücre türlerinde ve dokuda bulunur ve asit-baz dengesi, iyon ve CO<sub>2</sub> taşınması, kemik absorpsiyonu, solunum, glukoneogenez ve ürogenez gibi fizyolojik ve biyolojik aktivitelerde rol oynar (Sly and Hu 1995; Henry 1996). Bu karbonik anhidrazın birçok hastalığın patalojik sürecinde önemli rol oynadığı anlamına gelir.

Karbondioksit, sulu çözeltilerde yüksek çözünürlük göstermez ve bikarbonata çevrilmezse dokularda ve kanda CO<sub>2</sub> kabarcıkları oluşacaktır. Denklemden de görüldüğü gibi CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu dokulardaki H<sup>+</sup> derişiminde artışa neden olur. Oksijenin hemoglobin tarafından bağlanması büyük ölçüde pH ve CO<sub>2</sub> derişiminden etkilenir, böylece CO<sub>2</sub> ve bikarbonat arasındaki dönüşümün oksijenin bağlanması ve kana salınmasında büyük önemi vardır. Hemoglobin dokularda oluşan total H<sup>+</sup> ve CO<sub>2</sub>'nin %20'sini akciğerlere ve böbreklere taşır. H<sup>+</sup> ve CO<sub>2</sub> bağlanması oksijen bağlanmasıyla ters orantılıdır. Periferik dokuların göreceli düşük pH ve yüksek CO<sub>2</sub> derişimlerinde H<sup>+</sup> ve CO<sub>2</sub> bağlandığı için hemoglobinin oksijene ilgisi azalır ve O<sub>2</sub> dokulara verilir. Tersine akciğer kapillerlerinde CO<sub>2</sub> atıldığı ve sonuç olarak kan pH'sı yükseldiği için hemoglobinin oksijene ilgisi artar ve periferik dokulara taşımak üzere protein daha fazla O<sub>2</sub> bağlar. pH ve CO<sub>2</sub> derişiminin oksijenin hemoglobin tarafından bağlanmasına ve salınmasına olan bu etkisi Bohr etkisi olarak adlandırılır; Danimarkalı fizyolog Christian Bohr tarafından 1904'te keşfedilmiştir. Bu da hemoglobinin O<sub>2</sub> doygunluğunun H<sup>+</sup> derişiminden etkilendiğini göstermektedir. Hem O<sub>2</sub> hem de H<sup>+</sup> hemoglobin tarafından ters ilgiyle bağlanır. Oksijen derişimi akciğerlerde olduğu gibi yüksek olduğunda hemoglobin O<sub>2</sub>'yi bağlar ve protonları serbest bırakır. Oksijen derişimi periferik dokularda olduğu gibi düşük olduğunda, H<sup>+</sup>'yi bağlar ve O<sub>2</sub>'yi serbest bırakır. Karbondioksit derişimi periferik dokularda olduğu gibi yüksek olduğunda, CO<sub>2</sub>'in bir kısmı hemoglobine bağlanır ve O<sub>2</sub>'ye ilgi azalır, salınması sağlanır. Bir polipeptid altbiriminden diğerine ligant bağlama bilgi aktarım kapasitesi, hemoglobin molekülünü eritrositlerle O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve H<sup>+</sup> taşınmasıyla bütünleşmeye çok güzel bir şekilde uyumlu bir hale getirir (Lehninger *et al.* 2005).

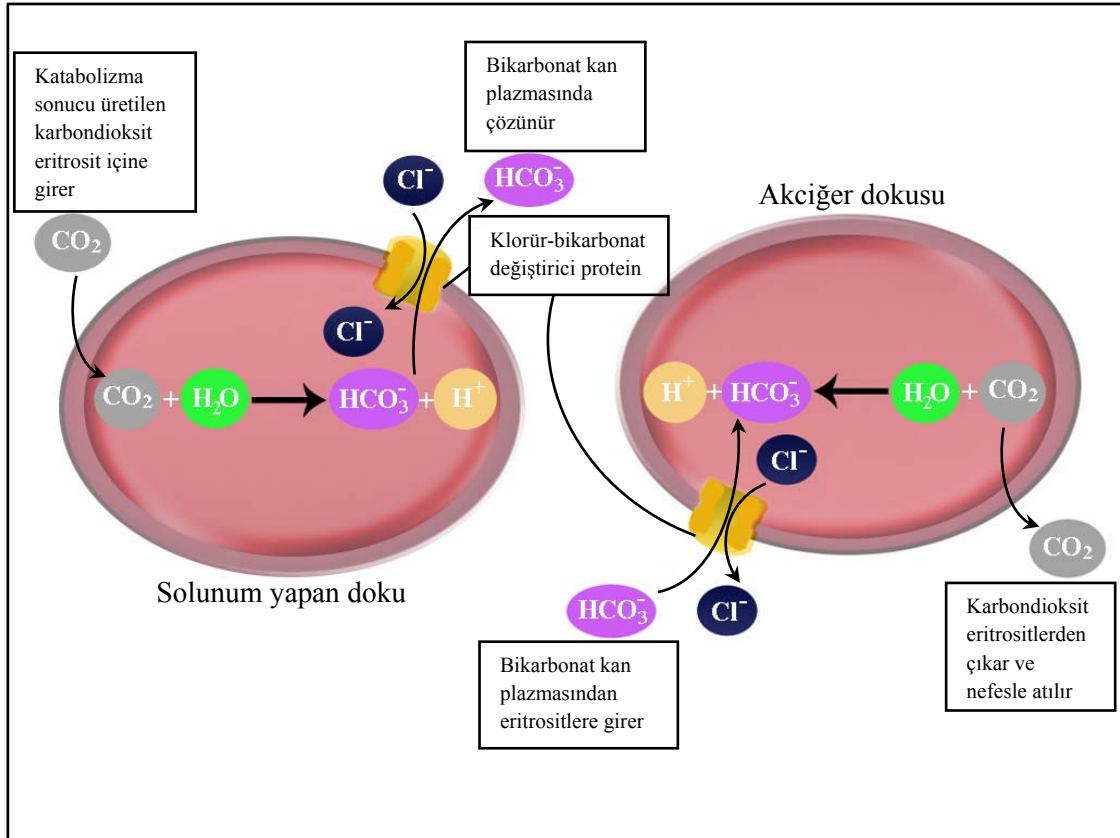
Hemoglobin hücrelerin gereksindiği yaklaşık bütün oksijeni akciğerlerden dokulara taşınmasının yanı sıra, hücresel solunumun iki son ürünü olan H<sup>+</sup> ve CO<sub>2</sub>'yi de dokulardan onların atılacağı yere, akciğerlere ve böbreklere taşır. Mitokondride organik yakıtların oksitlenmesiyle meydana gelen CO<sub>2</sub> bikarbonat oluşturmak üzere hidrate edilir (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Karbonik anhidraz enziminin solunum olayındaki önemi (Montgomery *et al.* 2000)

Canlı organizmalarda anahtar bir metabolit olan CO<sub>2</sub>'nin çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir. Ek olarak CO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ile denge halindedir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde iyi çözünür fakat lipitlerde az çözünürken CO<sub>2</sub> hem sulu çözeltilerde hem de lipitlerde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Bu yüzden CO<sub>2</sub> hücre içine ve dışına kolayca geçmesine rağmen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ün hücre membranlarından taşınması gereklidir (Şekil 1.3). pH 6,3'ün üstünde her iki tür arasındaki denge HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tarafına kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> konsantrasyonlarının sürdürülmesinde problem oluşur. Bu durumda karbonik anhidraz devreye girerek bu

problem giderilir. Çünkü fizyolojik pH da  $\text{CO}_2$  ve  $\text{HCO}_3^-$ 'ün birbirine dönüşümü çok yavaştır ve bu durumda enzimatik kataliz şarttır.  $\text{CO}_2$ 'nin  $\text{HCO}_3^-$ 'e dönüşümü  $\text{CO}_2$ 'nin hücre içinde tutulması için önemli olabilirken  $\text{HCO}_3^-$ 'ün  $\text{CO}_2$ 'ye dönüşümü  $\text{HCO}_3^-$ 'ün hücre içinde taşınmasını kolaylaştırabilir. Yani  $\text{CO}_2$ 'nin  $\text{HCO}_3^-$ 'e enzimatik dönüşümü sadece hücrenin  $\text{CO}_2$ 'yi hücrel enzimler için gerekli olan seviyeye konsantre etmesini sağlamaz aynı zamanda hücrenin, hücrel işlemler sonucunda oluşan  $\text{CO}_2$  ve  $\text{HCO}_3^-$ 'ün uygun seviyede tutulmasına yardım eder. Karbonik anhidraz  $\text{CO}_2$ 'nin  $\text{HCO}_3^-$ 'e dönüşümünü katalizleyen ve  $\text{Zn}^{2+}$  içeren bir enzimdir (Smith and Ferry 2000).



**Şekil 1.3.** Karbondioksit ve bikarbonatın dokulardaki taşınması ve ikisi arasındaki dengenin gösterilmesi

Karbonik anhidrazın hücre içi konumu, katalitik aktivitesi ve farklı inhibitörlere karşı duyarlılığına göre 16 izoenzimi tanımlanmıştır. Bu izoenzimlerden CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII stozolde, CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV membrana bağlı, CA

VA ve CA VB mitokondride ve CA VI ise tükürükte bulunur. CA XV insanlarda ya da diğer primatlarda ifade olmamaktadır. Ama kemirgenlerde ve yüksek bitkilerde boldur (Hilvo *et al.* 2005). CA bağlı proteinler olarak adlandırılan üç tane akatalitik formu da vardır (CARP VIII, CARP X ve CARP XI) (Supuran 2004).

Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları  $\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA ve  $\gamma$ -CA olmak üzere üç farklı familyada incelenmiştir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimlerin hepsinde  $Zn^{2+}$  iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapılardadır (Hewett-Emmett 2000).

Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk neredeyse molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyukun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi  $H_2O$  veya  $OH^-$  ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119 'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Ligandlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla oluşurlar (Lesburg and Christianson 1995).

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu bulunmuştur (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demir *et al.* 2001; Beydemir *et al.* 2002; Beydemir and Gülçin 2004).

İnsan eritrositlerinde karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) aktivite seviyesinin, belirli patolojik ve fizyolojik şartlar altında önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. CA aktivitesindeki değişiklikler diyabet ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklarla ilişkilidir (Parui *et al.* 1991, 1992). CA inhibisyonunun proksimat tübül lümenindeki proton salınımına zararlı olduğu ve  $HCO_3^-$  geri absorpsiyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda karbonik anhidrazın inhibisyonu idrar asitliği oranını,

alkali idrar üretimini ve metabolik asitliği azalttığı da tespit edilmiştir (Hannedoeche *et al.* 1991).

Birçok kaynaktan saflaştırılan CA enzimlerinin çeşitli bileşikler tarafından inhibe olduğu tespit edilmiştir. Asetazolamid, ağır metaller ve sülfonamidler kuvvetli CA inhibitörleridir (Vitale *et al.* 1999). Ek olarak bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar streptomisin sülfat, sodyum dipiron, magnezyum sülfat, seftizoksim sodyum, sefuroksim sodyum, sefoperazon sodyum, stroptomisin sülfat ve metilmisin sülfat gibi antibiyotikler, bazı kimyasallar ve bazı pestisitlerin de CA enziminin aktivitesini büyük ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Beydemir *et al.* 2000, 2002).

### **1.3. İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan İlaçlar**

İlaçların belirli bir organı veya dokuyu etkiyebilmeleri için o dokuya belirli bir konsantrasyon eşliğini aşacak miktarda ulaşmaları gerekir. Etki yerine ulaşmasının ilk kademesini ilacın, vücuda uygulandığı yerden absorpsiyonu yani emilmesi, ikinci kademesini ise ilacın dolaşan kandan dokulara dağılımı oluşturur. Farmakolojideki anlamı ile absorpsiyon, ilaçların uygulandıkları yerlerden kan dolaşımına geçmeleri şeklinde tanımlanabilir. Absorpsiyon ve dağılım, esas itibarıyla ilaçların çeşitli hücre tabakalarını ve bunlarla ilgili biyolojik membranları geçmesi olayıdır (Kayaalp 2002).

İlaçlar vücutta, uygulandıkları andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisine maruz kalırlar. İlaçların enzimlerin etkisi ile vücutta kimyasal değişikliklere uğramasına biyotransformasyon (ilacın metabolize edilmesi veya metabolizlenmesi) denilir. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilirler. Bu nedenle biyotransformasyon, etkinliğe yansımaları bakımından bir biyoinaktivasyon olayıdır. Biyotransformasyona detoksikasyon (zehirsizlenme) adı da verilir; fakat bu terimin sözcük anlamında ifade ettiği durum her zaman meydana gelmez. Bazen ilaçlar biyotransformasyon sonucu daha etkili ve/veya daha toksik bileşiklere dönüşürler yani biyoaktivasyon olur (örneğin kodein'in morfin'e ve

difenoksilat'ın difenoksin'e dönüşümünde olduğu gibi). Bu olay sonucu ilaçların fazla toksik bileşiklere dönüştürülmesinin örnekleri ise metil alkolün formaldehid ve formik aside, asetaminofen'in N-asetil-p-benzokinonimin'e, kloroform'un fosgen'e ve izoniazidin asetilhidrazine dönüşümüdür (Kayaalp 2002).

İlaçların belirli bir biyolojik yapıdaki etkisinin nasıl oluştuğunun bilinmesi, insanda o etkiyi elde etmek için ilacın hekim tarafından rasyonel ve bilinçli bir şekilde kullanılmasına olanak verir. Etki mekanizması sırasıyla sistem, organ, doku, hücre ve subselüler yapı düzeylerinde ve nihayet hücrelerdeki fonksiyonel moleküller (enzimler gibi) düzeyinde olmak üzere değişik derinlikte incelenebilir. İlaçların pek çoğunun hücre düzeyine kadar olan yerlerle ilgili ve 'makro' düzeyde diye nitelendirilebilen etki mekanizmaları iyice aydınlatılmıştır. Fakat subselüler yapılar ve özellikle biyolojik moleküller düzeyindeki ilaç etkisinin mekanizmasının aydınlatılması halen kısıtlı sayıdaki ilaç veya ilaç grupları için mümkün olmuştur. Bununla beraber giderek artan bir şekilde uygulamaya giren moleküler biyoloji yöntemleri ile ilaçların etki mekanizmalarına ilişkin bilgilerin derinliği giderek artmaktadır. Böylece ilaçların etki mekanizmalarına ilişkin bazı hipotetik kavramlar, somut ve ölçülebilir nesnelere haline dönüşmektedir (Kayaalp 2002).

### **1.3.1. Glukokortikoid ilaçlar**

Glukokortikoid ilaçlar başta antiinflamatuvar ve antialerjik etkileri olmak üzere çeşitli etkileri nedeniyle sık kullanılan ilaçlardır. Kullanıldıkları hastalıklarda güçlü terapötik etkinlik gösterirler. Kullanış yerleri; yerine koyma tedavisi (replasman) şeklinde kullanıldıkları adrenal fonksiyon bozuklukları ve adrenal veya başka bir endokrin bozukluk söz konusu olmayan durumlar diye iki ana gruba ayrılır. Ayrıca hipotalamus-hipofiz-adrenal korteks ekseninin bozukluklarında teşhis aracı olarak da kullanılırlar (Kayaalp 2002).

Yeni sentetik streoidler ağızdan alındıklarında mide-barsak kanalından genellikle tam olarak absorbe edilirler. Maksimum kan düzeylerine, alındıktan 2-8 saat sonra ulaşırlar. Plazmada eliminasyon yarılanma ömürleri genellikle 90-180 dakika arasındadır. Doğal kortikosteroidler gibi ve onlara benzer bir şekilde, karaciğerde metabolizma edilirler. Birçoğunun metabolizmasında (deksametazon, prednizon, prednizolon ve türevleri gibi) CYP3A4 enzimi rol oynar. Karaciğer hastalıkları bu organda önemli ölçüde zedelenme yapmışsa glukokortikoidlerin eliminasyon yarılanma ömrü belirgin şekilde uzar. Metabolitler ve değişmeden kalan genellikle ufak miktardaki ilaç, böbreklerden itrah edilir. Kortizol ve onun farmakoloji yönünden benzeri olan sentetik glukokortikoidler, aşağıda belirtilen çeşitli etki türlerini meydana getirirler. Bu etkiler genellikle 'permisif' özelliktedir. Yani söz konusu hormon ve ilaçlar kendi başına bir etki başlatmaktan ziyade, diğer hormonların çeşitli yapılarda başlatmış oldukları etkinlikleri artırır, bunların daha fazla meydana gelmesini sağlarlar. Bazı yerlerde ise bu etkinlikleri inhibe ederler.

**Glukoz metabolizması:** Glukokortikoidler, insüline zıt yönde etki yaparlar. Karaciğerde glukoneogenezi artırır; bu olay, yüksek olasılıkla glukoneogenezde rol oynayan fosfoenolpiruvat karboksilaz, fruktoz-1,6-difosfataz ve glukoz-6-fosfatazı ve ayrıca amino asitleri piruvata dönüştüren transamilazları indüklemelerine, hücrelerde protein sentezini inhibe etmelerine ve proteolizi artırmaları sonucu, glukoz substratı olan amino asitleri artırmalarına bağlıdır. Glukokortikoidler, yağ dokusu hücrelerine, fibroblastlara ve timositlere glukoz girişini (uptake'ini) azaltırlar. Glukoneogenezin artması ve glukoz kullanımının azalması, gliseminin yükselmesine neden olur. Ayrıca, olasılıkla glikojen sentazı indükliyerek karaciğerde glikojen üretimini ve depolanmasını ve daha hafif derecede olmak üzere çizgili kaslarda da glikojen üretimini artırır; bu olaylar için ortamda insülin bulunması gerekir.

**Protein metabolizması:** Glukokortikoidler karaciğer hariç, diğer dokularda protein sentezini inhibe ederler (antianabolik etki); çizgili kaslar ve bağ dokusu başta olmak üzere çeşitli yerlerde proteolizi artırarak protein yıkımını artırır (katabolik etki). Çizgili kaslara ve diğer dokuların hücrelerine (karaciğer hariç) amino asit girişini

azaltırlar; antianabolik etkilerinde ve plazmada amino asit düzeyini yükseltmelerinde bu olay rol oynar. Böylece dokulardan karaciğere, amino asitlerin transferinin ve karaciğer hücrelerine girişinin artırılması, onların karaciğerde deamine edilerek bir yandan glukozla dönüşmelerini ve bir yandan glikojen yapımını, öte yandan üre ve amonyak oluşumunu fazlaştırmakla idrarla azot kaybını artırır, azot bilançosunu negatifleştirir; ayrıca hepatositlerde protein sentezini artırır. Aşırı glukokortikoid etkinlik, protein kaybı nedeniyle ciltte incelme ve kemik matriksinde azalma yapar. Çizgili kaslarda ufak dozdaki glukokortikoidlerin protein sentezini artırdıkları ileri sürülmüşse de bu konu tartışmalıdır. Yüksek dozda uzun süre verilirse büyüme hormonu salgılanmasını inhibe ederler ve çocuklarda büyümeyi durdururlar.

**Yağ metabolizması:** Glukokortikoidler, yağ hücresine glukoz girişini azaltırlar; lipolitik hormonların yaptığı lipolizi kolaylaştırırlar. İnsülinin lipoliz oluşturan etkisine karşı çıkarlar ve yüksek dozda verildiklerinde lipolizi hızlandırırlar. Adipositlerden serbest yağ asidi ve gliserol çıkışını artırırlar. Glukokortikoidler, aşırı salgılanmaları veya ilaç olarak yüksek dozda verilmeleri durumlarında insülin düzeyini yükseltmeleri ve iştahı artırmaları nedeniyle lipojenik etki de yaparlar. Lipolitik ve lipojenik etkiler sonucu yağın vücutta dağılımı değişir ve Cushing sendromu ve benzeri durumlarda yağ enseye supraklaviküler bölgeye birikir (buffalo hörgücü). Aynı şekilde yüzde cilt altı yağ dokusu artar. Yağın gövdeye birikmesine de neden olurlar. Buna karşılık ekstremitelerde cilt altı yağ dokusunu ve kasları eritirler.

**Böbrekler:** Glukokortikoidlerden bazıları, mineralokortikoidler kadar değilse bile, insanda toplayıcı kanal hücrelerinin aldosteron reseptörlerini aktive ederek  $\text{Na}^+$  ve onunla birlikte su reabsorpsiyonunu artırırlar. Ayrıca aynı yerde  $\text{K}^+$  ve  $\text{H}^+$  kaybını artırırlar. Ödem ve hipokalemik alkaloz yaparlar. Bazı memeli türlerinde distal tübül hücreleri de aldosteron reseptörü içerirler. Kortizol ve benzeri glukokortikoidler serbest su klerensinin ve vücuttaki su dengesinin düzenlenmesinde de rol oynar. Kortizol yetersizliğinde glomerüler filtrasyon hızı düşer ve antidiüretik hormon salgılanması artar. Böylece böbreklerden su atma kapasitesi düşer ve hemodilüsyon gelişir. Kortizol

bu durumu tersine çevirir. Kalsiyum itrahını artırır. Ürik asit itrahını kolaylaştırır. Bazı hiperkalsemi türlerinin tedavisinde kullanılabilirler.

**Kardiyovasküler etkiler:** Primer aldosteronizm gibi plazma aldosteron düzeyinin arttığı ya da Cushing sendromu gibi, bu hormonla birlikte, zayıf mineralokortikoid etkisi olan Kortizol düzeyinin arttığı durumlarda hipertansiyon gelişir. Bu olay böbrekler üzerindeki yukarıda belirtilen su ve tuz tutucu etkiye bağlıdır. Mineralokortikoid etkinliği çok zayıf olan veya hiç bulunmayan yeni sentetik glukokortikoidlerle, uzun süren tedavi sırasında genellikle hipertansiyon oluşmaz (Kayaalp 2002).

### 1.3.2. Antiülser ilaçlar

Mide mukozasında epitel tabakasının eldiven parmağı şeklinde mukoza içine sokulmasıyla oluşan milyonlarca tubuler bezin çeperinde bulunan hücreler, farklı histolojik ve fizyolojik özellikler gösterirler. Bunlar, bezin boyun kısmında yerleşmiş olan hücreler mukus salgırlar, midenin fundus bölgesindeki bezlerde daha derinde bulunan paryetal hücreler  $H^+$  ve  $Cl^-$  (hidroklorik asit) salgırlar. Paryetal hücrelerin arasına serpilmiş olan esas hücreler pepsinojen salgırlar, pepsinojen mide lumenindeki asit ortamda pepsine dönüşerek aktive edilir (Kayaalp 2002).

Paryetal hücrelerde  $H^+$ ; karbonik anhidraz tarafından su ve karbondioksitin birleşmesi suretiyle böbrek tubuslarında olduğu gibi yapılır.  $H^+$  paryetal hücrenin apikal yüzünde yerleşmiş bir aktif transport mekanizması ile hücreden lümene atılır ve karşılığında lümeden  $K^+$  alınır; proton pompası denilen bu mekanizmanın esasını  $H^+$ ,  $K^+$ 'a bağlı ATPaz oluşturur.  $Cl^-$  iyonu paryetal hücre içine bazolateral membran içinden geçirmek suretiyle çevresindeki interstisyel sıvıdan alınır ve karşılığında  $HCO_3^-$  iyonu interstisyel sıvıya ve oradan kapiler dolaşıma verilir. Bu nedenle gastrik venlerden dönen kanın pH'sı biraz yüksektir ve yemek sırasında olduğu gibi asit oluşumunun (karbonik anhidraz reaksiyonunun) hızlandığı sırada dönen kanın pH'sı daha da yükselir; hatta

postprandial sistemik geçici alkalozu neden olabilir. Paryetal hücre içinden  $Cl^-$  de aktif transport sistemiyle lümene atılır.

Midede asit salgısını azaltan ilaçlar; omeprazol ve benzeri benzimidazol türevleri (lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol ve esomeprazol), histamin  $H_2$ -reseptör blokörleri (simetidin, ranitidin, famotidin ve nizatidin) ve antimuskarinik (antikolinergik) ilaçlardır. Bunlardan en etkili olanı omeprazol ve benzeri proton pompası inhibitörleridir. Histamin  $H_2$ -reseptör blokörlerinin efikasitesi proton pompası inhibitörlerinden daha az, fakat antimuskarinik ilaçlarından yüksektir. Efikasiteleri yeterli olan ve uzun süreden beri yeterli derecede denenmiş olan histamin  $H_2$ -reseptör blokörleri halen peptik ülser tedavisinde en tercih edilen ve en fazla kullanılan ilaçlardır.

$H_2$ -reseptör blokörlerinin klinik bakımdan en önemli etkileri, histaminin midedeki asit salgılatıcı etkisini güçlü bir şekilde bloke etmeleridir. Histaminin bu etkisi klasik antihistaminiklere rezistandır. Histaminin tükürük ve diğer dış salgı bezleri üzerindeki salgılatıcı etkisi üzerinde pek etkili değildirler. Onun deney hayvanları veya *in vitro* preparatlarda belirginleşen kalpteki pozitif kronotrop etkisini, diğer bazı kardiyak etkilerine ve sıçan uterusu üzerindeki gevşetici etkisine de karşı çıkarlar. Sadece dışarıdan verilen histaminin yaptığı asit salgılanmasını değil gastrin, yemek, vagus stimülasyonu, kafein, insülin enjeksiyonu ve psikik refleks gibi bütün etkenlerin yaptığı asit salgılanmasını inhibe ederler. Salgının hem hacmini ve hemde asit konsantrasyonunu azaltırlar (Kayaalp 2002).

Proton pompası inhibitörleri mide asit salgısını en güçlü şekilde bloke eden benzimidazol türevi ilaçlardır. Paryetal hücrelerin apikal membranında ve hücre içine sokulmuş durumdaki sekreter kanalikülleri kaplayan tübuloveziküllerde yerleşmiş olan  $K^+$ ,  $H^+$  -ATPaz enzimini güçlü bir şekilde inhibe ederler. Proton pompası adı da verilen ve  $K^+$  ile stimüle edilen adı geçen ATPaz, hücre içinde karbonik anhidraz reaksiyonu sonucu meydana gelen  $H^+$ 'yı mide lumenine pompalar. Omeprazol ve diğer benzoimidazol türevi ilaçlar zayıf baz niteliğinde maddelerdir. Paryetal hücre sekreter

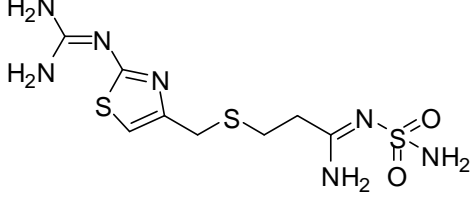
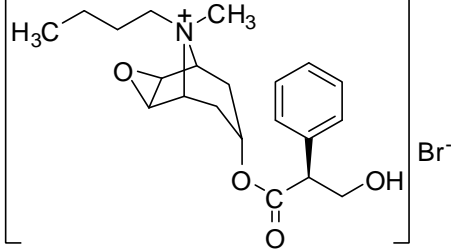
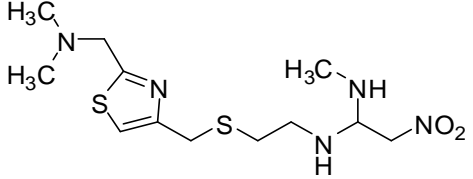
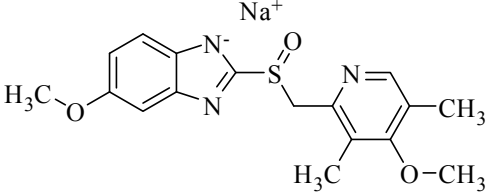
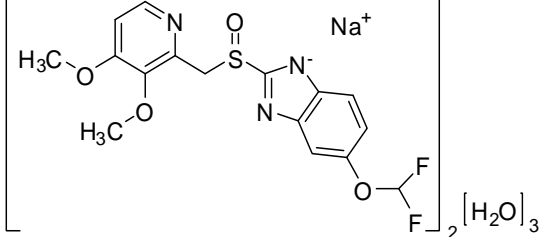
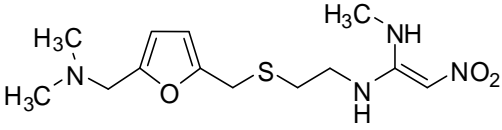
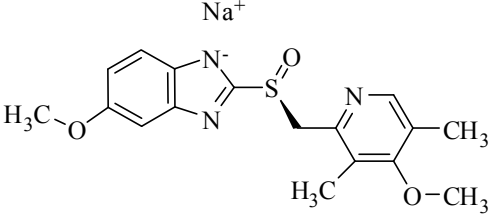
kanaliküllerinin düşük pH'lı ortamında, iyon tuzağı mekanizmasıyla konsantre olurlar (Kayaalp 2002).

### 1.3.3. Ürolojik ilaçlar

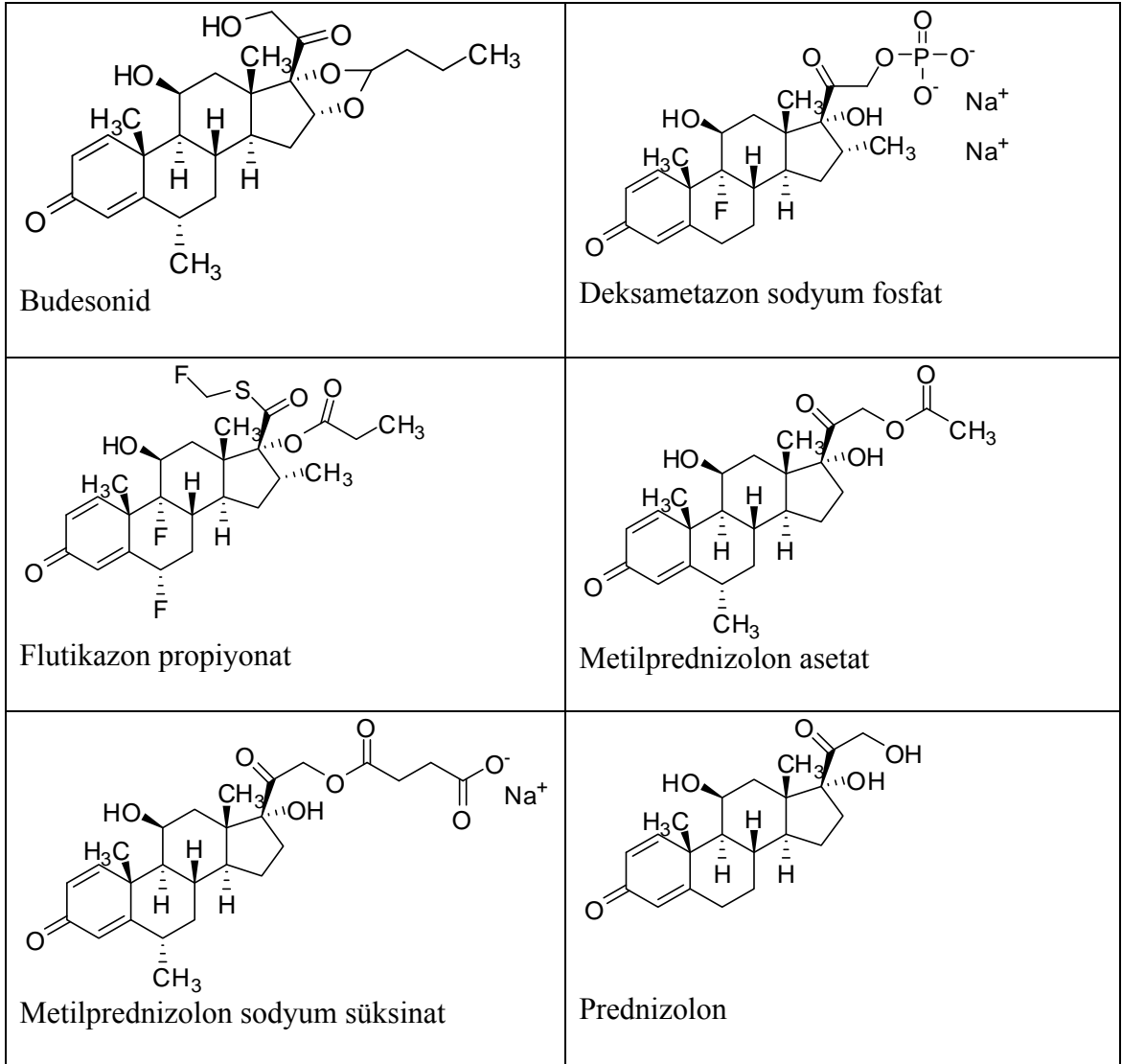
Levofloksasin oral ve intravenöz uygulamaya mahsus, sentetik, florokinolon türevi, geniş spektrumlu bir antibakteriyeldir. Bir florokinolon antibakteriyel ilaç olarak levofloksasin DNA-DNA giraz kompleksi ve topoizomerez IV üzerine etkir. Oral uygulamadan sonra serum doruk konsantrasyonlarına ortalama 1 saat içinde ulaşılır. Mutlak biyoyararlanım yaklaşık %100'dür. Levofloksasin serum proteinlerine yaklaşık %30-%40 oranında bağlanır. Oral veya intravenöz yolla uygulanan levofloksasinin serum yarı-ömrü 6-8 saat arasında bulunmuştur. Levofloksasin çok az oranda metabolize olur. Atılım esas olarak böbrekler yoluyla (%85) gerçekleşir. Böbrek yetersizliği durumunda eliminasyonu gecikir. Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi eksikliği olan hastalarda kinolon grubu antibakteriyellerle hemolitik reaksiyonlar bildirildiğinden bu hastalarda levofloksasin dikkatle kullanılmalıdır (Farmalist 2008).

Neostigmin bir [parasempatomimetiktir](#), özellikle geri dönüşümlü [kolin esteraz](#) baskılayıcıdır. Böylelikle parçalanmayan [asetilkolin](#), [nikotinik](#) ve [muskarinik](#) reseptörleri uyarır (Farmalist 2008).

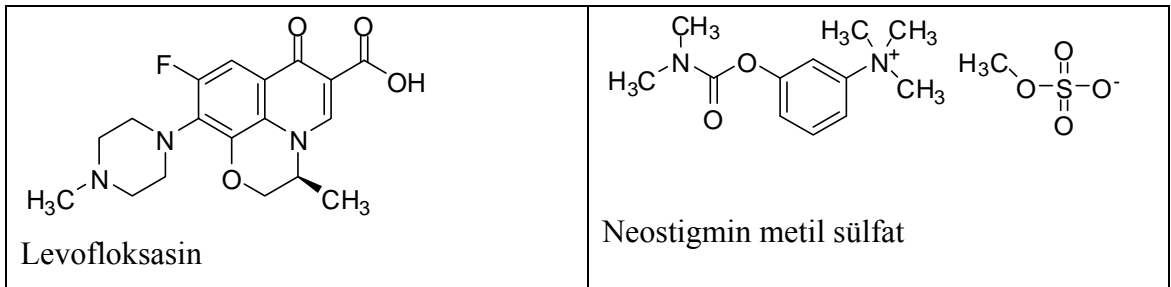
Şekil 1.4, Şekil 1.5 ve Şekil 1.6 da inhibisyon etkisi araştırılan ilaçların açık yapıları gösterilmiştir.

 <p>Famotidin</p>	 <p>Hyosin N-butil bromür</p>
 <p>Nizatidin</p>	 <p>Omeprazol sodyum</p>
 <p>Pantoprazol sodyum</p>	 <p>Ranitidin</p>
 <p>Eesomeprazol sodyum</p>	

Şekil 1.4. Antiülser ilaçların açık yapıları



Şekil 1.5. Glukokortikoid ilaçların açık yapıları



Şekil 1.6. Ürolojik ilaçların açık yapıları

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum and Roughton ile Stadie and O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. Meldrum and Roughton (1933) insan eritrosit karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. Keilin and Martin (1944), CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir.

Karbonik anhidraz izoenzimleri insan eritrositleri (Beydemir and Gülçin 2004), balık solungaçları (Bone *et al.* 1995), balık eritrositleri (Arena 2002), sıçan tükürüğü ve eritrositleri (Feldstein and Silverman 1984), *Plasmodium falciparum* (Krungkrai *et al.* 2001), böcekler (Burt *et al.* 1992), sığır kemik (Sender *et al.* 1999) ve lökositlerini (Gervais and Tufts 1999) kapsayan birçok kaynaktan saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Ayrıca CA'nın bitki, maya ve bakterilerden de karakterize edildiği belirtilmiştir (Krungkrai *et al.* 2001).

CA-I yaklaşık 30 kDa molekül kütleli düşük aktiviteli sitoplazmik bir enzimdir (Bundy 1977; Lindskog *et al.* 1984). Kapiler ve korneal endotelyum, göz lensi, plasenta ve memeli fetal membranlarında bol miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Lönnerholm *et al.* 1985; Venta *et al.* 1987; Sasaki *et al.* 1993; Mühlhauser *et al.* 1994). CA-I geni insan genomik cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır (Tashian 1989).

Fizyolojik koşullarda  $1,3-1,9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  turnover sayısına sahip CA-II izoenzimi bilinen en verimli enzimlerden biridir (Khalifah 1971; Sanyal and Maren 1981; Wistrand 1981). İnsan CA-II geni, CA-I ve CA-III genleri gibi kromozom 8 üzerindedir (Nakai *et al.* 1987; Tashian 1989). Hemen hemen tüm insan doku ve organlarında bulunan CA-II karbonik anhidraz gen familyasında en fazla dağılmış izoenzimdir (Tashian 1992). İlk

olarak CO<sub>2</sub>'nin hidratasyonunda yer aldığı eritrositlerde bulunmuştur (Meldrum and Roughton 1933; Wistrand 1981).

CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine gerek ilaçlar gerekse sentezlenen kimyasallar ve sülfonamid türevleri ile birçok inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

CA inhibitörleri özellikle aromatik ve heterosiklik sülfonilamidler klinikte glukoma, asit-baz dengesizliği, gastrik ve duodenal ülser gibi birçok hastalığın tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak inhibitörler antitümör ajanlar olarak da uygulanmaktadır (Bülbül *et al.* 2002; Supuran *et al.* 2003; Supuran 2003).

Beydemir *et al.* (2000) hCA I ve hCA II enzimleri üzerine hidrataz aktivitesi ile bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; sodyum amfisilin hCA I'i inhibe ettiğini, sodyum dipirionun aktive ettiğini fakat MgSO<sub>4</sub>'ün hiçbir etki göstermediğini bulmuşlardır. hCA II'yi ise sodyum amfisilin ve MgSO<sub>4</sub> inhibe ederken sodyum dipirionun aktive ettiğini tespit etmişlerdir.

Chazalette *et al.* (2004) sülfonilamidlere indan parçaları katılmasıyla oluşturulan sülfonilamid türevlerinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyonunu incelemişlerdir. Asetamido, 4-kloro-benzoil, valproil, tetra ve penta floro benzoil metabolitlerinin katıldığı sülfonilamidler hCA I ve hCA II izoenzimlerinin güçlü birer inhibitörü gibi davranmışlardır (hCA I için K<sub>i</sub> değeri 1,6-8,5 nM ve hCA II için K<sub>i</sub> değeri 2,3-12 nM arasındadır). Fakat bu sülfonilamidler metazolamid gibi diğer CA inhibitörü sülfonilamidlerle kıyaslandığında daha düşük antiepileptik aktivite göstermişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada gökkuşağı alabalığı düşük molekül kütleli plazma inhibitörünün insan CA II enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada öncelikle 7750 EÜ/mg protein spesifik aktiviteye sahip enzim 646 kat ve % 71 verimle

saflaştırılmıştır. RT plazma inhibitörünün IC<sub>50</sub> değeri 0,37 mg/ml olarak bulunmuştur (Hisar *et al.* 2004).

Çoban *et al.* (2007) insan eritrositlerinden %66,95 verim, 745,1 kat, 3892,3 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırdıkları hCA I ve %62,82 verim, 2232,6 kat 116632 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırdıkları hCA II enzimleri üzerine morfinin inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; enzimin hidrataz aktivitesiyle hCA I için IC<sub>50</sub> değeri  $4,5 \times 10^{-5}$  M ve hCA II için IC<sub>50</sub> değeri  $9,23 \times 10^{-5}$  M olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışma kapsamında *in vivo* olarak sıçan eritrositlerinde yapılan çalışmada her iki enziminde morfin tarafından inhibe edildiği bulunmuştur.

Ekinci *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; Karbonik Anhidraz I ve II izoenzimleri sepharose-4B L-tyrosine afinite kromatografisiyle sırasıyla 104 ve 900 kat saflaştırılmıştır. %30 ve %40 verimle saflaştırılan 920 ve 8000 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine ceftriaxone sodyum, imipenem ve ornidazol ilaçlarının *in vitro* etkileri incelenmiştir. hCA I'in hidrataz aktivitesi için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,864 mM, 0,00354 mM ve 0,131 mM, esteraz aktivitesi için 1,9 mM, 0,0081 mM ve 0,318 mM olarak bulunmuştur. hCA II'nin hidrataz aktivitesi için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 1,118 mM 0,0214 mM ve 0,263 mM, esteraz aktivitesi için 2,542 mM 0,0258 mM ve 0,343 mM olarak bulunmuştur.

Bayram *et al.* (2008), salisilik asit türevlerinin esteraz aktivitesi ile insan eritrosit CA I ve CA II enzimleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, hCA I için; salisilik asit, 4-aminosalisilik asit, 4,6-dinitro salisilik asit, 3-metil salisilik asit, diflunisal, sulfasalazin ve asetil salisilik asitin yarışmasız, 4-sulfosalisilik asit ve 5-klorosalisilik asitin yarıyarışmalı, 5-sulfosalisilik asitin ise yarışmalı olarak inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. hCA II için ise; hCA I'den farklı olarak 4-sulfosalisilik asitin yarışmalı, 5-sulfosalisilik asitin yarışmasız, 3-metil salisilik asitin yarıyarışmalı olarak inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Sinan *et al.* (2009) hCA I ve hCA II enzimleri üzerine sprofloksasin, kloritromisin, rifamisın SV, gentamisin sülfat, klindamisin fosfat, klorafenikol, sodyum ampisilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin *in vitro* etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda hCA I ve hCA II için en etkili inhibitörün sırasıyla 0,00163 mM ve 0,00114 mM IC<sub>50</sub> değeri ile sodyum ampisilin olduğu bulunmuştur. En az etkiyi ise hCA I ve hCA II için sırasıyla 0,00358 mM ve 0,00308 mM IC<sub>50</sub> değeri ile sefazolin sodyumun gösterdiği bulunmuştur.

Bir başka çalışmada ise kemoterapide sıklıkla kullanılan bleomisin sülfat, tratuzumab, ifosfamide, bevacizumab, fludarabin, kalsiyum folinat, vinkristin sülfat, sitarabin ve rituksimab ilaçlarının hCA-I ve hCA-II üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş. Bu amaçla öncelikle hCA-I ve hCA-II izoenzimleri taze insan kanından Sepharose-4B-L-tirozin sulfanilamid afinite kolon kromatografisi ile saflaştırılmış. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla 93,52 ve 661,90 kat ve %54,00, %56,46 verimle elde edilmiş. Daha sonra IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, hidrataz aktivitesi kullanılarak bu ilaçların karbonik anhidraz izoenzimi I ve II üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış ve %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizilmiş. Bu grafiklerden bleomisin sülfat, tratuzumab, ifosfamide, bevacizumab, fludarabin, kalsiyum folinat, vinkristin sülfat, sitarabin ve rituksimab kemoterapi ilaçlarının hCA I için IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 0,196, 0,001, 4,034, 0,006, 3,408, 0,759, 0,050, 2,399 ve 0,002 µM ve hCA II için IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 0,324, 0,002, 2,519, 0,007, 5,034, 0,816, 0,060, 3,467 ve 0,003 µM olarak bulunmuş. K<sub>i</sub> değerlerinin bulunması için esteraz aktivitesi ile ilaçların inhibisyon etkilerine bakılmış, fakat en yüksek konsantrasyonda bile bu ilaçların esteraz aktivitesinde hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi gözlenmemiştir (Topal 2009).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

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

Elektroforez tankı : Bio Rad (dikey)  
Güç kaynağı : Bio Rad Power Pac 3000

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Araştırma boyunca kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda anlatıldığı gibidir.

#### 3.1.3.a. Enzimin hidrataz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler

1. Veronal tamponu 0,025 M, pH 8,2 (Hidrataz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti): 0,025 mol sodyum barbitalin 900 ml destile suda çözülüp pH 8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile hacminin 1 litreye tamamlanmasıyla hazırlandı.
2. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 ml 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra hacminin destile su ile 250 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
3. CO<sub>2</sub> çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle destile suyun içerisinde CO<sub>2</sub> gazı geçirilerek hazırlandı.

#### 3.1.3.b. Enzimin esteraz aktivitesinin ölçülmesinde kullanılan çözeltiler

1. 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> p:7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon çözelti) : 6,055 g Tris 950 ml saf su içerisinde çözülerek, 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlanmasıyla hazırlandı.

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

### 3.1.3.c. Afinite jeli hazırlanırken kullanılan çözeltiler

1. 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi pH:8,8 (Sephrose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 950 ml destile suda çözümlenerek, 0,1N NaOH ile pH:8,8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi pH:10 (Sephrose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 950 ml destile suda çözümlenerek, 0,1N NaOH ile pH: 10'a titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

3. Sülfanilamid çözeltisi (afinite jeli hazırlanırken kullanılan çözelti): 25 mg sülfanilamid 0°C civarında 10 ml 1M HCl içinde çözüldükten sonra 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0°C'daki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katılarak hazırlandı.

### 3.1.3.d. Enzimin saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler

1. 25 mM Tris-HCl/0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi pH:8,7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözümlenerek 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye titre edildi. Daha sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi pH:8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 3,124 g

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 ml destile suda çözüldü. 0,1 N HCl ile pH:8,7'ye getirildikten sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> /1 M NaCl çözeltisi pH:6,3 (kolona tutunmuş HCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 14,625 g NaCl alınıp, pH 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye destile su ile tamamlandı.

4. 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa/0,5 M NaClO<sub>4</sub> çözeltisi pH:5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g NaClO<sub>4</sub> ve 2,04 g CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O, 120 ml destile su içerisinde çözüldü. 0,1 N HCl ile pH'sı 5,6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 150 ml'ye tamamlandı.

#### **3.1.3.e. Kantitatif protein tayininde kullanılan çözelti**

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

#### **3.1.3.f. SDS-Poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler**

1. 1 M Tris-HCl pH:8,8; 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. 1 M Tris-HCl pH:6,8; 12,11 g Tris tartılarak 80 ml saf suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g saf su karıştırılarak çözülmesiyle hazırlandı.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak saf su ile hacmi 10 ml'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 g saf suda çözülerek hazırlandı.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris ve 7,51 g glisin tartılarak 450 ml saf suda çözüldü. %10'luk SDS'den 5 ml ilave edildi, pH 8,3'e ayarlandı ve toplam hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH:8)'den 0,5 ml, %10'luk SDS'den 1 ml, %100'lük gliserinden 1 ml ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 ml alınarak saf suyla 10 ml'ye tamamlandı. Bu tampona kullanılmadan önce 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β-merkaptetanol ilave edildi.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml saf su içerisinde 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.
10. Jel yıkama çözeltisi: 50 ml metanol, 10 ml asetik asit ve 40 ml saf su karıştırılarak elde edildi.

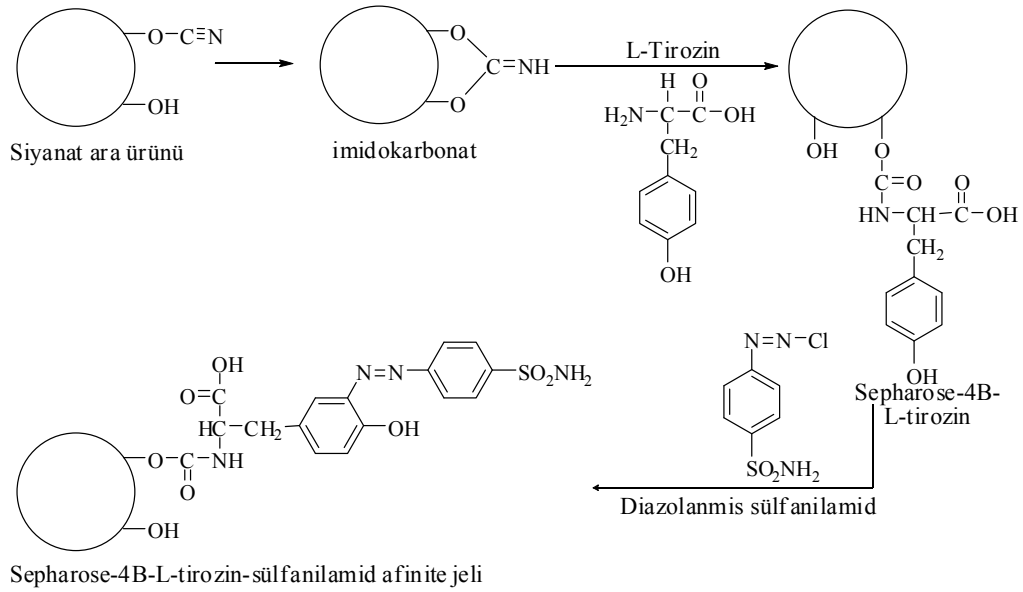
### 3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezi'nden sağlıklı insan kanı taze olarak temin edildi. Deneylerde kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matrisi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak tirozine kenetlendi (Şekil 3.1.). Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Arslan *et al.* 1996; Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı:



**Şekil 3.1.** CNBr Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite jeli hazırlanırken meydana gelen reaksiyonların açık gösterimi

**a) CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması:** CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 ml soğuk 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH:10) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 ml'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbanans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama, 100 ml, 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH:8,8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, 40 ml'lik aynı tampona aktarıldı.

**b) Sülfanilamid kenetlendirilmesi:** 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO<sub>2</sub> bulunan 0°C'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M NaOH ile pH 9,5'a çıkarılıp sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 ml 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH:7,4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Arslan *et al.* 1996). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

### 3.2.1.a. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH:7,8) içine alınarak jel süspanse edildi ve su trompu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspanse edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun dengelenmiş olduğu elüat ile tamponun 280 nm'de absorbananslarının ve pH'larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

### 3.2.2. Enzim saflaştırma çalışmaları

#### 3.2.2.a. Hemolizatın hazırlanması

Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak 15 dakika boyunca +4°C’de 2500xg’de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklarla dikkatli bir şekilde alındı ve tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Her defasında +4°C’de 2500xg’de 15 dakika santrifüj edildi ve üstte kalan kısım damlalık kullanılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu destile su ile karıştırılarak hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4°C’de 20.000xg’de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklarla dikkatli bir şekilde alındı ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de muhafaza edildi (Hunaiti and Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

#### 3.2.2.b. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH’sı 8,7’ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 ml 25 mM Tris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH:8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece CA enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6,3) tamponu kullanılarak hCA-I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH:5,6) çözeltisi kullanılarak hCA-II enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5’er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm’deki absorbanslarına bakıldı. Bu işlemler sırasında peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 ml/saat’e ayarlandı.

### 3.3. Enzim Aktivitesi Tayini

#### 3.3.1. Hidrataz aktivitesi

Bu yöntem Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemidir (Wilbur and Anderson 1948). CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> iyonundan ileri gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

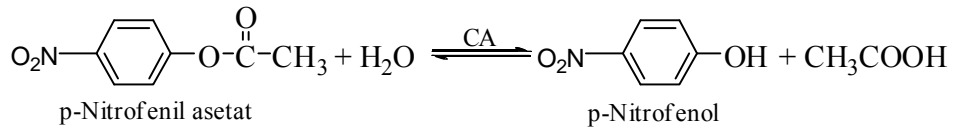
Bunun için kör olarak hazırlanan tüpe 1 ml veronal tamponu (pH:8,2), 0,1 ml %0,04'lük brom timol mavisi, 0,6 ml saf su ve 2,5 ml CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edildi. Böylece aktivite ölçüm ortamında toplam hacim 4,2 ml oldu. Daha sonra kronometre yardımıyla CO<sub>2</sub> çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre belirlendi (t<sub>0</sub>). Numune tüpüne ise sudan 0,010 ml azaltarak bunun yerine enzim çözeltisi ilave edildi ve yine en son olarak CO<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilir edilmez, indikatörün mavi renginin sarımsı yeşile dönüşmesi (pH:6,3) için geçen süre bir kronometre vasıtasıyla belirlendi (t<sub>c</sub>). Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EÜ) enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi; enzimsiz CO<sub>2</sub> hidrasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlendi.

$$EÜ = \frac{t_0 - t_c}{t_c}$$

Formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için enzim ünitesi hesaplandı (Maren 1960). Hemolizat, saf enzim çözeltisi ve inhibisyon çalışmalarında aktivite tayininde aynı işlemler uygulandı.

### 3.3.2. Esteraz aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması Şekil 3.2. de verildiği gibidir.



**Şekil 3.2.** *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorpsiyon göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Armstrong *et al.* 1966; Verpoorte *et al.* 1967). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

3 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre Çizelge 3.1’deki prosedür uygulandı.

**Çizelge 3.1.** 3 ml’lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin miktarları

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör, µL)	Numune Tüpü
Tris-SO <sub>4</sub> (0,05M, pH:7,4)	1400	1400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	3000	3000

1 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre ise Çizelge 3.2.'deki prosedür uygulandı.

**Çizelge 3.2.** 1 ml'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin miktarları

<b>Kullanılan Maddeler</b>	<b>Kontrol Tüpü (Kör, µL)</b>	<b>Numune Tüpü</b>
Tris-SO <sub>4</sub> (0,05M, pH:7,4)	467	467
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sifıra ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı; 27,2 mg ester, 1ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş bir şekilde ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte *et al.* 1967). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

### **3.4. Protein Tayini**

#### **3.4.1. Kalitatif protein tayini**

Kalitatif protein tayini, proteinlerin yapısında bulunan aromatik gruplara sahip tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbands göstermesi esasına dayanan Warburg metodu olarak bilinen yolla gerçekleştirildi (Segel 1968). Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemlerinden sonra eşit hacimde alınmış olan bütün elüsyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometrede absorbandsları 280 nm'de köre karşı okundu.

#### **3.4.2. Kantitatif protein tayini**

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki, hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Destile su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlanarak 4900 µl renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 ml'lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu.

Kör olarak 100 µl destile su ve 4900 µl renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik

haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

### **3.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi İle Enzim Saflığının Kontrolü**

Sepharose 4B-L-tirozin afinite kolonu ile saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin saflık kontrolü %3-8 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofözezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970), tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflıkları kontrol edildi.

Bunun için elektroföze plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Cam plakaları birleştiren mikalara (spacer) ince bir tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbirini üstüne konuldu ve özel naylon kaplarına yerleştirilerek jel hazırlama cihazına konuldu. Daha sonra cam plakalar aralık oluşturucu mikaların bulunduğu kısımlardan kısıkaçlarla dikkatlice sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Ortamda hava olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %0,1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşıncaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklendi. Katılaştıktan sonra üstündeki %0,1'lik SDS alındı. Daha sonra plakaların üst kısmına tarak yerleştirildi ve yığma jel tarağın yanından üst yüzeye kadar ilave edildi. Jelin donması için oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 ml 1M Tris-HCl (pH:8,8), 10,66 ml %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,61 ml %1'lik SDS, 0,4 ml %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletlen diamin) ve 11,94 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml %1,5'luk amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (PER) ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı. Yığma jeli hazırlanması sırasında 1M'lik Tris-HCl (pH:6,8)'den 1,24 ml, %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1ml, %1'lik SDS'den 0,1 ml, %5'lik TEMED'den 0,1 ml ve saf sudan 7,36 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış %1,5'luk PER'den 0,2 ml ilave edildi.

Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, jel kuyularına çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak alt tarafından (+) kablo (Anot), üstten (-) kablo (Katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra akım 120 volta ayarlanarak 2-3 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere saklandı ve jel sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 15 dakika bekletildi. Daha sonra sabitleştirme çözeltisinden çıkarılan jel özel kabına konularak, renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 45 dakika kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözeltide çalkalandı. Yıkama çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel yıkama çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

### **3.6. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Bazı Antiülser, Glukokortikoid ve Ürolojik Sınıfındaki İlaçların Etkilerinin Belirlenmesi**

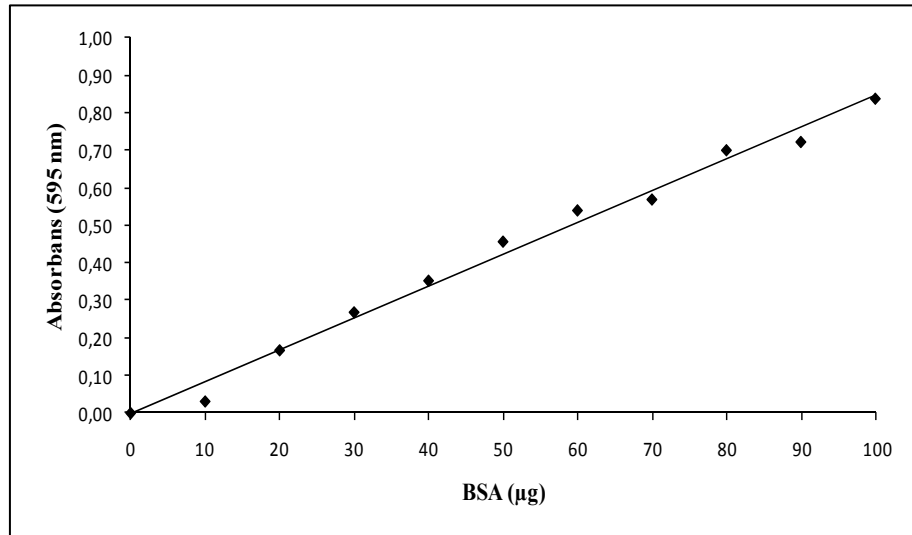
Çalışma kapsamında kullanılan ilaçların, insan kanından saflaştırılan CA izoenzimleri üzerindeki etkileri *in vitro* olarak araştırıldı. Ölçümler hidrataz aktivitesi ve esteraz aktivitelerinin ikisi de kullanılarak yapıldı. Enzimler üzerine inhibisyon etkisi gösteren antiülser, glukokortikoid ve ürolojik ilaçlar için IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Bu amaçla öncelikle en az 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda hem hidrataz hem de esteraz aktivite ölçüm yöntemleriyle enzim aktivitesine bakıldı. Daha sonra elde edilen veriler kullanılarak %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizilerek bu grafiklerden inhibisyon gösteren ilaçlar için aktiviteyi yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) değerleri hesaplandı. Sonrasında, hCA I ve hCA II

izoenzimlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon gösteren ilaçlar için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak;  $1/V-1/S$  değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek,  $K_i$  değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanıldı (Bradford 1976). Coomassie Brilliant Blue yöntemi için önce bir standart eğri hazırlandı. İnsan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1’de gösterildi.



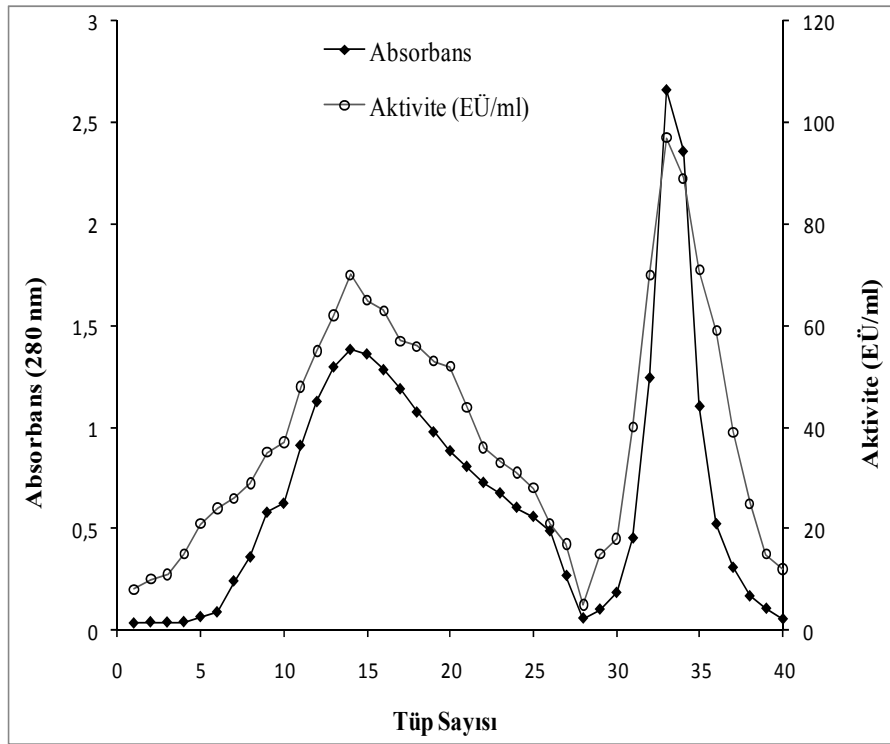
Şekil 4.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

### 4.2. İnsan Eritrosit CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin Afinite Kolonu Kullanarak Saflaştırılması Sonuçları

İnsan eritrositlerinden hCA-I ve hCA-II izoenzimleri saflaştırılması ayrı ayrı yapıldı. Katı Tris ile pH'sı 8,7'ye ayarlanmış olan hemolizat kolona direkt tatbik edildi. Kolondan önce 1 M NaCl/25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6,3) tamponu geçirilerek hCA-I enzimi daha sonra 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH:5,6) çözeltisi geçirilerek hCA-II

enzimi elüe edildi. Elüatlar 1,5'er ml halinde tüplere alındı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Daha sonra yüksek absorbans gösteren tüpler birleştirilerek diyaliz işlemi yapıldı.

Absorbans gösteren fraksiyonlar için CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesine bakıldı. Çok sayıda yapılan saflaştırma işlemlerinden birisinin sonuçları Şekil 4.2'de gösterildi.



**Şekil 4.2.** İnsan eritrosit CA I ve II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılmasına ait elüsyon grafiği

#### 4.2.1. İnsan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları

İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden 1'er ml numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue G-250 yöntemi ile protein tayini yapıldı.

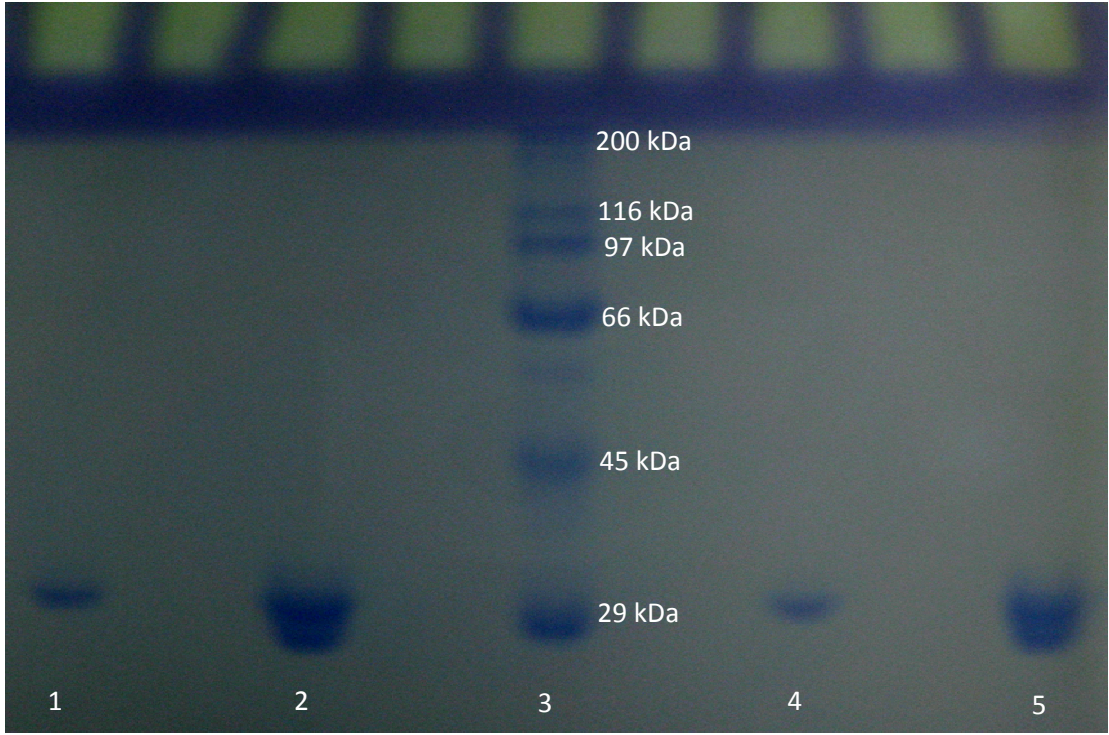
Bulunan değerlere göre hemolizatin Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulanması ve diyaliz edilmesi sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 4.1’de gösterildi.

**Çizelge 4.1.** İnsan eritrositlerinden elde edilen hemolizattan afinite kromatografisi ile CA-I ve CA-II izoenzimlerinin saflaştırma sonuçları

Saflaştırma basamağı	Toplam hacim (ml)	Aktivite (EÜ/ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	Saflaştırma katsayısı	Verim (%)
Hemolizat	100	476.9	66.6	6660	47690	7.16	1	100
hCA-I	10	2000	0.79	7.9	20000	2531,65	353,58	41,94
hCA-II	6	4500	0.91	5.48	27000	4927,01	688,13	56,62

#### 4.2.2. SDS-PAGE sonuçları

Kromatografik işlemler sonucu insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan CA-I ve CA-II izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi bölüm 3.7.’de anlatıldığı gibi yapıldı. Standart olarak molekül kütlesi belli olan standart proteinler kullanıldı (Domuz miyosin; 200 kDa, E.coli-β-galoksidaz; 116 kDa, tavşan kası fosforilaz b.; 97 kDa, sığır serum albumin; 66 kDa, ovalbumin; 45 kDa, sığır eritrosit CA; 29 kDa). SDS-poliakrilamid jel elektroforezine saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı

\*1 ve 4 hCA-I, 2 ve 5 hCA-II, 3 standartlar: domuz miyosin; 200 kDa, E.coli- $\beta$ -galoksidaz; 116 kDa, tavşan kası fosforilaz b.; 97 kDa, sığır serum albumin; 66 kDa, ovalbumin; 45 kDa, sığır eritrosit CA; 29 kDa.

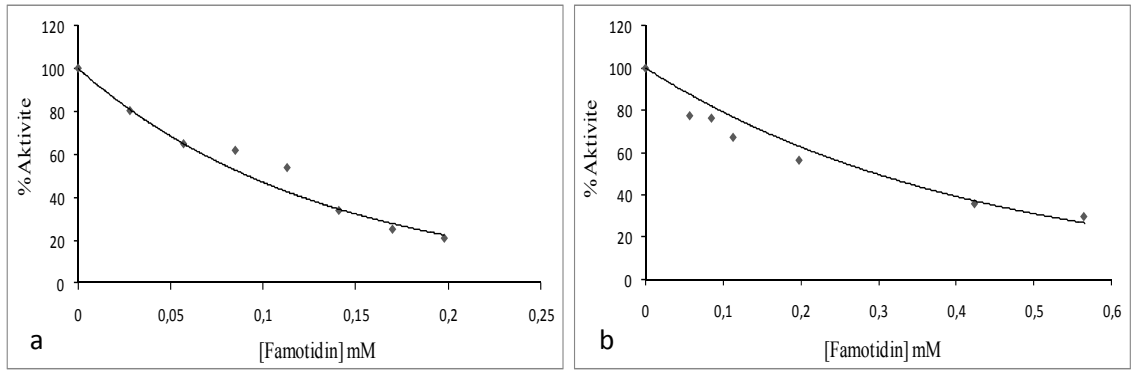
### 4.3. İnsan Eritrosit CA-I ve CA-II İzoenzimleri İle İlgili Yapılan Kinetik Çalışmaların Sonuçları

#### 4.3.1. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine antiülser ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

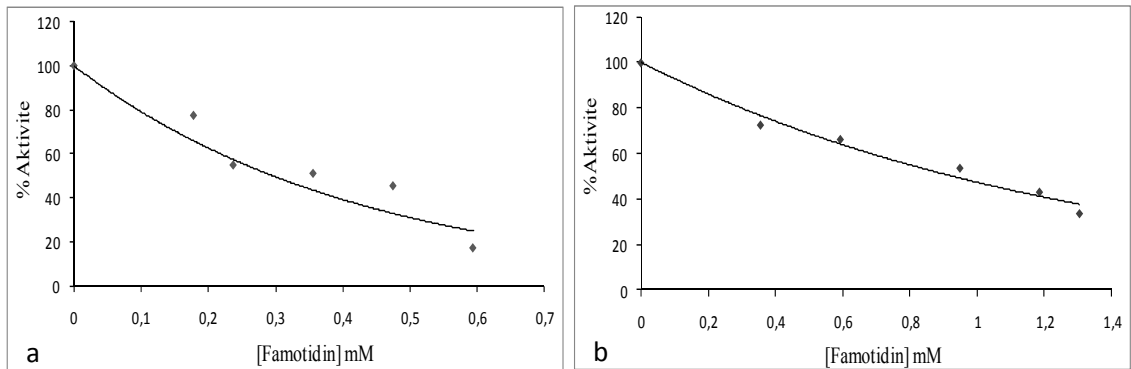
Doğru substrat konsantrasyonunda insan eritrosit CA-I ve CA II izoenzimleri için famotidin, hiyosin-N-butil bromür, nizatidin, omeprazol sodyum, pantoprazol sodyum, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyumdan oluşan 7 farklı antiülser ilacın inhibisyon etkisi araştırıldı.

#### 4.3.1.a. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri kullanılarak antiülser ilaçların $IC_{50}$ değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları

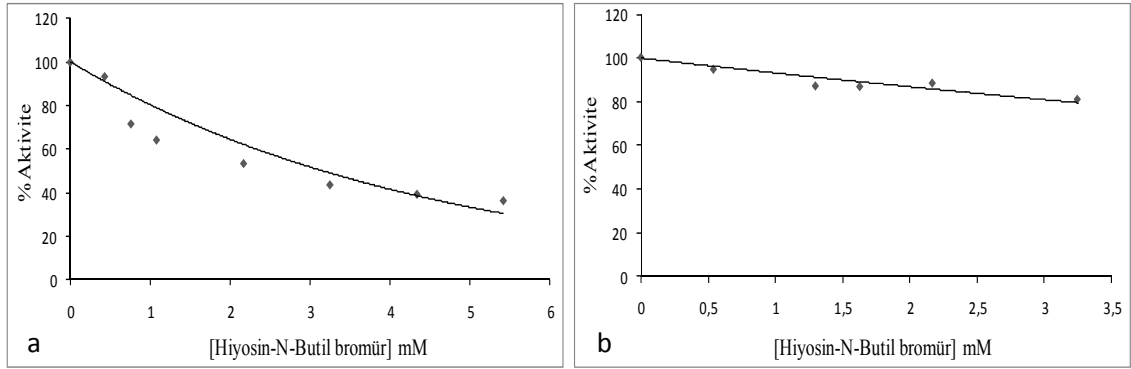
Her bir antiülser ilaç için (%) Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.4 – Şekil 4.17). Daha sonra bu grafiklerden inhibisyon gözlenenlerde %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ( $IC_{50}$  değerleri) hesaplandı.



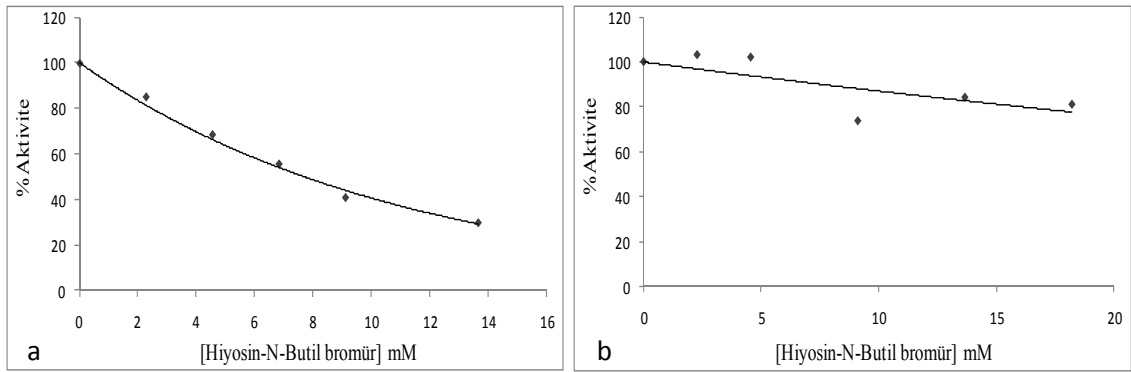
**Şekil 4.4.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Famotidin]mM) grafiği



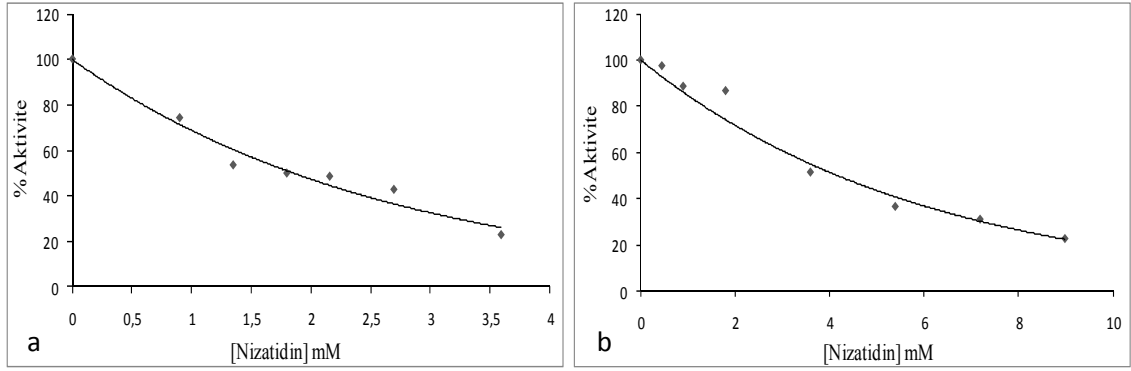
**Şekil 4.5.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenzimlerinin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Famotidin]mM) grafiği



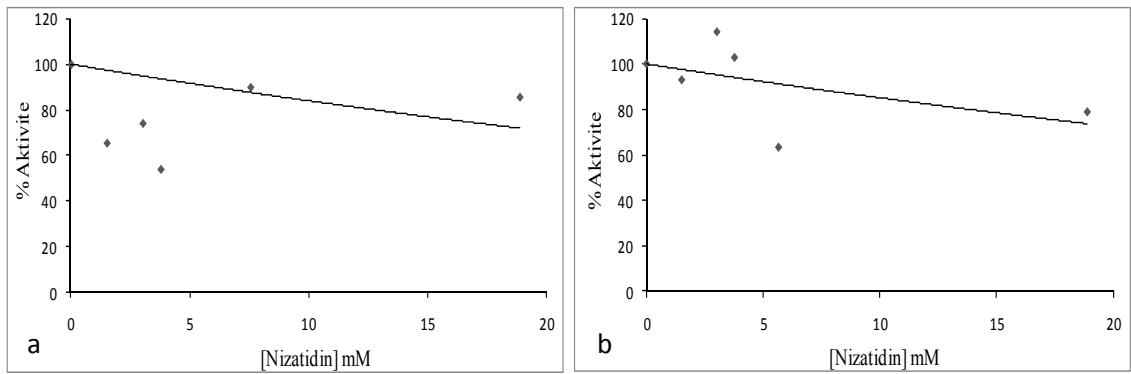
**Şekil 4.6.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Hiyosin-N-butil bromür] grafiği



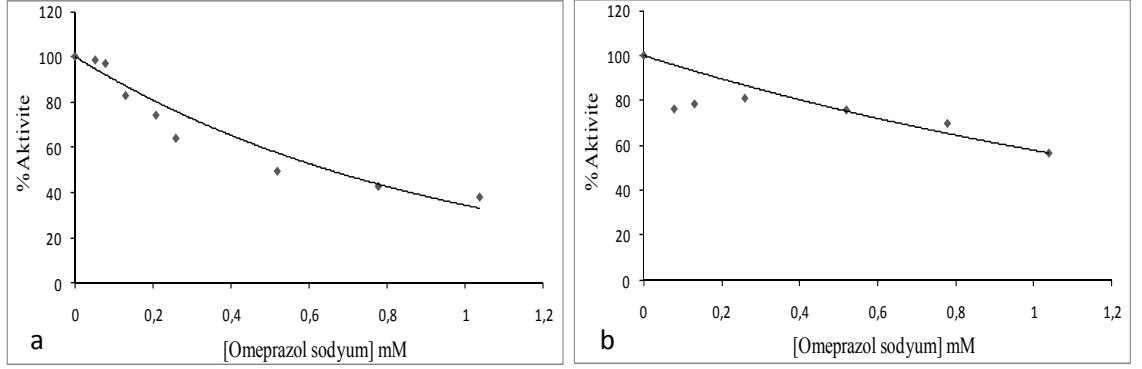
**Şekil 4.7.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Hiyosin-N-butil bromür] grafiği



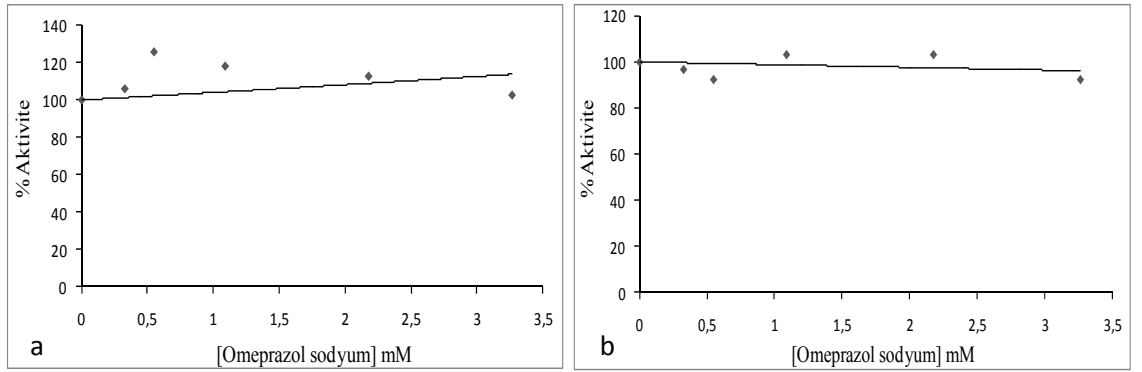
**Şekil 4.8.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Nizatidin] grafiği



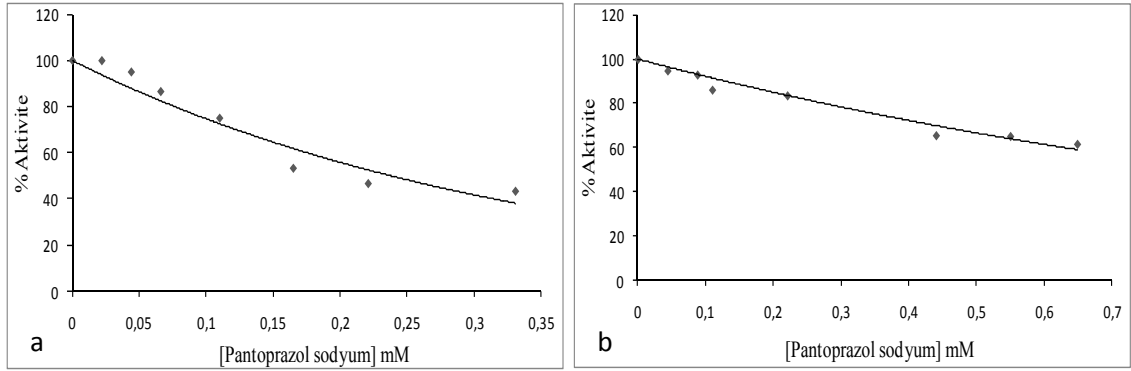
**Şekil 4.9.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Nizatidin] grafiği



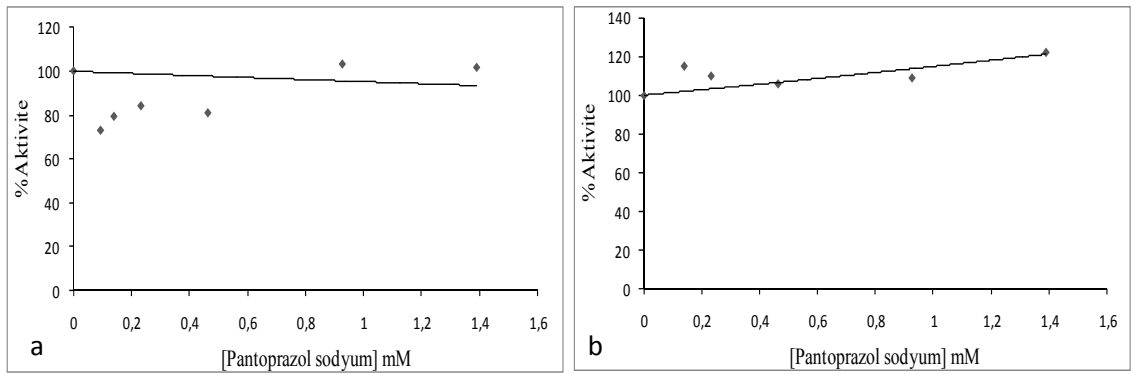
**Şekil 4.10.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Omeprazol sodyum] grafiği



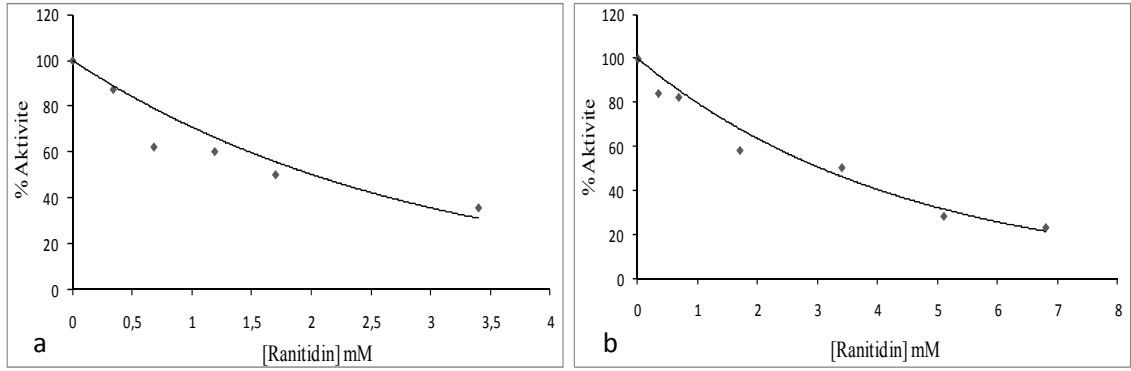
**Şekil 4.11.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Omeprazol sodyum] grafiği



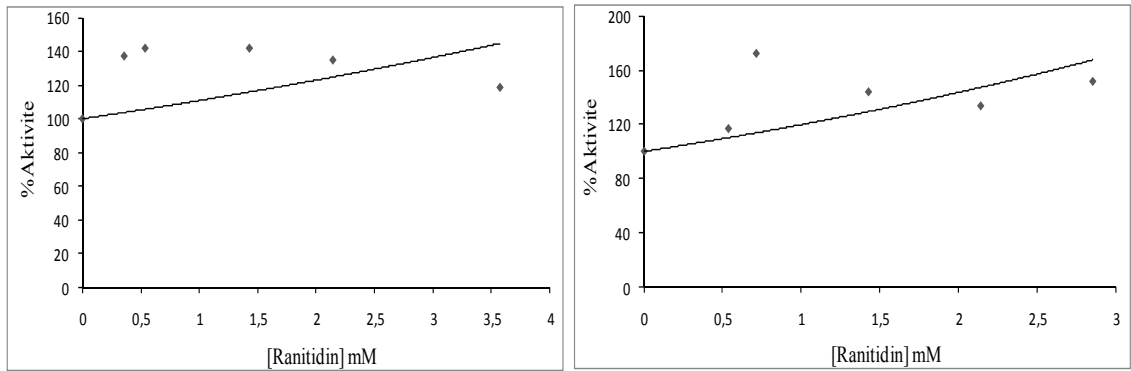
**Şekil 4.12.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Pantoprazol sodyum] grafiği



**Şekil 4.13.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Pantoprazol sodyum] grafiği



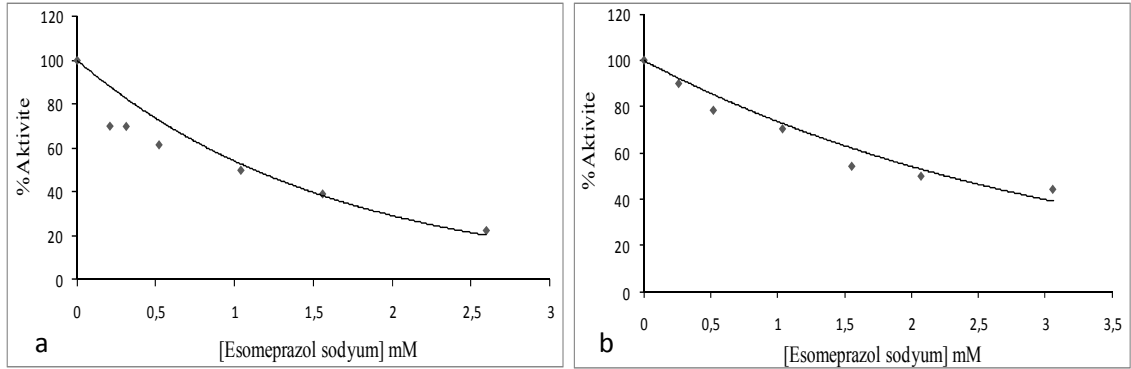
**Şekil 4.14.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Ranitidin] grafiği



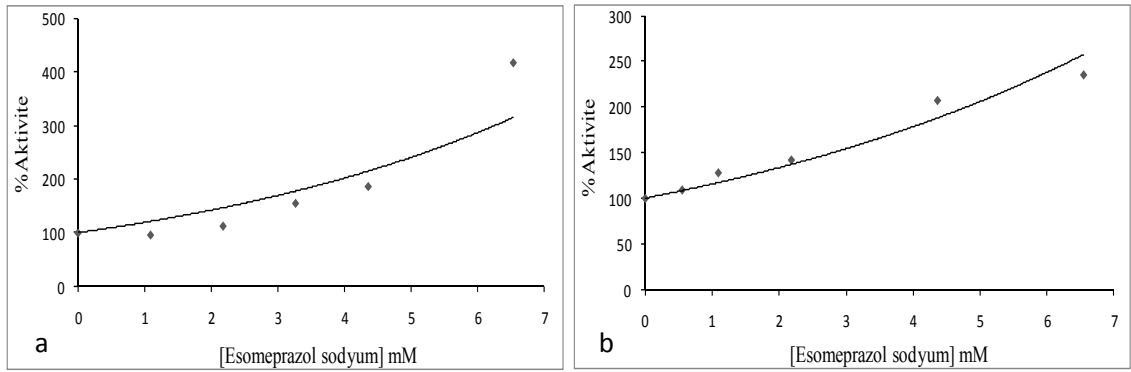
**Şekil 4.15.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Ranitidin] grafiği

a

b



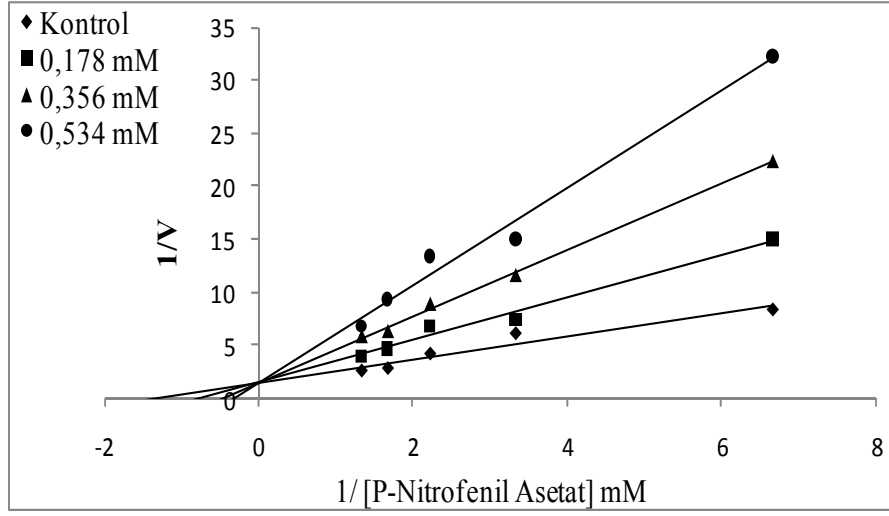
**Şekil 4.16.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Esomeprazol sodyum] grafiği



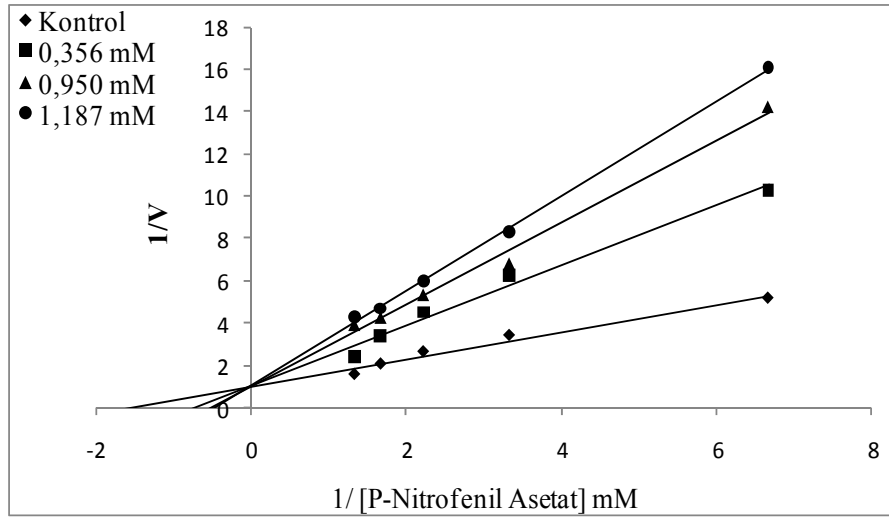
**Şekil 4.17.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Esomeprazol sodyum] grafiği

#### 4.3.1.b. hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren antiülser ilaçların $K_i$ sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

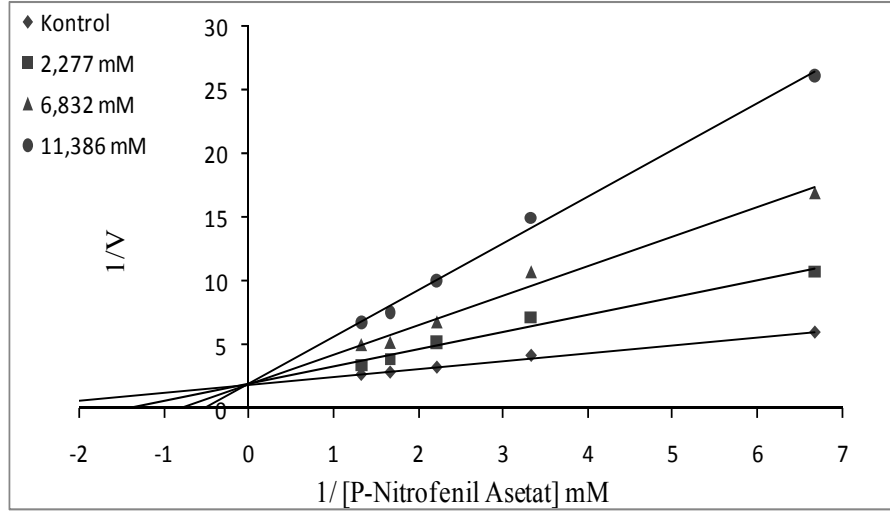
hCA I ve hCA II enzimlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra, kullanılan antiülser ilaçlar için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak;  $1/V-1/S$  değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek,  $K_i$  değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi (Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20).



Şekil 4.18. hCA-I enziminin üç farklı sabit famotidin konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. hCA-II izoenziminin üç farklı sabit famotidin konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



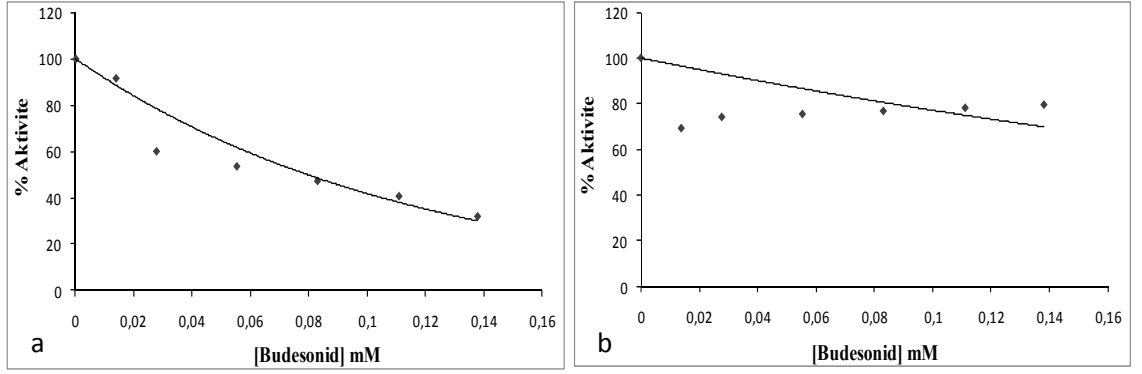
**Şekil 4.20.** hCA-I izoenziminin üç farklı sabit hiyosin-N-butil bromür konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği

#### 4.3.2. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine glukokortikoid ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

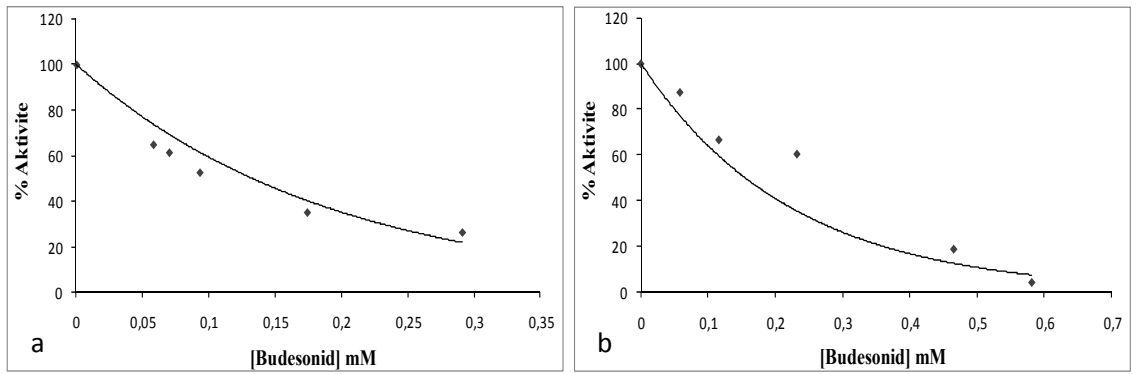
Doygun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit CA-I ve CA II izoenzimleri için budesonid, deksametazon sodyum fosfat, flutikazon propiyonat, metilprednizolon asetat, metilprednizolon sodyum süksinat ve prednizolondan oluşan 6 farklı glukokortikoid ilacın inhibisyon etkisi araştırıldı.

##### 4.3.2.a. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri kullanılarak glukokortikoid ilaçların IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları

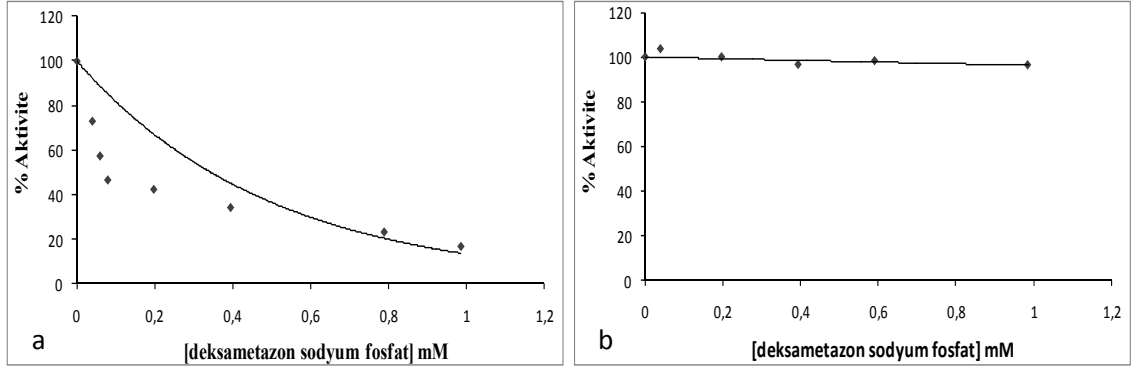
Her bir glukokortikoid ilaç için (%) Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC<sub>50</sub> değerleri) hesaplandı (Şekil 4.21-Şekil 4.30).



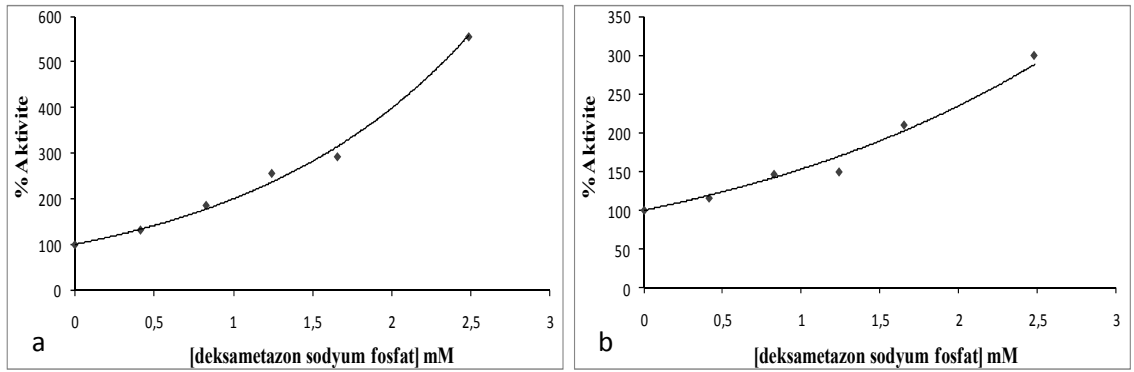
**Şekil 4.21.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Budesonid] grafiği



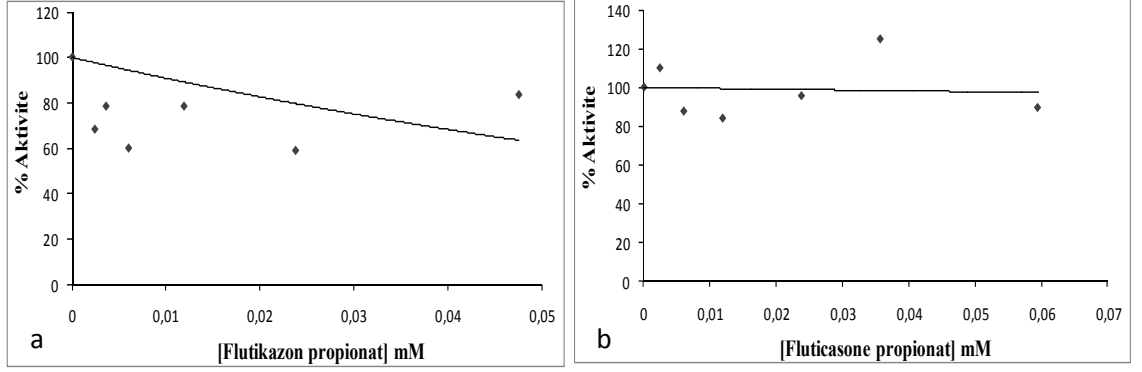
**Şekil 4.22.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Budesonid] grafiği



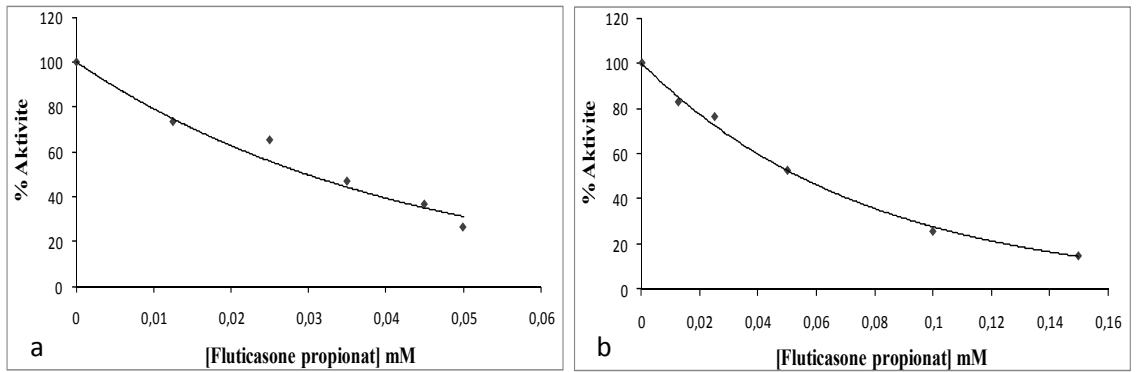
**Şekil 4.23.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Deksametazon sodyum fosfat] grafiği



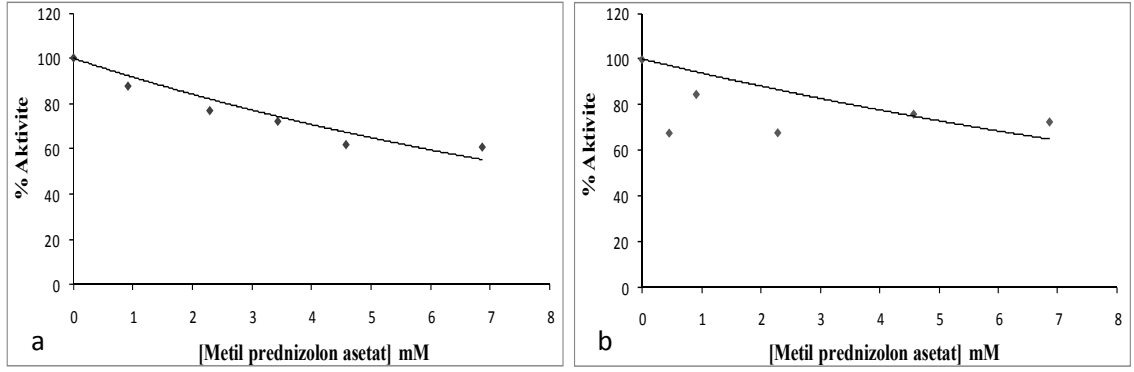
**Şekil 4.24.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Deksametazon sodyum fosfat] grafiği



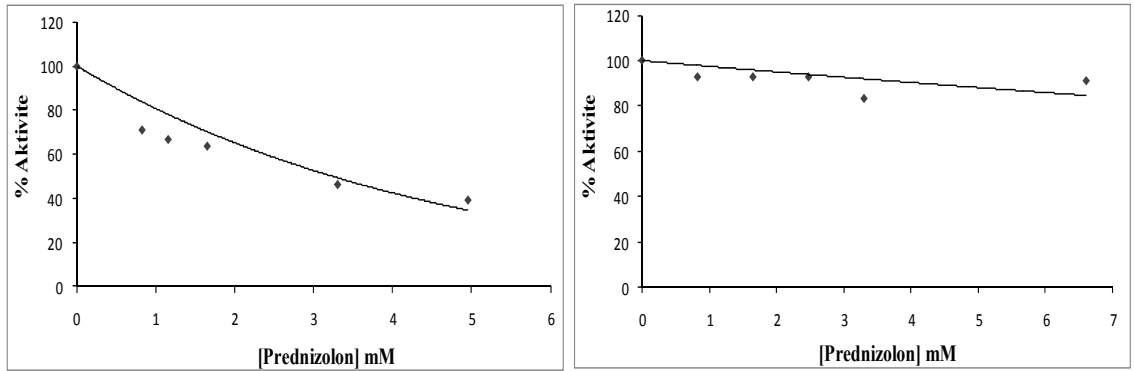
Şekil 4.25. hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Flutikazon propionat] grafiği



Şekil 4.26. hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Flutikazon propionat] grafiği



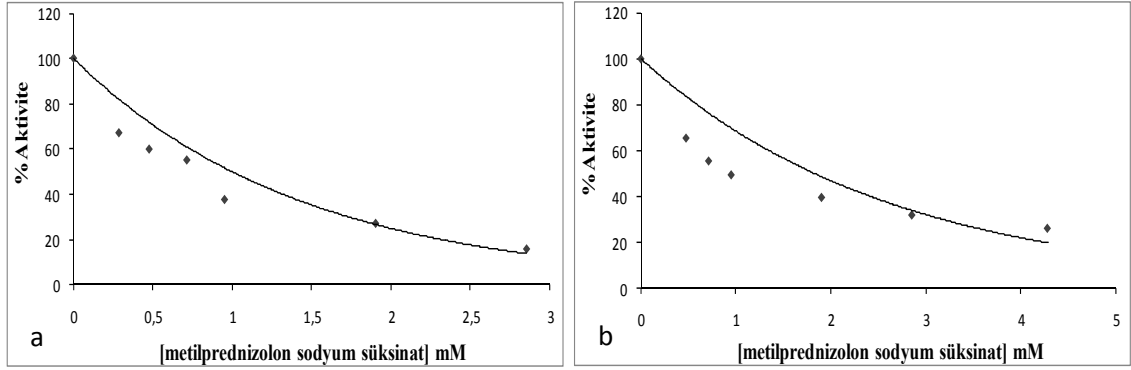
**Şekil 4.27.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Metilprednizolon asetat] grafiği



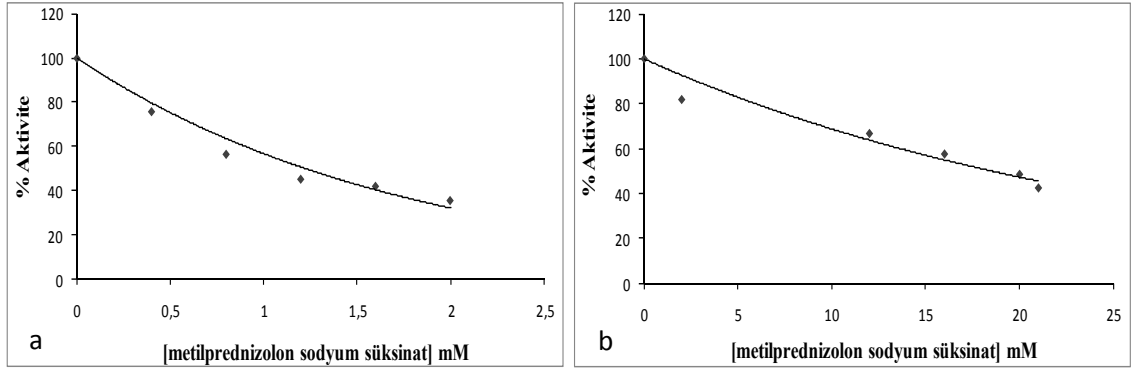
**Şekil 4.28.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Prednizolon] grafiği

a

b



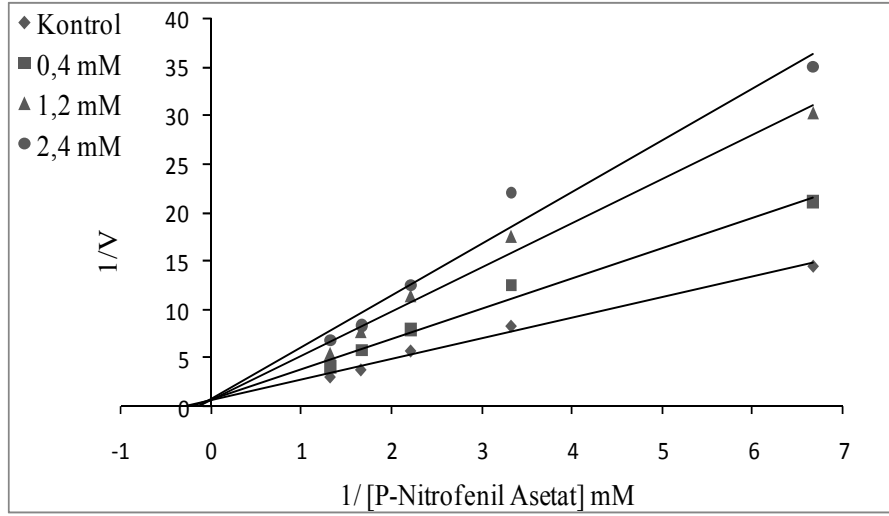
**Şekil 4.29.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Metilprednizolon sodyum süksinat] grafiği



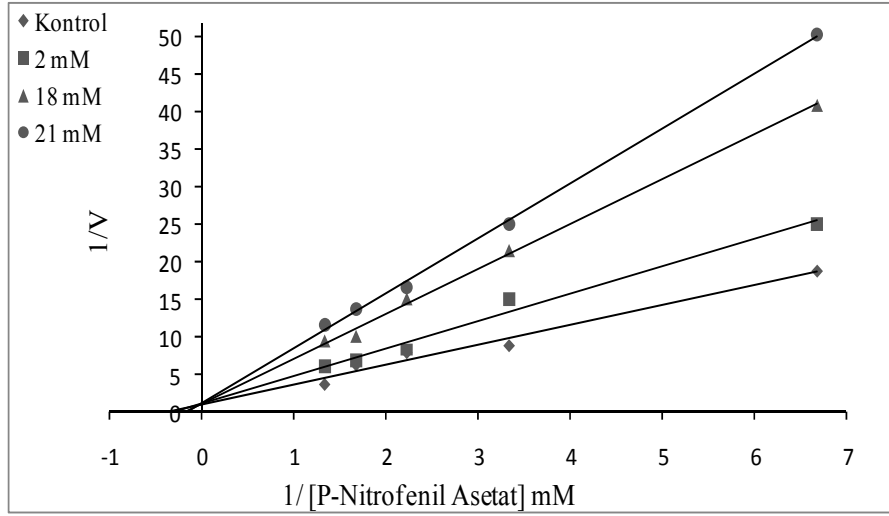
**Şekil 4.30.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Metilprednizolon sodyum süksinat] grafiği

#### 4.3.2.b. hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren glukokortikoid ilaçların $K_i$ sabitlerinin ve inhibisyon türlerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sonuçları

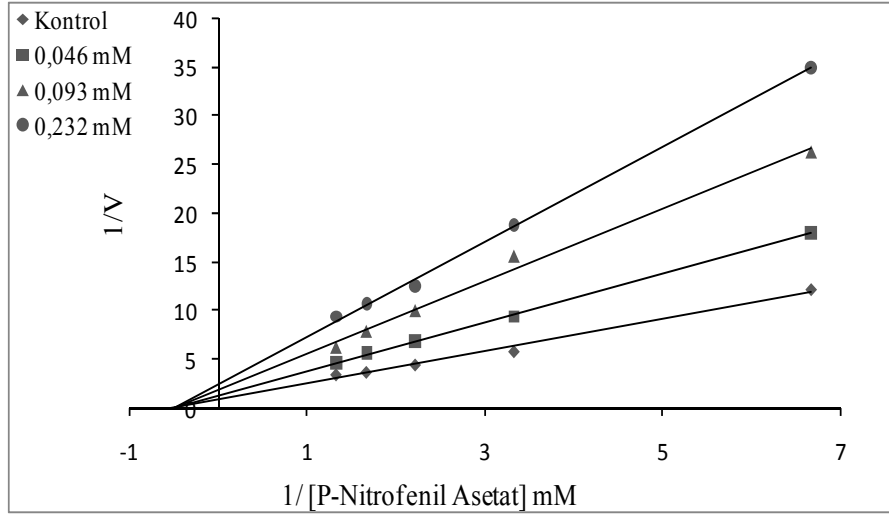
hCA I ve hCA II enzimlerinin inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümü yapıldı. Daha sonra, kullanılan glukokortikoid ilaçlar için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak;  $1/V-1/S$  değerleri bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek,  $K_i$  değerleri hesaplandı ve inhibisyon türleri belirlendi (Şekil 4.31-Şekil 4.36).



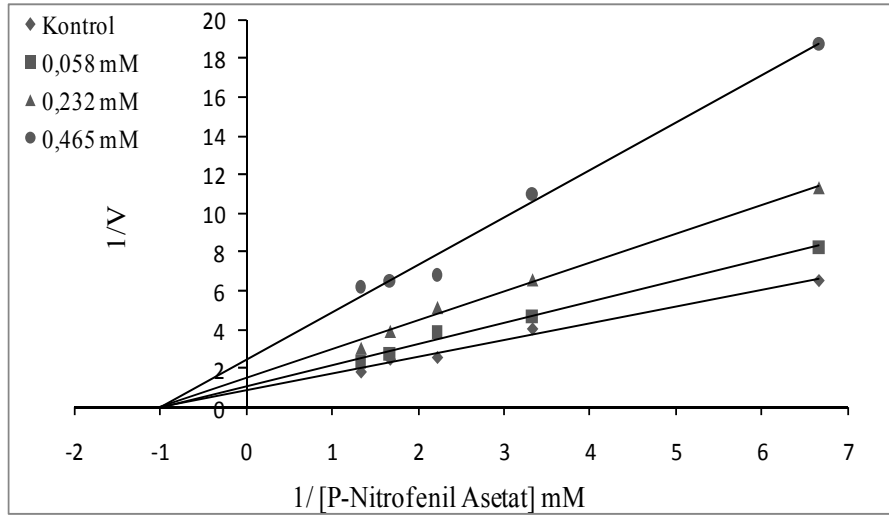
**Şekil 4.31.** hCA-I izoenziminin üç farklı sabit metilprednizolon sodyum süksinat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



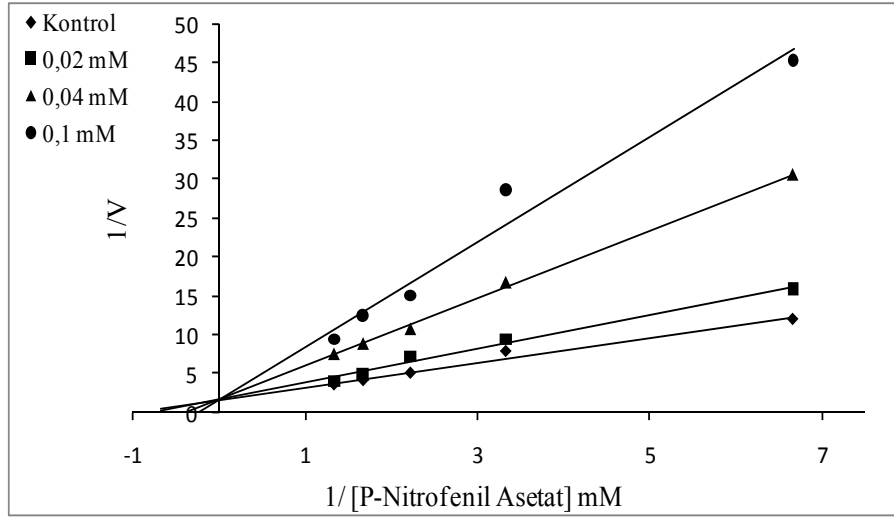
**Şekil 4.32.** hCA-II izoenziminin üç farklı sabit metilprednizolon sodyum süksinat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



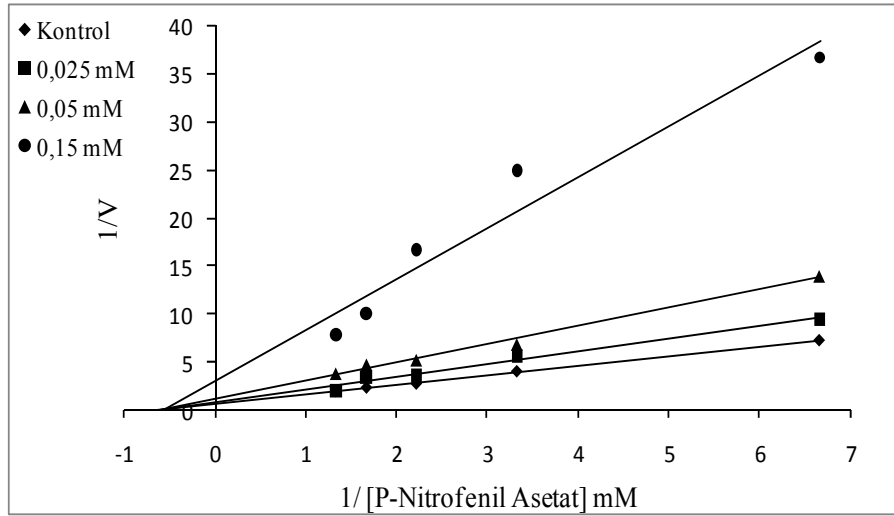
**Şekil 4.33.** hCA-I enziminin üç farklı sabit budesonid konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.34.** hCA-II enziminin üç farklı sabit budesonid konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.35.** hCA-I enziminin üç farklı sabit flutikason propionat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği



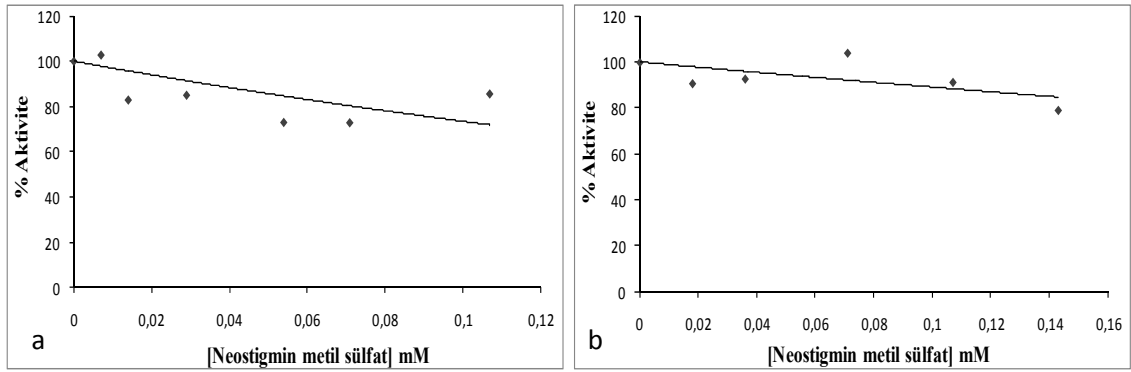
**Şekil 4.36.** hCA-II enziminin üç farklı sabit flutikason propionat konsantrasyonu ve beş farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği

### 4.3.3. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktiviteleri üzerine ürolojik ilaçların etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların sonuçları

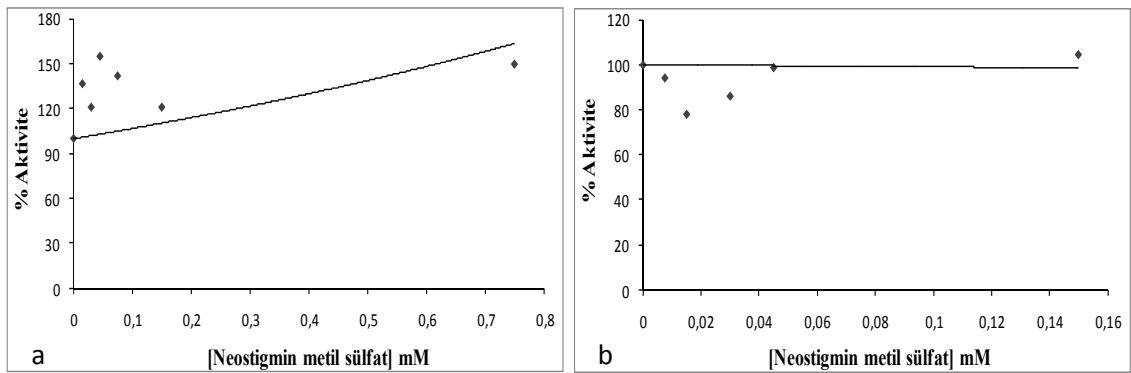
Doğun substrat konsantrasyonunda insan eritrosit CA-I ve CA II izoenzimleri için neostigmin metil sülfat ve levofloksasinden oluşan 2 farklı ürolojik ilacın inhibisyon etkisi araştırıldı.

#### 4.3.3.a. hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri kullanılarak ürolojik ilaçların $IC_{50}$ değerlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmaların sonuçları

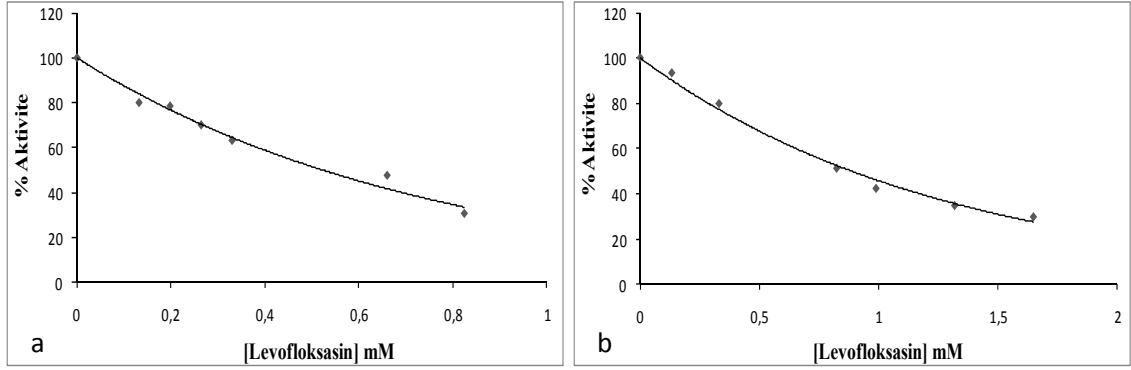
Her bir ürolojik ilaç için (%) Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları ( $IC_{50}$  değerleri) hesaplandı (Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39).



**Şekil 4.37.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Neostigmin metil sülfat] grafiği



**Şekil 4.38.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenzimlerinin esteraz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite)-[Neostigmin metil sülfat] grafiği



**Şekil 4.39.** hCA-I (a) ve hCA-II (b) izoenziminin hidrataz aktivitesi metodu için çizilen (% Aktivite-[Levofloksasin] grafiği

#### 4.4. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Hidrataz ve Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Antiülser, Glukokortikoid ve Ürolojik İlaçlarının IC<sub>50</sub> ve K<sub>i</sub> Değerlerinin Belirlenmesi İle İlgili Toplam Sonuçlar

% Aktivite-[I] grafikleri çizilen ve inhibisyon gösteren her bir ilacın daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC<sub>50</sub> değerleri), K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon türleri belirlendi. Daha sonra tüm verilerin daha iyi karşılaştırılabilmesi için bu değerler bir çizelge halinde gösterildi (Çizelge 4.2 ve 4.3).

**Çizelge 4.2.** hCA-I ve II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlarının %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC<sub>50</sub> değerleri)

İlaçlar	Hidrataz IC <sub>50</sub> (mM)		Esteraz IC <sub>50</sub> (mM)	
	CA-I	CA-II	CA-I	CA-II
<b>Antiülserler</b>				
Famotidin	0,09	0,296	0,29	0,93
Hiyosin-N-Butil bromür	3,15	İnhibisyon yok	7,7	İnhibisyon yok
Nizatidin	1,85	4,17	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Omeprazol sodyum	0,65	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Pantoprazol sodyum	0,24	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Ranitidin HCl	2,02	3,05	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
Esomeprazol sodyum	1,125	2,26	Aktivasyon	Aktivasyon
<b>Glukokortikoidler</b>				
Budesonid	0,08	İnhibisyon yok	0,133	0,155
Deksametazon sodyum fosfat	0,344	İnhibisyon yok	Aktivasyon	Aktivasyon
Flutikazon propiyonat	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	0,03	0,054
Metilprednizolon asetat	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	--	--
Metilprednizolon sodyum süksinat	0,998	1,82	1,22	18,73
Prednizolon	3,24	İnhibisyon yok	--	--
<b>Ürolojikler</b>				
Levofloksasin	0,52	0,886	--	--
Neostigmin metilsülfat	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok

**Çizelge 4.3.** hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antiülser ve glukokortikoid ilaçların  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri

İlaçlar	$K_i$ (mM)	
	CA-I	CA-II
<b>Antiülserler</b>		
Famotidin	0,177±0,04 (yarışmalı)	0,431±0,10 (yarışmalı)
Hiyosin-N-butil bromür	2,19±0,302 (yarışmalı)	--
<b>Glukokortikoidler</b>		
Budesonid	0,093±0,022 (yarışmasız)	0,295±0,04 (yarışmasız)
Flutikazon propiyonat	0,0365±0,016 (yarışmalı)	0,054±0,018 (yarışmasız)
Metilprednizolon sodyum süksinat	1,149±0,35 (yarışmalı)	11,09±5,02 (yarışmalı)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlı organizmalarda anahtar bir metabolit olan CO<sub>2</sub>'in çevresel konsantrasyonu nadiren yüksektir ve CO<sub>2</sub> HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ile denge halindedir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde iyi çözünür fakat lipitlerde az çözünürken CO<sub>2</sub> hem sulu çözeltilerde hem de lipitlerde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Bu yüzden CO<sub>2</sub> hücre içine ve dışına kolayca geçmesine rağmen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in hücre membranlarından taşınması gereklidir. pH 6,3'ün üstünde her iki tür arasındaki denge HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tarafına kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> konsantrasyonlarının sürdürülmesinde problem oluşur. Bu durumda karbonik anhidraz devreye girerek bu problemi çözer. Çünkü fizyolojik pH da CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in birbirine dönüşümü çok yavaştır ve bu durumda enzimatik kataliz şarttır. CO<sub>2</sub>'nin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a dönüşümü CO<sub>2</sub>'in hücre içinde tutulması için önemli olabilirken HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in CO<sub>2</sub>'e dönüşümü HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ün hücre içinde taşınmasını kolaylaştırabilir. Yani CO<sub>2</sub>'nin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e enzimatik dönüşümü sadece hücrenin CO<sub>2</sub>'i hücrenel enzimler için gerekli olan seviyeye konsantre etmesini sağlamaz aynı zamanda hücrenin, hücrenel işlemler sonucunda oluşan CO<sub>2</sub> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in uygun seviyede tutulmasına yardım eder. Karbonik anhidraz CO<sub>2</sub>'in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a dönüşümünü katalizleyen ve Zn<sup>2+</sup> içeren bir enzimdir (Smith and Ferry 2000).

İnsan eritrositlerinde karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) aktivite seviyesinin, belirli patolojik ve fizyolojik şartlar altında önemli değişiklikler gösterdiği belirlenmiştir. CA aktivitesindeki değişiklikler diabet ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklarla ilişkilidir (Parui *et al.* 1991, 1992). CA inhibisyonunun proksimat tübül lümenindeki proton salınımına zararlı olduğu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> geri absorpsiyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda karbonik anhidrazın inhibisyonu idrar asitliği oranını, alkali idrar üretimini ve metabolik asitliği azalttığı da tespit edilmiştir (Hannedoeche *et al.* 1991).

Birçok kaynaktan saflaştırılan CA enzimlerinin çeşitli bileşikler tarafından inhibe olduğu tespit edilmiştir. Asetazolamid, ağır metaller ve sülfonilamidlerin kuvvetli CA

inhibitörü olduğu bulunmuştur (Vitale *et al.* 1999). Ek olarak bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar streptomisin sülfat, sodyum dipiron, magnezyum sülfat, seftizoksim sodyum, sefuroksim sodyum, sefoperazon sodyum, stoptomisin sülfat ve metilmisin sülfat gibi antibiyotikler, bazı kimyasallar ve bazı pestisitlerin de CA enziminin aktivitesini büyük ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir (Beydemir *et al.* 2000, 2002).

İlaçların belirli bir organı veya dokuyu etkiyebilmeleri için o etki yerine belirli bir konsantrasyon eşiğini aşacak miktarda ulaşmaları gerekir. Etki yerine ulaşmasının ilk kademesini ilacın, vücuda uygulandığı yerden emilmesi, ikinci kademesini ise ilacın dolaşan kandan dokulara dağılımı oluşturur. İlaçlar vücutta, uygulandıkları andan itibaren çeşitli enzimlerin etkisine maruz kalırlar. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilirler.

İlaçların etkileri ve etki mekanizmaları *in vivo* veya *in vitro* olarak incelenir. *In vitro* yöntemlerde izole organ ya da dokudan, hücre homojenatları veya bu homojenatlardan kısmen ya da tamamen izole edilmiş enzimler kullanılır. Organ düzeyinde ilaçların etkisi *in vivo* deneylerde ve *in vitro* deneylerde farklı bulunabilir. Bunun başlıca nedeni *in vivo* durumda organ, fizyolojik sinirsel ve/veya hormonal düzenleme mekanizmalarının etkisi altındadır ve ilacın oluşturduğu direkt etki, bu mekanizmaları aktive veya deaktive ederek ikincil etkilerin doğmasına ve primer etkinin modifiye edilmesine ya da maskelenmesine neden olabilir. *In vitro* durumda homeostatik mekanizmalarla kontrol söz konusu değildir ve ilacın direkt etkisi, bozulmaksızın ortaya çıkar. Bu iki durumda ilaca karşı organın davranışı farklı olabilir (Kayaalp 2002). Bu yüzden sadece *in vivo* çalışmalar değil aynı zamanda *in vitro* çalışmalarda çok önemli ve değerli çalışmalardır. Çünkü bir hastalıktan ya da herhangi bir dış etkiden dolayı *in vivo* koşullardaki değişiklik durumunda kullanılacak ilacın ya da tedavinin, nasıl bir etki göstereceğini anlamak sadece *in vitro* koşullardaki çalışmalar vasıtasıyla tahmin edilebilir.

Beydemir *et al.* (2000) yaptığı bir çalışmada insan eritrosit CA I ve CA II izoenzimleri üzerine hidrataz aktivitesi ile bazı antibiyotiklerin inhibisyon etkileri incelemiştir.

Çalışma sonucunda; sodyum amfisilin hCA I' i inhibe ettiğini, sodyum dipirionun aktive ettiğini fakat MgSO<sub>4</sub>'ün hiçbir etki göstermediğini bulmuşlardır. hCA II'yi ise sodyum amfisilin ve MgSO<sub>4</sub> inhibe ederken sodyum dipirionun aktive ettiğini tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hidrataz aktivitesiyle antiülser ilaçlardan famotidin, hiyosin-N-butyl bromür, nizatidin, omeprazol sodyum, pantoprazol sodyum, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyum ilaçlarının tümü hCA I' e inhibisyon etkisi gösterirken, hCA II'ye ise sadece famotidin, nizatidin, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyum ilaçları inhibisyon etkisi göstermiştir. Yine hidrataz aktivitesinde glukokortikoid ilaçlardan budesonid, deksametazon sodyum fosfat, metilprednizolon sodyum süksinat ve prednizolon hCA I' e inhibisyon etkisi gösterirken, hCA II'ye sadece metilprednizolon sodyum süksinat inhibisyon etkisi göstermiştir, flutikazon propiyonat ve metilprednizolon asetat ise iki enzim üzerine de düzenli bir inhibisyon etkisi göstermemişlerdir. Yine hidrataz metodunda ürolojik ilaçlardan levofloksasin hem hCA I' e hem de hCA II'ye inhibisyon etkisi gösterirken neostigmin metil sülfat düzenli bir inhibisyon etkisi göstermemiştir.

Chazallete *et al.* (2004) sülfonilamidlere indan parçaları katılmasıyla oluşturulan sülfonilamid türevlerinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyonunu incelemişlerdir. Asetamido, 4-kloro-benzoil, valproil, tetra ve penta flor benzoil metabolitlerinin katıldığı sülfonilamidler hCA I ve hCA II izoenzimlerinin güçlü birer inhibitörü gibi davranmışlardır (hCA I için K<sub>i</sub> değeri 1,6-8,5 nM ve hCA II için K<sub>i</sub> değeri 2,3-12 nM arasında bulunmuştur). Fakat bu sülfonilamidler metazolamid gibi diğer CA inhibitörü sülfonilamidlerle kıyaslandığında daha düşük antiepileptik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da yapısında sülfonilamid bulunan famotidin, hidroksil bulunan hiyosin N-butyl bromür, kükürt ve flor bulunan flutikazon propiyonat ve asetat bulunan metilprednizolon sodyum süksinat ilaçları Chazallete'nin çalışmasındaki moleküllere göre daha zayıf olarak enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi göstermişlerdir.

Çoban *et al.* (2007) insan eritrositlerinden %66,95 verim, 745,1 kat ve 3892,3 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırdıkları hCA I ve %62,82 verim, 2232,6 kat ve

116632 EÜ/mg protein spesifik aktiviteyle saflaştırdıkları hCA II enzimleri üzerine morfinin inhibisyon etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; enzimin hidrataz aktivitesiyle hCA I için IC<sub>50</sub> değeri  $4,5 \times 10^{-5}$  M ve hCA II için IC<sub>50</sub> değeri  $9,23 \times 10^{-5}$  M olarak bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışma kapsamında *in vivo* olarak sıçan eritrositlerinde yapılan çalışmada morfinin her iki enzim üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Ekinci *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada; hCA I ve hCA II izoenzimleri sırasıyla 104 ve 900 kat saflaştırılmıştır. %30 ve %40 verimle saflaştırılan 920 ve 8000 EÜ/mg protein spesifik aktivitesine sahip hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine ceftriaxone sodyum, imipenem ve ornidazol ilaçlarının *in vitro* etkileri incelenmiştir. hCA I'in hidrataz aktivitesi için sırasıyla IC<sub>50</sub> değerleri 0,864 mM, 0,00354 mM ve 0,131 mM, esteraz aktivitesi için 1,9 mM, 0,0081 mM ve 0,318 mM olarak bulunmuştur. hCA II'nin hidrataz aktivitesi için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1,118 mM, 0,0214 mM ve 0,263 mM, esteraz aktivitesi için 2,542 mM, 0,0258 mM ve 0,343 mM olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise 2531,65 EÜ/mg protein spesifik aktivite, 353,58 kat ve %41,94 verimle saflaştırılan hCA I ve 4927,01 EÜ/mg protein spesifik aktivite, 688,13 kat ve %56,62 verimle saflaştırılan hCA II izoenzimlerinin üzerine bazı antiülser, glukokortikoid ve ürolojik ilaçların etkileri hem hidrataz hem de esteraz metotlarıyla incelenmiştir. Çalışma sonucunda hidrataz aktivitesinde hCA I için IC<sub>50</sub> değerleri 0,08-3,24 mM arasında ve hCA II için 0,296-4,17 mM arasında daha zayıf inhibisyonlar bulunmuştur. Esteraz aktivitesinde ise hCA I için 0,03-7,7 mM arasında ve hCA II için 0,054-18,73 mM arasında yine daha zayıf inhibisyonlar bulunmuştur.

Bayram *et al.* (2008) salisilik asit türevlerinin esteraz aktivitesi ile insan eritrosit CA I ve CA II izoenzimleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, hCA I için; salisilik asit, 4-aminosalisilik asit, 4,6-dinitro salisilik asit, 3-metil salisilik asit, diflunisal, sulfasalazin ve asetil salisilik asitin yarışmasız, 4-sulfosalisilik asit ve 5-klorosalisilik asitin yarıyarışmalı, 5-sulfosalisilik asitin ise yarışmalı olarak inhibisyon etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir. hCA II için ise; hCA I'den farklı olarak 4-sulfosalisilik asitin yarışmalı, 5-sulfosalisilik asitin yarışmasız, 3-metil salisilik asitin yarıyarışmalı olarak inhibisyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Şentürk *et al.* (2009)

hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine antioksidan fenollerin etkisini incelemişlerdir. İnhibitör olarak 2,6 dimetilfenol, 2,6 diizopropilfenol, 2,6 detersiyerbütül fenol, bütirat hidroksi toluen, bütilat hidroksiyanizol, vanilin guayakol ve asetazolamin gibi antioksidanların kullanıldığı çalışmanın sonunda tüm fenollerin yarışmasız inhibisyon etkisi gösterdiğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise hCA I üzerine yarışmalı inhibisyon gösteren flutikazon propiyonat hCA II üzerine yarışmasız inhibisyon göstermiş, hiyosin N-butil bromür hCA I üzerine yarışmalı inhibisyon gösterirken hCA II üzerine inhibisyon etkisi göstermemiştir. Famotidin ve metil prednizolon sodyum süksinat sözü edilen her iki enzime de yarışmalı olarak inhibisyon gösterirken budesonid her iki enzime yarışmasız olarak inhibisyon etkisi göstermiştir.

Sinan *et al.* (2009) hCA I ve hCA II enzimleri üzerine sprofloksasin, kloritromisin, rifamisin SV, gentamisin sülfat, klindamisin fosfat, klorafenikol, sodyum ampicilin ve sefazolin sodyum antibiyotiklerinin *in vitro* etkilerini incelemişler. Çalışma sonucunda hCA I ve hCA II için en etkili inhibitörün sırasıyla 0,00163 mM ve 0,00114 mM IC<sub>50</sub> değeri ile sodyum ampicilin olduğunu bulmuşlardır. En az etkiyi ise hCA I ve hCA II için sırasıyla 0,00358 mM ve 0,00308 mM IC<sub>50</sub> değeri ile sefazolin sodyumun gösterdiğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise hCA I ve hCA II için en etkili inhibitörler sırasıyla 0,08 mM ve 0,292 mM IC<sub>50</sub> değeri ile budesonid ve famotidin iken en etkisiz inhibitörler sırasıyla 3,24 mM ve 4,17 mM IC<sub>50</sub> değeri ile prednizolon ve nizatidindir.

Bir başka çalışmada ise kemoterapide sıklıkla kullanılan ilaçlarının hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenmiş, hCA-I ve hCA-II izoenzimleri sırasıyla 93,52 ve 661,90 kat ve %54,00, %56,46 verimlerle saflaştırmıştır. Daha sonra IC<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, hidrataz aktivitesi kullanılarak bu ilaçların insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış ve %Aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden bleomisin sülfat, tratuzumab, ifosfamide, bevacizumab, fludarabin, kalsiyum folinat, vinkristin sülfat, sitarabin ve rituksimab kemoterapi ilaçlarının hCA I için IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 0,196 µM, 0,001 µM, 4,034 µM, 0,006 µM, 3,408 µM, 0,759 µM, 0,050 µM, 2,399 µM ve 0,002 µM ve

hCA II için IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 0,324 µM, 0,002 µM, 2,519 µM, 0,007 µM, 5,034 µM, 0,816 µM, 0,060 µM, 3,467 µM ve 0,003 µM olarak belirlenmiştir. K<sub>i</sub> değerlerinin bulunması için esteraz aktivitesi ile ilaçların inhibisyon etkilerine bakılmış, fakat en yüksek konsantrasyonda bile bu ilaçların esteraz aktivitesinde hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği bulunmuştur (Topal 2009). Bizim çalışmamızda ise hidrataz aktivitesinde inhibisyon gösteren nizatidin, omeprazol sodyum, pantoprazol sodyum, ranitidin HCl, esomeprazol sodyum ve deksametazon sodyum fosfat ilaçları esteraz aktivitelerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. Fulutikazon propiyonat ise hidrataz aktivitesinde inhibisyon göstermemesine karşın esteraz aktivitesinde inhibisyon göstermiştir.

Omeprazol, famotidin ve ranitidin antiülser ilaçlarının CA izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerini incelemek için yapılan başka bir çalışmada *in vitro* ve *in vivo* çalışılmış ve bu amaçla sığır midesi ve sıçan eritrositlerinden çalışılmıştır. Çalışma sonucunda her üç ilacında hem *in vivo* hem de *in vitro* etkileri periferik ve stozolik CA'lar üzerine yarı yarışmalı olduğu bulunmuştur (Demir *et al.* 2004). Bizim çalışmamızda ise famotidin, hiyosin-N-butil bromür, nizatidin, omeprazol sodyum, pantoprazol sodyum, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyum antiülser ilaçlarının insan eritrositlerinden saflaştırılan CA I ve CA II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine inhibisyon etkileri hem hidrataz hemde esteraz aktivitesi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Yaptığımız çalışmalar sonucunda famotidin her iki izoenzimi her iki aktivite ölçüm yönteminde de inhibe ettiği ve esteraz aktivitesinde yarışmalı olarak inhibe ettiği, omeprazolun sadece hidrataz aktivitesinde hCA I'i inhibe ettiği hCA II enzimi içinse düzenli bir inhibisyon etkisi göstermediği, ranitidin ise her iki izoenzimi de hidrataz aktivitesinde inhibe ettiği esteraz aktivitesinde ise inhibisyon etkisi göstermediği gözlemlenmiştir.

Hiyosin-N-butil bromür ile ilgili yapılan bir çalışmada insan nikotik asetilkolin reseptörlerini inhibe ettiği gözlenmiş, IC<sub>50</sub> değerleri 25,9 ±0,6 ve 40,1 ±0,4 µM olarak hesaplanmıştır (Weiser and Just 2009). Çalışmamızda ise bu ilacın hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi incelenmiş ve hCA II izoenzimi üzerine düzenli

inhibisyon göstermediği, hCA I enzimine ise hem hidrataz hem de esteraz aktivitesinde inhibisyon gösterdiği ve inhibisyon türünün yarışmalı olduğu belirlenmiştir.

Son zamanlarda inhibitörlerin CA izoenzimlerine bağlanma modelleri ile ilgili yoğun çalışmalar devam etmektedir. Bu durum glukoma hastalığı için yeni ilaçlar dizaynında oldukça önemlidir. Sülfanilamidlerin ve fenolik bileşiklerin CA izoenzimlerinin doğal inhibitörü olduğu bilinmektedir (Şentürk *et al.* 2009).

Yapılan çok sayıda çalışma sonucunda CA inhibitörlerinin dört temel gruba bağlandığı bulunmuştur (Şekil 5.1.). Bunlar;

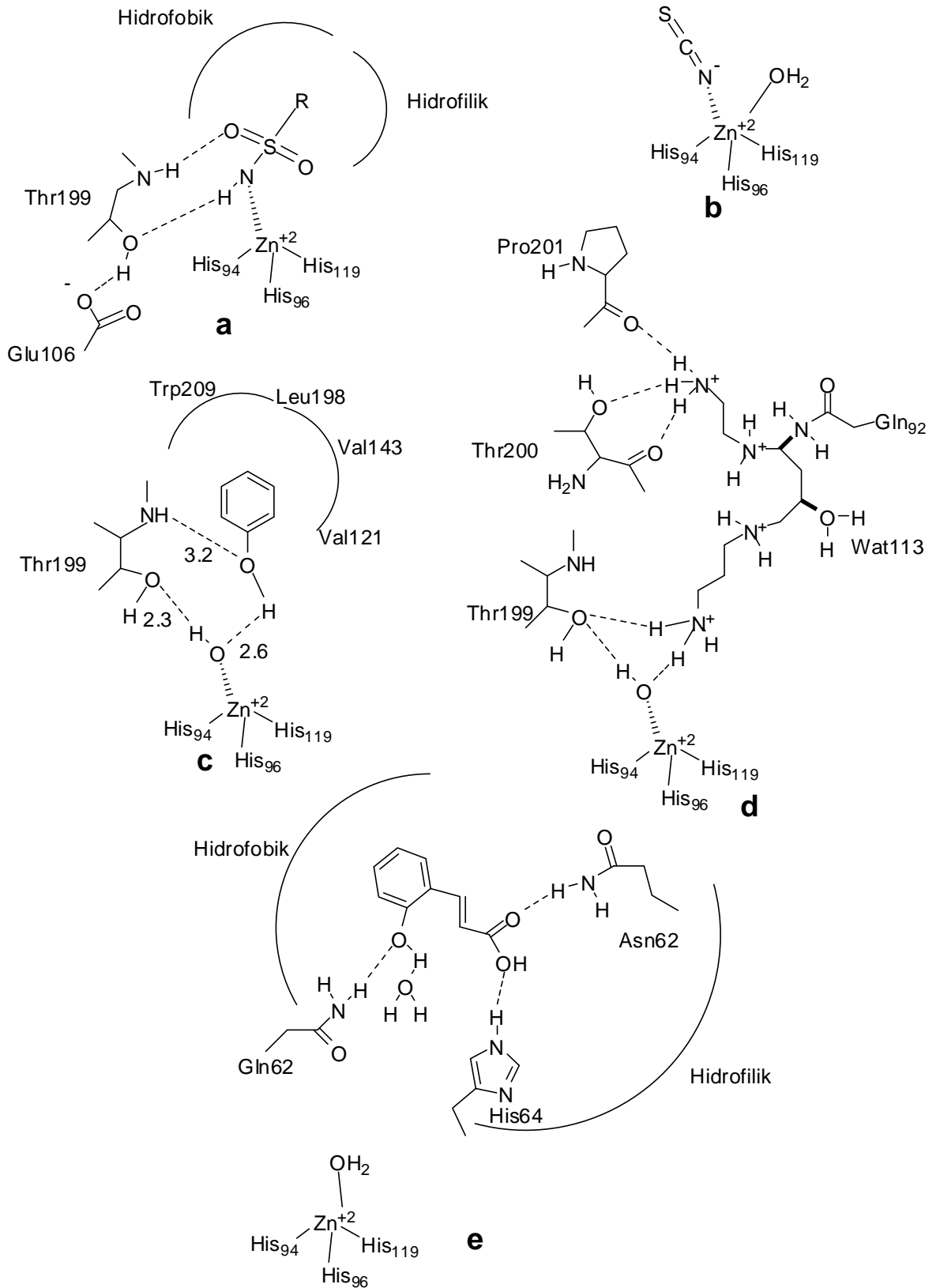
i) sülfonamidler (sulfomatlar, sülfamidler ve benzer türevleri gibi stereoizomerleri) enzimin aktif bölgesinden  $Zn^{2+}$  iyonuna tetrahedral veya trigonalbipiramidal geometrilerle koordine olan metal kompleksi yapan anyonlar (Şekil 5.1 a ve b) (Parkkila *et al.* 2004; Nishimori *et al.* 2004; Silverman and McKenna 2007; Thiry *et al.* 2007; Supuran 2008; Schulze *et al.* 2010; Supuran 2010).

ii) Aktif bölgeden çinkoya koordine su molekülünün hidroksil iyonuna iki hidrojen bağı aracılığıyla bağlanan fenoller (basit fenol gibi  $C_6H_5OH$ ) (Şekil 5.1 c) (Nair *et al.* 1994; Innocenti *et al.* 2008a,b,c).

iii) fenollerle farklı bir şekilde bağlanan yani  $Zn^{2+}$ ya koordine su molekülünün hidroksil iyonuna bağlanan spermin, spermidin ve benzer şekildeki poliaminler (Şekil 5.1 d) (Carta *et al.* 2010).

iv) son zamanlarda tanımlanan  $Zn^{2+}$ ya bağımlı olmayan, aktivatörlerle aynı etkin bölgeye, aktif bölgenin girişine, bağlanan inhibisyon mekanizmasına sahip kumarinler, tiyokumarinler gibi CA inhibitörleri (Şekil. 5.1 e) (Maresca *et al.* 2009, 2010a,b,c; Temperini *et al.* 2010).

Olarak sıralanabilir.



Şekil 5.1. CA inhibitörlerinin bağlanma modelleri (Durdağı *et al.* 2011)

Yapılan çalışma sonucunda famotidin, hiyosin-N-butil bromür, nizatidin, omeprazol sodyum, pantoprazol sodyum, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyum antiülser ilaçlarının tümünün hCA I'e hidrataz aktivitesinde inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlenmiştir. hCA II'ye ise hidrataz aktivitesinde sadece famotidin, nizatidin, ranitidin HCl ve esomeprazol sodyum ilaçlarının inhibisyon etkisi gösterdiği diğer ilaçların ise hidrataz aktivitesinde düzenli bir inhibisyon göstermediği gözlemlenmiştir. Esteraz aktivitesinde famotidin hem hCA I'e hem de hCA II'ye inhibisyon etkisi gösterirken hiyosin-N-butil bromür sadece hCA I'e inhibisyon etkisi göstermiştir. Esomeprazol sodyum ise esteraz aktivitesinde her iki enzimi de düzenli bir şekilde aktive etmiştir. Diğer antiülser ilaçların ise esteraz aktivitesinde düzenli bir inhibisyon etkisi göstermediği bulunmuştur. Famotidin ve hiyosin-N-butil bromürün inhibisyon türü ise yarışmalı olarak belirlenmiştir. Dönüşümlü inhibisyonun bir tipi olan yarışmalı inhibisyonda yarışmalı inhibitörün yapı itibariyle substrata benzediği ve enzimin aktif bölgesine bağlandığı bilinmektedir. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_M$  değeri artar. İnhibitör ile substrat aktif bölgeye bağlanmada yarış halindedir. Famotidin için bağlanma modeli olarak Şekil 5.1a'da gösterildiği gibi famotidinün sülfonilamid grubundan enzimin aktif bölgesindeki Thr199'un -OH ve -NH gruplarına ve enzimin merkezindeki  $Zn^{2+}$  atomuna bağlandığı düşünülmüştür. Hiyosin-N-butil bromür ise Şekil 5.1c'de gösterildiği gibi -OH grubundan enzimin aktif bölgesindeki Thr199 aminoasitin -NH grubuna ve  $Zn^{2+}$ 'ye bağlı -OH'nin oksijenine bağlandığı düşünülmektedir.

Çalışmanın diğer bir aşamasında glukokortikoid ilaçlardan budesonid, deksametazon sodyum fosfat, metilprednizolon sodyum süksinat ve prednizolonun hidrataz aktivitesinde hCA I'e inhibisyon etkisi gösterdiği flutikazon propiyonat ve metilprednizolon asetatın ise düzenli bir inhibisyon göstermediği gözlemlenmiştir. hCA II'ye ise hidrataz aktivitesinde sadece metilprednizolon sodyum süksinat inhibisyon etkisi gösterirken budesonid, deksametazon sodyum fosfat, flutikazon propiyonat metilprednizolon asetat ve prednizolonun düzenli bir inhibisyon göstermediği gözlemlenmiştir. Esteraz aktivitesinde budesonid, flutikazon propiyonat ve

metilprednizolon sodyum süksinat hem hCA I'e hem de hCA II'ye inhibisyon etkisi gösterirken deksametazon sodyum fosfatın her iki enzimi de düzenli bir şekilde aktive ettiği bulunmuştur. Esteraz aktivitesinde inhibisyon gösteren glukokortikoidlerin inhibisyon türleri ise; budesonid her iki enzimi de yarışmasız olarak, metilprednizolon sodyum süksinat iki enzimi de yarışmalı olarak ve flutikazon propiyonat hCA I'i yarışmalı hCA II'yi yarışmasız olarak belirlenmiştir. Yarışmalı türde inhibisyon gösterdiği için enzimlerin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyon etkisi gösterdiği düşünülen metilprednizolon sodyum süksinat için bağlanma şekli olarak Şekil 5.1e de gösterildiği gibi asetat grubundaki karbonilin oksijeninden enzimin aktif bölgesindeki Asn62'nin -NH grubuna, yine asetat grubunun oksijeninden His64'ün hidrojenine ve beşli halkaya bağlı -OH grubundan Gln92'nin -NH grubuna bağlandığı düşünülmüştür. hCA I'e yarışmalı inhibisyon gösteren flutikazon propiyonatın ise bağlanma modeli olarak Şekil 5.1e'dekine benzer olarak S'ye bağlı karbonilin oksijeninden Gln62'nin -NH grubuna bağlandığı, ester grubundaki karbonilden Asn62'nin -NH grubuna ve oksijeninden His64'ün -NH grubuna bağlandığı düşünülmüştür. Dönüşümlü tip olan yarışmasız inhibisyonda ise inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Bu durumda substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Enzimin  $V_{max}$  değeri azalırken,  $K_M$  sabit kalır. İnhibitör başka bir bölgeye bağlanmasına karşın enzimin konformasyonunu değiştirir ve buda inhibisyon görülmesine sebep olur. Bu yüzden hCA II'ye yarışmasız olarak inhibisyon gösteren flutikazon propiyonatın ve her iki enzime de yarışmasız inhibisyon gösteren budesonidin enzimin hangi bölgesine bağlandığı bilinmemektedir.

Çalışmanın başka bir aşamasında ise ürolojik ilaçlardan levofloksasinin hidrataz aktivitesinde hCA I ve hCA II'nin ikisine de inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Neostigmin metil sülfatın ise iki aktivite ölçüm yönteminde de hCA I ve hCA II üzerine düzenli bir inhibisyon etkisi göstermediği belirlenmiştir.

Sonuçları daha iyi kıyaslamak için çizelge 5.1. ve çizelge 5.2. düzenlenmiştir.

**Çizelge 5.1.** hCA-I ve II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ilaçlarının %50 inhibisyona sebep olan ilaç konsantrasyonları (IC<sub>50</sub> değerleri)

	İlaçlar	Hidrataz IC <sub>50</sub> (mM)		Esteraz IC <sub>50</sub> (mM)	
		CA-I	CA-II	CA-I	CA-II
Antiülserler	Famotidin	0,09	0,296	0,29	0,93
	Hiyosin-N-Butil bromür	3,15	İnhibisyon yok	7,7	İnhibisyon yok
	Nizatidin	1,85	4,17	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
	Omeprazol sodyum	0,65	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
	Pantoprazol sodyum	0,24	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
	Ranitidin HCl	2,02	3,05	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok
	Esomeprazol sodyum	1,125	2,26	Aktivasyon	Aktivasyon
Glukokortikoidler	Budesonid	0,08	İnhibisyon yok	0,133	0,155
	Deksametazon sodyum fosfat	0,344	İnhibisyon yok	Aktivasyon	Aktivasyon
	Flutikazon propiyonat	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	0,03	0,054
	Metilprednizolon asetat	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	--	--
	Metilprednizolon sodyum süksinat	0,998	1,82	1,22	18,73
	Prednizolon	3,24	İnhibisyon yok	--	--
Ürolojikler	Levofloksasin	0,52	0,886	--	--
	Neostigmin metilsülfat	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok	İnhibisyon yok

**Çizelge 5.2.** hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren antiülser ve glukokortikoid ilaçların  $K_i$  değerleri ve inhibisyon türleri

İlaçlar	$K_i$ (mM)	
	CA-I	CA-II
<b>Antiülserler</b>		
Famotidin	0,177±0,04 (yarışmalı)	0,431±0,10 (yarışmalı)
Hiyosin-N-butil bromür	2,19±0,302 (yarışmalı)	--
<b>Glukokortikoidler</b>		
Budesonid	0,093±0,022 (yarışmasız)	0,295±0,04 (yarışmasız)
Flutikazon propiyonat	0,0365±0,016 (yarışmalı)	0,054±0,018 (yarışmasız)
Metilprednizolon sodyum süksinat	1,149±0,35 (yarışmalı)	11,09±5,02 (yarışmalı)

Sonuç olarak; Antiülser, glukokortikoid ve ürolojik ilaçların insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile yaklaşık 2532 EÜ/mg protein spesifik aktivite, 354 kat ve %42 verimle saflaştırılan CA-I ve 4927 EÜ/mg protein spesifik aktivite, 688 kat ve %56 verimle saflaştırılan CA-II izoenzimleri üzerine etkileri hem hidrataz hem de esteraz aktivite metotlarıyla incelenmiştir. hCA-I ve hCA-II için en etkili inhibitörler sırasıyla 0,08 mM ve 0,292 mM  $IC_{50}$  değeri ile budesonid ve famotidin iken en etkisiz inhibitörler sırasıyla 3,24 mM ve 4,17 mM  $IC_{50}$  değeri ile prednizolon ve nizatidin olarak belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi araştırılan antiülser ilaçlardan famotidinin hCA-I ve hCA-II'ye yarışmalı inhibisyon gösterdiği, hiyosin-N-butil bromürün hCA-I'e yarışmalı inhibisyon gösterdiği hCA-II'ye ise düzenli inhibisyon etkisi olmadığı belirlenmiştir. Glukokortikoid ilaçlardan ise budesonidin hCA-I ve hCA-II üzerine yarışmasız inhibisyon gösterdiği, metilprednizolon sodyum süksinatın hCA-I ve hCA-II üzerine yarışmalı inhibisyon gösterdiği, flutikazon propiyonatın ise hCA-I'e yarışmalı hCA-II'ye ise yarışmasız inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir.

**KAYNAKLAR**

- Abacıoğlu, N., Onursal, E., Hatunoğlu, K. and Abacıoğlu, H., 2008. Güncel Farmalists. Palme Yayınevi, Ankara.
- ARENA 2002 (Applied Research Ethics National Association): Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook, 2nd edn., 121–125. Boston.
- Armstrong, J.M., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 214, 5137-5149.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö.İ., 1996. A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26, 163-166.
- Bayram, E., Senturk, M., Kufrevioglu, Ö.İ. and Supuran, C.T., 2008. In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 9101–9105.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükokuroğlu, M.E., Özdemir, H., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Pharmacol. Res*, 42, 187-191.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Büyükokuroğlu, M.E., 2002. Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull*, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş. and Gülçin, İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Bone, Q., Marshall, N.B. and Blaxter, J.H.S., 1995. In Sensory systems and communication In: *Biology of Fishes* Chapman. Ed. New York. 219–261.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bundy, H.F., 1977. Carbonic-Anhydrase. *Comparative Biochemistry And Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 57, 1-7.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G. and Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Bülbül, M., Saraçoğlu, N., Küfrevioğlu, Ö.İ., Çiftçi, M., 2002. Bile acid derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and investigation of inhibition effects. *Bioorg and Med Chem*. 10, 2561-2567.
- 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, 5511-5522.
- Chazallete, C., Masereel, B., Rolin, S., Thiry, A., Scozzafava, A., Innocenti, A., Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrase inhibitors Design of anticonvulsant sulfonamides incorporating indane moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, 5781–5786.

- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci, D., 2007. Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase *in vitro* and *in vivo*. Biol. and Pharm. Bull., 30, 2257-2261.
- Çoban, T.A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Ekinci D., 2008. The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: *in vivo* and *in vitro* studies. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23, 266-270.
- Demir, N., Demir, Y. and Nadaroğlu, H., 2001. Carbonic anhydrase from bovine bone. Preparative Biochemistry & Biotechnology. 31, 33-47.
- Demir, Y., Nadaroğlu, H., Demir, N., 2004. Effects of Omeprazole, Famotidine and Ranitidine on the Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Bovine Stomach *in vitro* and Rat Erythrocytes *in vivo*. Biol. Pharm. Bull. 27, 1730-1734.
- Durdagı, S., Şentürk, M., Ekinci, D., Balaydın, H.T., Göksu, S., Küfrevioğlu, Ö.İ., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2011. Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII evidence a new binding mode within the enzyme active site. Bioorganic & Medicinal Chemistry 19, 1381–1389.
- Ekinci, D., Beydemir, Ş., Alım, Z., 2007. Some drugs inhibit *in vitro* hydratase and esterase activities of human carbonic anhydrase-I and II. Pharmacological Report, 59, 580-587.
- Feldstein, J.B., Silverman, D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J. of Biological Chemistry, 259, 5447-5453.
- Gervais, M.R. and Tufts, B.L., 1999. Characterization of carbonic anhydrase and anion exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia calva*), a primitive air-breathing fish. Comp. Biochem. Phys. 23A, 343-350.
- Hannedoche, T., Lazaro, M., Delgado, A.G., Biotard, C., Lacour, B., Grunfeld, J.P., 1991. Feedback-mediated reduction in glomerular filtration during acetazolamide infusion in insulin-dependent diabetic patients. Clin. Sci. 81, 457-464.
- Harvey, R.A., Champe, P.C. and Ferrier, D.R., 2007. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa.
- Henry R.P., 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. Annu Rev Physiol. 58, 523-38.
- Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E., 1996. Functional diversity, conservation and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. Mol. Phylogenet. Evol. 5, 50-77.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the carbonic anhydrase-new horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Hamli, P., Hänninen, M., Hämäläinen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. Biochemical Journal, 392, 83-92.
- Hisar, O., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 20 (1) 35–39.
- Hunaiti, A.A., Soud, M., 2000. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. The Science of the Total Environment, 248, 45-50.

- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2008a. CA inhibitors: Inhibition of mammalian isoforms I–XIV with a series of substituted phenols including paracetamol and salicylic acid. *Bioorg. med. chem. Lett.* 18, 1583-1588.
- Innocenti, A., Hilvo, M., Scozzafava, A.; Parkkila, S., Supuran, C. T., 2008b. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the new membrane-associated isoform XV with phenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, (12) 3593-3596.
- Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2008c. Carbonic anhydrase inhibitors: Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I–XIV). *Bioorg. Med. Chem.* 18, 1583-1587.
- Kayaalp, S.O., 2002. *Tıbbı Farmakoloji*, Feryal Matbaacılık, Ankara.
- Keha, E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009. *Biyokimya. Aktif* Yayınevi, Erzurum. 637.
- Keilin, D., Mann, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107-108.
- Khalifah, R.G., 1971. Carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase stop-flow kinetic studies on native human isoenzyme-B and isoenzyme-C. *Journal of Biological Chemistry*, 246, 2561-2573
- Krungskrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungskrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*. 31, 661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lehninger A.L., 2005. *Principles of biochemistry*. Worth Publishers Inc, Newyork.
- Lesburg, C.A. and Christianson D.W., 1995. X-RAY crystallographic studies of engineered hydrogen-bond network in protein-zinc binding-site. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 6838-6844.
- Lindskog, S., Engberg, P., Forsman, C., İbrahim, S.A., Jonsson, B.H., Simonsson, İ., Tibell, I., 1984. Kinetics and mechanism of carbonic-anhydrase isoenzymes. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 429, 61-75.
- Lineweaver, H. and Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 685.
- Lönnerholm, G., Selking, O., Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88, 1151-1161.
- Maren, T.H., 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130, 26-29
- Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N.B., Poulsen, S.A., Scozzafava, A., Quinn, R.J., Supuran, C.T., 2009. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 3057-3062.
- Maresca, A., Temperini, C., Pochet, L., Masereel, B., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2010a. *J. Med. Chem.* 53, 335-340.
- Maresca, A., Supuran, C.T., 2010b. Coumarins incorporating hydroxy- and chloro-moieties selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (15), 4511-4514.
- Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2010c. 7,8-Disubstituted- but not 6,7-disubstituted coumarins selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated

- carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II in the low nanomolar/subnanomolar range. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 7255-7258.
- Meldrum, N.N., Roughton, F.J.F., 1933. Carbonic Anhydrase, Its preparation and properties. *Nature*, 80, 113-142.
- Montgomery, C., Spector, C., *Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım*. Palme Yayınevi Ankara, 2000.
- Mühlhauser, J., Crescimanno, C., Rajaniemi, H., Parkkila, S., Milovanov, A.P., Castellucci, M., Kaufmann, P., 1994. Immunohistochemistry of carbonic-anhydrase in human placenta and fetal membranes. *Histochemistry*, 101, 91-98.
- Nakai, H., Byers, M.G., Venta, P.J., Tashian, R.E., Shows, T.B., 1987. The gene for human carbonic anhydrase-II (CA2) is located at chromosome 8q22. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 44, 234-235.
- Nair, S.K., Ludwig, P.A., Christianson, D.W.J., 1994. *Am. Chem. Soc.* 116, 3659-63.
- Nishimori, I. and Onishi, S., 2001. Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Digest Liver Dis*, 33, 68-74.
- Nishimori, I., Supuram, C.T., Scozzafava, A., Conway, J., 2004. Acatalytic CAs: Carbonic Anhydrase-Related Proteins. In *Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators*, Eds. CRC Press: Boca Raton, pp 25–43.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K.; Kivela, J., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J., 2004. Role of Carbonic Anhydrase and its Inhibitors in Biological Science Related to Gastroenterology, Neurology and Nephrology. In *Carbonic Anhydrase-Its Inhibitors and Activators*, Eds. CRC Press: Boca Raton (FL), USA, pp 283-302.
- Parui, R., Gambir, K.K., Mehrotra, P.P., 1991. Changes in carbonic anhydrase may be the initial step of altered metabolism in hypertension. *Biochem. Int.* 23, 779-789.
- Parui, R., Gambir, K.K., Cruz, I., Hosten, A.O., 1992. Erythrocyte carbonic anhydrase: A major intracellular enzyme to regulate cellular sodium metabolism in chronic renal failure patients with diabetes and hypertension. *Biochem. Int.* 26, 809-820.
- Sanyal, G., Maren, T.H., 1981. Thermodynamics of carbonic-anhydrase catalysis - a comparison between human isoenzyme-B and isoenzyme-C. *Journal of Biological Chemistry*, 256, 608-612.
- Sasaki, K., Igarashi, S., Amasaki, T., Amasaki, H., Nishita, T., Kano, Y., Asari, M., 1993. Comparative immunohistocalization of carbonic-anhydrase isozyme-I, isozyme-II and isozyme-III in the equine and bovine digestive-tract. *Histochemical Journal*, 25, 304-311.
- Schulze Wischeler, J., Innocenti, A., Vullo, D., Agrawal, A., Cohen, S.M., Heine, A., Supuran, C.T., Klebe, G., 2010. Bidentate Zinc Chelators for  $\alpha$ -Carbonic Anhydrases that Produce a Trigonal Bipyramidal Coordination Geometry. *ChemMedChem*, 5, 1609-1615.
- Segel, I.H., 1968. *Biochemical Calculations: Enzim kinetics*. John Wiley and Sons, Inc, New York, p213.
- Sender, S., Bottcher, K., Cetin, Y. and Gros, G., 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater- and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: Purification, characterization, and immunohistochemical localization. *J. Histochem. Cytochem*, 47, 43-50.
- Silverman, D.N., McKenna, R., 2007. Solvent-Mediated Proton Transfer in Catalysis by Carbonic Anhydrase. *Acc. Chem. Res.* 40, 669–675.

- Sinan, S., Güler, Ö.Ö., Arslan, M., 2009. Effects of some antibiotics on enzyme activities of carbonic anhydrase from erythrocyte *in vivo* and *in vitro*. Hacettepe Journal of Biology and chemistry. 37(2), 111-122.
- Sly, W.S., Hu, P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. Annu Rev Biochem, 64, 375-401.
- Söyüt, H., 2006. Gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) dokularından karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Smith, K.S. and Ferry, J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. FEMS Microbiology Reviews, 24, 335-366.
- Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Medical Research Reviews, 23, 146-157.
- Supuran, C.T., 2003. Indisulam: an anticancer sulfonamide in clinical development. Exp Opin Investing Drugs, 12, 283-287.
- Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles. In Carbonic Anhydrase. Its inhibitors and activators (Supuran, C.T. *et al.* eds), CRC Press. 1–23.
- Supuran, C.T., 2010. Carbonic Anhydrase Inhibition/Activation: Trip of a Scientist Around the World in the Search of Novel Chemotypes and Drug Targets. Curr. Pharm. Des., 16, 3233-3245.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daştan, A., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols, Bioorganic&Medicinal Chemistry, 17, 3207-3211.
- Tashian, R.E., 1989. The carbonic anhydrases-Widening perspectives on their evolution, expression and function. Bioessays, 10, 186-192.
- Tashian, R.E., 1992. Genetics of the mammalian carbonic-anhydrases. Advances In Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine, 30, 321-356.
- Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Parkkila, S., Supuran, C.T., 2010. The Coumarin-Binding Site in CA Accommodates Structurally Diverse Inhibitors: The Antiepileptic Lacosamide As an Example and Lead Molecule for Novel Classes of Carbonic Anhydrase Inhibitors, J. Med. Chem. 53, 850-854.
- Topal, F., İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) Üzerine Bazı Kemoterapi İlaçların Etkilerinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Venta, P.J., Montgomery, J.C., Tashian, R.E., 1987. Molecular-genetics of carbonic-anhydrase isozymes, Isozymes-Current Topics In Biological and Medical Research, 14, 59-72.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (decapoda graspsidae). Comp. Biochem. Physiol., Part C, 122, 121-129.
- Weiser, T., Just, S., 2009. Hyoscine butylbromide potently blocks human nicotinic acetyl choline receptors in SH-SY5Y cells. Neurosci. Lett., 450, 258-261.

Wistrand, P.J., 1981. The importance of carbonic anhydrase-B and anhydrase-C for the unloading of CO<sub>2</sub> by the human-erythrocyte. *Acta Phys. Scand.*, 113, 417-426.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Samsun'un Bafra ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Samsun'da tamamladı. 2003 yılında lisans öğrenimine başladığı Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Biyokimya Bilimdalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.