

**T.C.
SİİRT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ
ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS
Ercan ALPINAR**

(163101001)

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

**MART, 2019
SİİRT**

TEZ KABUL VE ONAYI

Ercan ALPINAR tarafından hazırlanan “BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE *IN VITRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması 26/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof.Dr. Mehmet DOĞRU

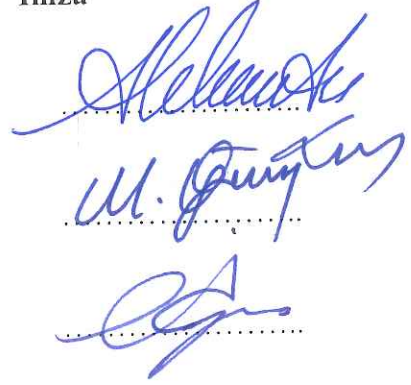
Danışman

Doç.Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

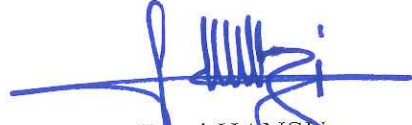
Üye

Doç.Dr. İbrahim TEĞİN

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylım.



Doç. Dr. Fevzi HANSU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 2017-SİÜFEB-84 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖN SÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmalarımın her aşamasında desteğini benden esirgemeyen, bir danışmandan ziyade ağabey şefkati ile yol gösteren ve rehberlik eden çok değerli danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA'ya en kalbi duygularıyla minnet ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans Tez çalışmalarım esnasında her türlü desteği vermekten çekinmeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Ebru AKKEMİK, Dr. Öğretim Üyesi Emrah YERLİKAYA, Dr. Öğretim Görevlisi Oğuzhan ÖZDEMİR ve Öğretim Görevlisi Ümit ÇALIŞIR'a ve maddi desteklerinden dolayı Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli Yüksek Lisans arkadaşlarım; Abdülbaki EYEK ve Osman ÖZBEY'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Deneyisel çalışmalarım esnasında gerek madde ve materyal gerekse manevi desteklerini hep yanımda hissettiğimiz Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ARSLAN'a ve kendilerinin şahsında tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak; Yüksek Lisans çalışmalarım süresince ve her zaman benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

Ercan ALPINAR
SİİRT, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Sülfonamidler.....	1
1.1.1. Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzime Bağlanması	3
1.2. Enzimler	5
1.2.1. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	6
1.2.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler	7
1.3. Enzim İnhibisyonu	8
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	12
2.1. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ	12
2.1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Kısa Tarihçesi.....	12
2.1.2. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	12
2.1.3. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri.....	13
2.1.4. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	14
2.1.4.1. Karbonik Anhidraz I	14
2.1.4.2. Karbonik Anhidraz II.....	14
2.1.4.3. Karbonik Anhidraz III	14
2.1.4.4. Karbonik Anhidraz IV	15
2.1.4.5. Karbonik Anhidraz VA.....	15
2.1.4.6. Karbonik Anhidraz VB	15
2.1.4.7. Karbonik Anhidraz VI	15
2.1.4.8. Karbonik Anhidraz VII.....	16
2.1.4.9. Karbonik Anhidraz VIII.....	16
2.1.4.10. Karbonik Anhidraz IX	16
2.1.4.11. Karbonik Anhidraz X.....	16
2.1.4.12. Karbonik Anhidraz XI	16
2.1.4.13. Karbonik Anhidraz XII.....	17
2.1.4.14. Karbonik Anhidraz XIII.....	17
2.1.4.15. Karbonik Anhidraz XIV	17
2.1.4.16. Karbonik Anhidraz XV	17
2.1.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	17
2.1.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	18

2.1.7. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları	20
2.1.8. Karbonik Anhidraz Aktivitesi	21
2.1.9. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	22
2.2. Göz Bozukluklarının Tedavisinde Kullanılan Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	23
3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyaller.....	26
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	31
3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	31
3.2. Yöntemler	32
3.2.1. Afinite Jelin Hazırlanması	32
3.2.2. Sığır Eritrositlerinden BCA Enziminin Saflaştırılması	34
3.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi	34
3.2.2.2. Hemolizattan Enzimin Saflaştırılması	35
3.2.3. Enzimin Aktivite Tayini	35
3.2.4. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	36
3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü.....	37
3.2.6. BCA Enziminin Aktivitesini Yarıya Düşüren İnhibitör Konsantrasyonunun (IC ₅₀) Hesaplanması	49
3.2.7. Cheng&Prusoff Denklemiyle İnhibisyon Sabitlerinin (K _i) Hesaplanması.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	40
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	40
4.2. Kantitatif Protein Tayini İle Tespit Edilen BCA Enzimi Protein Miktarı	40
4.3. BCA Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi İle Safsızlık Kontrolü	41
4.4. Enzimin Saflaştırılması	41
4.4.1. Hemolizatın Afnite Kolonuna Yüklenmesi ve Enzimin Elüsyonu	42
4.4.2. BCA Enzimine Ait Aktivite Çalışmaları ve Elde Edilen Veriler	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
6. KAYNAKLAR	78
EKLER	86
ÖZGEÇMİŞ.....	87

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar.....	18
Tablo 3.1. Orijinal sülfonamid türevlerinin kodları ve isimleri.....	26
Tablo 3.2. Bisoksadiazol sübtitüye sülfonamid bileşiklerin sentezi.....	28
Tablo 3.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	38
Tablo 4.1. BCA enzimi protein miktarı.....	40
Tablo 4.2. BCA enzim aktivitesi üzerine 5a bileşiğinin etkisi	43
Tablo 4.3. BCA enzim aktivitesi üzerine 5b bileşiğinin etkisi	45
Tablo 4.4. BCA enzim aktivitesi üzerine 5c bileşiğinin etkisi	47
Tablo 4.5. BCA enzim aktivitesi üzerine 5d bileşiğinin etkisi	49
Tablo 4.6. BCA enzim aktivitesi üzerine 5e bileşiğinin etkisi	51
Tablo 4.7. BCA enzim aktivitesi üzerine 5f bileşiğinin etkisi	53
Tablo 4.8. BCA enzim aktivitesi üzerine 5g bileşiğinin etkisi	55
Tablo 4.9. BCA enzim aktivitesi üzerine 5h bileşiğinin etkisi	57
Tablo 4.10. BCA enzim aktivitesi üzerine 5i bileşiğinin etkisi	59
Tablo 4.11. BCA enzim aktivitesi üzerine 5j bileşiğinin etkisi	61
Tablo 4.12. BCA enzim aktivitesi üzerine 5k bileşiğinin etkisi	63
Tablo 4.13. BCA enzim aktivitesi üzerine 5l bileşiğinin etkisi	65
Tablo 4.14. BCA enzim aktivitesi üzerine 5m bileşiğinin etkisi	67
Tablo 4.15. BCA enzim aktivitesi üzerine 5n bileşiğinin etkisi	69
Tablo 4.16. BCA enzim aktivitesi üzerine 5o bileşiğinin etkisi	71
Tablo 4.17. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren orijinal sentez sülfonamid türevlerinin IC ₅₀ değerleri ve Cheng&Prusoff denklemine göre hesaplanmış K _i değerleri	73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Prontosil molekülünün yapısı.....	2
Şekil 1.2. Sülfanilamid molekülünün yapısı.....	2
Şekil 1.3. Sülfametoksazol molekülünün yapısı.....	3
Şekil 1.4. Karbonik Anhidrazın sülfonamidler gibi Zn ⁺² bağlayıcılar tarafından İnhibisyonu.....	4
Şekil 1.5. Karbonik Anhidrazın aktif bölgesi ile hidrofilik ve hidrofobik bölgeler İçeren yapılarının etkileşimi.....	5
Şekil 1.6. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi.....	8
Şekil 1.7. Yarışmalı inhibisyon şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.8. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterim.....	10
Şekil 1.9. Yarı yarışmalı inhibisyonun gösterimi.....	11
Şekil 2.1. Karbonik anhidrazın katalizlediği CO ₂ -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.....	19
Şekil 2.2. İnsan CA II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandaları gösteren şematik görünümü.....	21
Şekil 2.3. Glokom hastalığına yakalanmış göz örnekleri.....	24
Şekil 2.4. Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri.....	25
Şekil 3.1. Alkil ile sübtitüe edilmiş 4- (5-tiokso-4,5-dihidro-1,3,5-oksadiazol-2-il) benzensülfonamid bileşiklerinin sentezi.....	27
Şekil 3.2. Bisoksadiazol sübtitüye sülfonamid bileşikler.....	30
Şekil 3.3. Afinite jelinin hazırlanma reaksiyonları.....	34
Şekil 3.4. p-nitro fenil asetatın hidrolizi.....	35
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein miktarlarının tayin edilmeisinde kullanılan standart grafik.....	40
Şekil 4.2. Afnite kromotografisi ile saflaştırılan BCA enziminin SDS-polakrilamid Jel elektroforezi görüntüsü.....	41
Şekil 4.3. 5a kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5a] grafiği.....	44
Şekil 4.4. 5b kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5b] grafiği.....	46
Şekil 4.5. 5c kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5c] grafiği.....	48
Şekil 4.6. 5d kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5d] grafiği.....	50
Şekil 4.7. 5e kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5e] grafiği.....	52
Şekil 4.8. 5f kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5f] grafiği.....	54
Şekil 4.9. 5g kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5g] grafiği.....	56
Şekil 4.10. 5h kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5h] grafiği.....	58
Şekil 4.11. 5i kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5i] grafiği.....	60
Şekil 4.12. 5j kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5j] grafiği.....	62
Şekil 4.13. 5k kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5k] grafiği.....	64
Şekil 4.14. 5l kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5l] grafiği.....	66
Şekil 4.15. 5m kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5m] grafiği.....	68
Şekil 4.16. 5n kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5n] grafiği.....	70
Şekil 4.17. 5o kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[5o] grafiği.....	72
Şekil 4.18. Saflaştırılmış BCA enzimi üzerine 2,98 mM substrat (p-nitrofenil asetat) konsantrasyonunda 5a kodlu bileşikten 5o kodlu bileşiğe kadar olan organik yapıların %Aktivite-[5a→o] grafiği.....	74

KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
CA	: Karbonik anhidraz enzimi (Carbonic Anhydrase)
E.C.	: Enzim kod numarası (Enzyme Commission)
M	: Molarite
g	: Gram
L	: Litre
mL	: Mililitre
kDA	: KiloDalton
rpm	: Devir/Dakika
K_m	: Michaelis-Menten Sabiti
V_{max}	: Maksimum Hız
nm	: Nanometre
K_i	: İnhibisyon sabiti

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ζ	: Zeta

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BAZI SÜLFONAMİD BİLEŞİKLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ercan ALPINAR

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Üyesi Mustafa Oğuzhan KAYA

2019, 86 + x Sayfa

Bu çalışmada, glokom hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere potansiyel aday olan bazı oksadiazol sübstitüye türevli bileşiklerin karbonik anhidraz enzimi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Karbonik anhidraz enzimi, Sepharose-4B-L-Tirozin-Sülfonamid kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak sığır kanından saflaştırılmıştır. Kan örnekleri Siirt ilindeki hayvan kesim noktalarından kesim anında alınmıştır. Spektrofotometrik deneysel çalışmalar, 348 nm'de 0. ve 3. dakikadaki absorpsiyon değerleri belirlenerek yapılmıştır. Sığır karbonik anhidraz enzimine karşı oksadiazol sübstitüye türevli bileşiklerin afiniteleri deneysel olarak araştırılmıştır. Deneysel çalışmalarla elde edilen verilerden yararlanarak inhibisyon sabiti olan IC_{50} değerleri tespit edilmiştir. Diğer inhibisyon sabiti olan K_i ise Cheng&Prusoff denklemi yardımıyla matematiksel olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnhibisyon, *in vitro*, IC_{50} , Karbonik Anhidraz, Sülfonamid,

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF *in vitro* EFFECTS OF SOME SULFONAMIDE COMPOUNDS ON CARBONIC ANHYDRASE ENZYME

Ercan ALPINAR

The Graduate School of Natural and Applied Science of Siirt University
The Degree of Master of Science
In Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

2019, 86 + x Pages

In this study, some oxadiazole substituted derivative compounds, which are a potential candidate for the treatment of glaucoma, *in vitro* effects were investigated on carbonic anhydrase enzyme. The carbonic anhydrase enzyme was purified from the bovine blood by using the affinity gel with the chemical structure of Sepharose-4B-L-Tyrosine-Sulfonamide. Blood samples were taken from the animal slaughtering points in Siirt province at the time of slaughter. Spectrophotometric experimental studies were carried out by determining the absorbance values at 348 nm at the 0 and 3 minutes. The affinities of oxadiazole substituted derivatives against bovine carbonic anhydrase enzyme have been investigated experimentally. The IC₅₀ values, which are the constant of inhibition, were determined by using the datas obtained from experimental studies. The other inhibition constant, K_i, was calculated mathematically with the help of the Cheng&Prusoff equation.

Keywords: Inhibition, *in vitro*, IC₅₀, Carbonic Anhydrase, Sulfonamide

1. GİRİŞ

1.1. Sülfonamidler

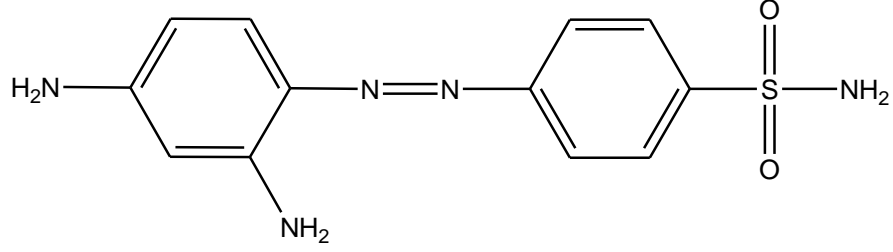
Sülfonamidler insanların sistemik enfeksiyonlarında ilk olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Öyle ki, sülfonamidler 1938 yılında Nobel ödülünü Gerhard Domagk'ın almasını sağlamıştır [Campbell, 1999].

Sülfonamid bileşikleri beyaz renkte olup genellikle toz halindedirler. Protonlanmış halleri oldukça aktiftir, serbest asitleri suda çözünmez ama aseton ve etanolda kısmende olsa çözünürler. Sülfonamid tuzlarının su, safra ve serum gibi sıvılarda çözünürlükleri fazladır. Kimyasal olarak kararlı olan bu bileşiklerin asit-baz özellikleri, pH'a bağlı olarak çözünürlüğünü, farmakokinetik özelliklerini ve antibakteriyel aktivitesini etkilemektedir [Doğu, 1994].

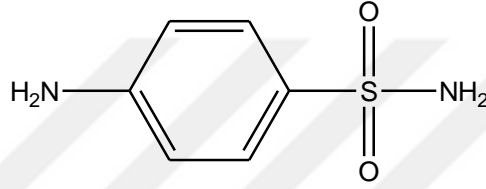
Sülfonamidler, antibakteriyel ilaçlar olup geniş spektrumlarından dolayı uzun yıllardır çok sayıda endikasyonda tek başına kullanılırlar. Bakterilerin direnç kazanması, penisilin ve antimikrobiyal ilaçların üretilmesiyle enfeksiyon tedavisinde kullanımları azalmıştır [Özalp, 2002].

Sülfonamidler para-aminobenzensülfonamid (sülfanilamid) maddesinin türevleridir. Sülfonamid (-SO₂NH₂) gurubunda azot atomundaki hidrojenlerden birinin yerine uygun radikaller bağlanarak çeşitli sülfonamid türevleri sentezlenebilmiştir [Kayaalp, 2002].

1932'de kırmızı renkli "prontosil ((4-(2,4diamino-fenilazo)-benzensülfonamid) boyar maddesi Alman Klarer ve Mietzch tarafından sentezlenmiştir (Şekil 1.1). 1935 yılında bu boyanın *in vivo* aktivitesi olduğu belirlenip kan zehirlenmesinde tedavi amaçlı kullanılmıştır [Domagk, 1935]. Daha sonra Ernest Fourneau bu boyanın insan metabolizmasında parçalanarak sülfanilamid bileşiğine dönüştüğünü kanıtlamıştır (Şekil. 1.2). Bundan sonraki çalışmalar sülfanilamid bileşiğinin ve türevlerinin oluşturulmasıyla ilgili olmuştur.



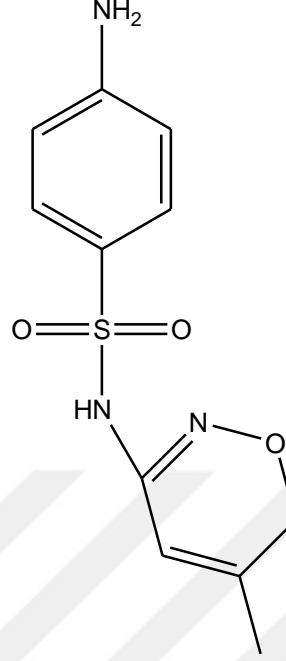
Şekil 1.1. Prontosil molekülünün yapısı [Domagk ve ark. 1935].



Şekil 1.2. Sülfanilamid molekülünün yapısı [Dökmeci, 1992].

Aromatik heterosiklik sülfonamidler tarafından karbonik anhidraz enziminin inhibisyonu; glokoma, epilepsi, kalp rahatsızlığı ve ülser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde 50 yıldan fazladır klinik olarak kullanılmıştır [Ferraroni ve ark., 2002]. Uzun yıllar kullanım sürelerinden dolayı, birçok bakteri bu ilaçlara karşı direnç kazanmıştır [Dökmeci, 1992]. Sülfoamidlerin enfeksiyon tedavisinde kullanımlarının azalmasının nedeni, bakterilerin kazandığı bu dirençtir.

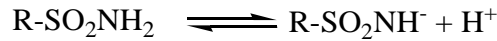
Trimetoprim, tetroksoprim veya pirimetamin gibi dihidrofolat redüktaz inhibitörleriyle sülfametoksazolün kombinasyonu ile sülfanamidler spesifik enfeksiyonlarda 1970'li yıllarda yeniden kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 1.3). Günümüzde bu bileşikler yaygın olarak solunum yolu ve üriner kanal enfeksiyonlarında, hayvan hastalıkları tedavisinde ve hastalıklara karşı korunmada yaygın olarak kullanılmaktadır [Reeves, 1987; Özalp, 2002].



Şekil 1.3. Sülfametoksazol molekülünün yapısı [Özalp, 2002; Reeves, 1987].

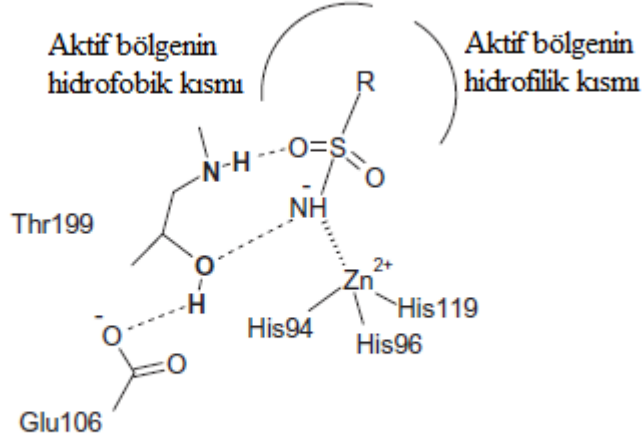
1.1.1. Sülfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzime Bağlanması

Sülfonamid grubundaki azot atomu ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde iyonik olarak bağlanır ($R-SO_2NH^-$ veya $R-SO_2N-OH^-$), daha sonra hidrofobik etkileşmelerle inhibitör enzime bağlanmış olur. Bu iki etkinin toplamı sonucunda sülfanoamid, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanır [Tozlu, 1997; Lindskog ve Wistrand, 1988]. Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörlerinin aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğu belirlenmiştir. Sülfonamidlerin araştırmacılar tarafından ilgi çekmesinin başka bir nedeni de kolaylıkla iyonik yapı kazanmasıdır. Sülfonamidin ligand olarak kullanıldığı bu iyonik yapının reaksiyonu aşağıdaki gösterilmiştir.

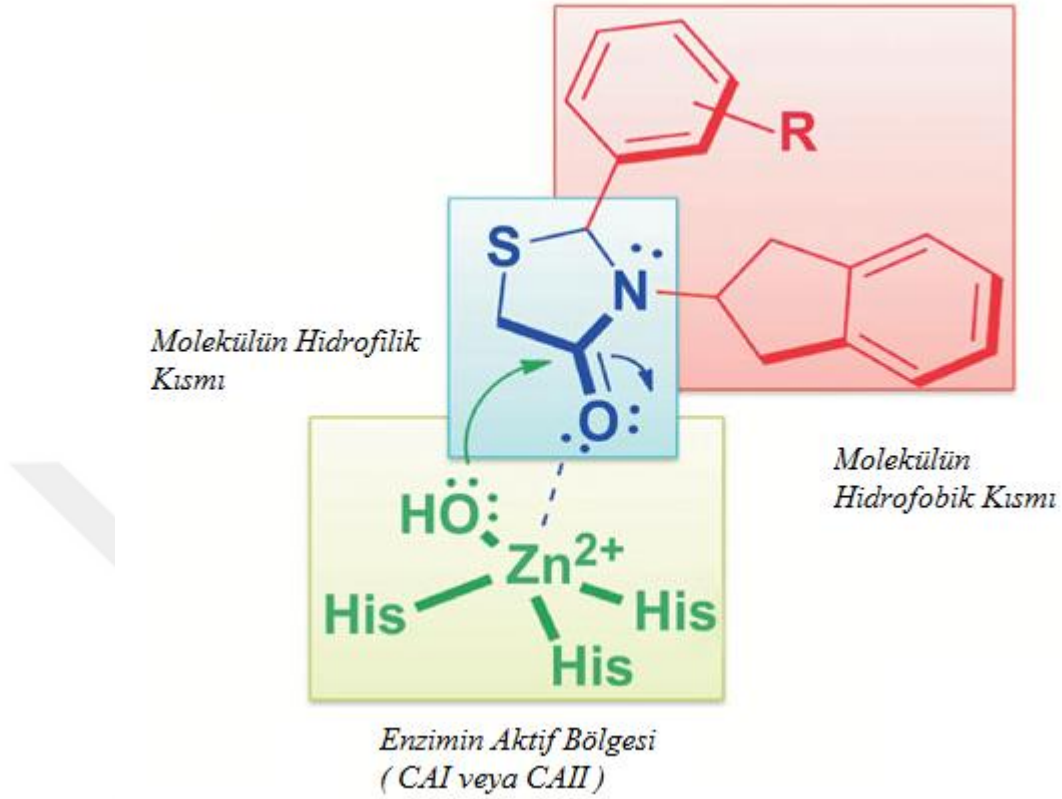


Bu özelliğinden dolayı, karbonik anhidraz enziminin inhibisyonunda son derece önemli olduğu belirlenmiştir [Kohn ve Wilchek, 1978]. Sülfonamidler, hidrofilik bölgeye ek olarak, aromatik ve heterosiklik hidrofobik bölgelere sahip olup, süstitüye olmamış bir $-SO_2NH_2$ grubu veya bir $-SO_2NH(OH)$ grubu içeren etkili inhibitörlerdir. Sülfonamid

grubunun ilk bağlandıkları yer N atomunun anyonlar şeklinde ($R-SO_2NH^-$ veya $R-SO_2N-OH$) CA enziminin aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonudur. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmeler ile inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidler bu iki etkinin toplamı ile karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanırlar. [Kohn ve Wilchek, 1978].



Şekil 1.4. Karbonik anhidrazın sülfonamidler gibi Zn^{+2} bağlayıcılar tarafından inhibisyonu [Durdagi ve ark., 2011].



Şekil 1.5. Karbonik anhidrazın aktif bölgesi ile hidrofilik ve hidrofobik bölgeler içeren yapıların etkileşimi [Arslan ve ark., 2017]

1.2. Enzimler

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, organizmadaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürüne fırsat vermeden %100 lük verim sağlayan protein yapısında bulunan biyolojik katalizörlerdir. Bir hücredeki tüm kimyasal reaksiyonlar enzimler sayesinde gerçekleşir [Keha ve Küfrevioğlu, 2009]. Enzimler protein yapılı özel katalizörlerdir. Enzimatik katalizörleri diğer katalizörlerden farklı kılan üç farklı özelliğe sahiptir. Bunlar;

1. Enzimler oldukça hızlı çalışır. Örneğin; karbonik anhidraz c enzimi bir dakikada 36.000.000 molekülü ürüne çevirir.
2. Katalizörler çoğunlukla çeşitli kimyasal reaksiyonlarda katalizör olarak görev yaparlar. Enzimler genellikle tek tip reaksiyonu spesifik olarak katalize ederler.
3. Katalizörler kimyasal reaksiyonu başlatmazlar, sadece ölçülemeyecek kadar yavaş olan kimyasal reaksiyonların hızını artırırlar. Enzimler, inorganik katalizörlere oranla aktivasyon enerjisini etkili şekilde düşürerek reaksiyonların daha düşük sıcaklıkta ve

daha az enerjiyle ilerlemelerini sağlarlar [Bayşu ve Sözbilir, 2008]. Enzimlerin etki ettiği madde substrattır [Maren ve Jankowska, 1985]. Enzimlerin katalizleme güçleri turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı olarak tanımlanır. Turnover sayısı en yüksek olan enzim 40.000.000 s⁻¹ ile katalazdır. Karbonik anhidraz turnover sayısı 600.000 s⁻¹'dir [Lehninger, 2005; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].

Enzimler substratlara göre daha hacimlidirler. Kataliz olayında enzimin sınırlı bir alanının işlevsel olduğu düşünülmüş ve bu alana da aktif bölge denilmiştir. Aktif bölgeler çoğunlukla, enzimdeki yarıklara veya multienzimlerde alt birimler arasındaki ara kesit yüzeylerine yerleşirler [Dikmen ve Özgünen, 2004].

Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanıp enzim-substrat bileşiği (ES) oluşturur. Daha sonra substrat ürün veya ürünlere dönüşür. Enzimler ise reaksiyondan değişmeden çıktıkları için tekrar kullanılabilirler.



(k₁, k₂, k₃ hız sabitleri)

Bazı enzimler aminoasit rezidüleri dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymazlar. Diğerleri kofaktör olarak adlandırılan Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ veya Zn²⁺ gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya koenzim olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinim duyarlar. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da birden fazla metal iyonuna gereksinim duyarlar. Enzim proteinine çok sıkı olarak hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu prostetik grup olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla ve/veya koenzimleriyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim holoenzim olarak adlandırılır. Bu gibi enzimlerin protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılır [Lehninger, 2005].

1.2.1. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nce (IUBMB) sistematik olarak isimlendirilmiştir. Bu isimlendirme sistemine göre enzimler altı ana sınıfa ayrılmıştır. Bunlar sırasıyla, oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olarak belirlenmiştir. Bunlar da kendi içinde alt gruplara

ayrılmışlardır. Her bir enzimin dört rakamdan oluşan bir kod numarası bulunur. Örneğin, karbonik anhidraz enziminin kod numarası E.C. 4.2.1.1 olup sistematik adlandırması “Karbonat hidrolizaz”dır [Keha ve Küfrevioğlu, 2004].

1. Oksidoredüktazlar: İki substrat arasında redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup enzimler dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar olarak da adlandırılan enzimlerdir.

2. Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu grupta yer alır.

3. Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir su molekülünün katılması suretiyle bağların parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler ve lipaz, esteraz, fosfataz, glikozidaz ve nükleaz gibi enzimler bu grubun içinde yer alırlar.

4. Liyazlar: Oksidasyon veya hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan bazı grupların uzaklaştırıldığı ve çift bağların oluşturulduğu tepkimeleri katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler bu gruptandır.

5. İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu grupta yer alır.

6. Ligazlar: Enerji zengin bir bağın kopması ile ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

1.2.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen faktörler şunlardır:

1-Enzim konsantrasyonu

2-Substrat konsantrasyonu

3-pH

4-Isı veya sıcaklık

5-Zaman

6-Işık ve diğer fiziksel faktörler

7-İyonların doğası ve konsantrasyonu

8-Hormonlar ve diğer biyokimyasal faktörler

9-Reaksiyon ürünleri

1.3.ENZİM İNHİBİSYONU

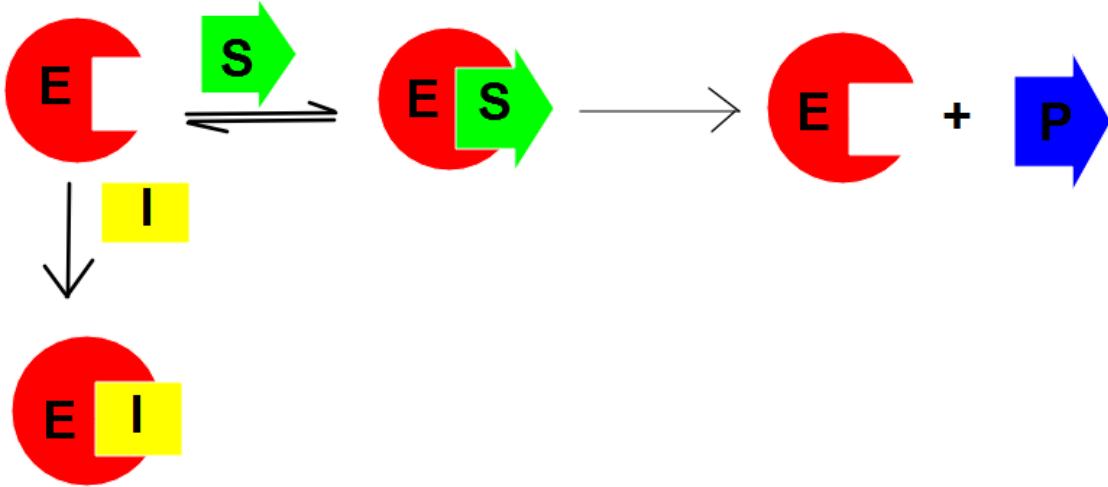
Enzim inhibisyonu, enzimatik bir tepkimelerin hızını enzim inhibitörü adı verilen bazı maddeler tarafından azaltılması veya tamamen durdurulması işlemidir.

Enzimatik inhibisyon iki türdür;

1. Dönüşümsüz inhibisyon
2. Dönüşümlü inhibisyon

1-Dönüşümsüz inhibisyon;

Bu inhibisyon türünde inhibitör enzime kovalent olarak bağlanır ve zor ayrılabilen bir kompleks meydana getirir. Sinir uyarılarının iletilmesinde önemli bir rol oynayan asetil kolin esteraz enziminin, sinir gazı zehirleri tarafından inhibisyonu buna örnek olarak verilebilir. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} (enzimatik reaksiyonun ulaşılacağı maksimum hız) azalır, K_M ise (enzimin substrata ilgisini gösteren sabit) sabit kalır [Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].



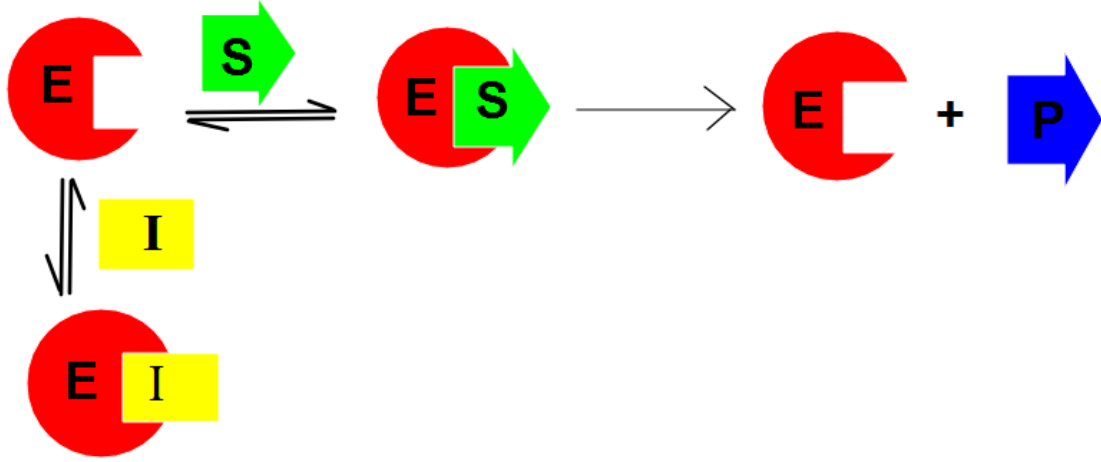
Şekil 1.6. Dönüşümsüz inhibisyonun şematik gösterimi [Segel 1975; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].

2-Dönüşümlü İnhibisyon;

Dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitörün etkileşmesi bir denge tepkimesi şeklinde olur. Dönüşümlü inhibisyon: Yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon olmak üzere üç grupta incelenir.

a-Yarışmalı (Kompetitif) İnhibisyon;

Dönüşümlü inhibisyonun en basit türü yarışmalı inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratın enzime bağlanmasına engel olur. Böylece substrat ile inhibitör enzimin aktif bölgesine bağlanmak için bir tür yarış haline girerler. İnhibitör enzime dönüşümlü bağlandığı için substrat konsantrasyonu artırıldığında inhibitörün inhibisyon etkisi de ortadan kaldırılabilir. Bundan dolayı enzimin V_{max} değeri değişmezken, K_M değeri ise artar [Segel, 1975; Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].

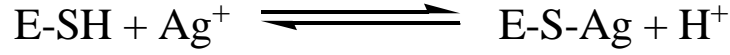


Şekil 1.7. Yarışmalı inhibisyon şematik gösterimi [Segel, 1975; Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].

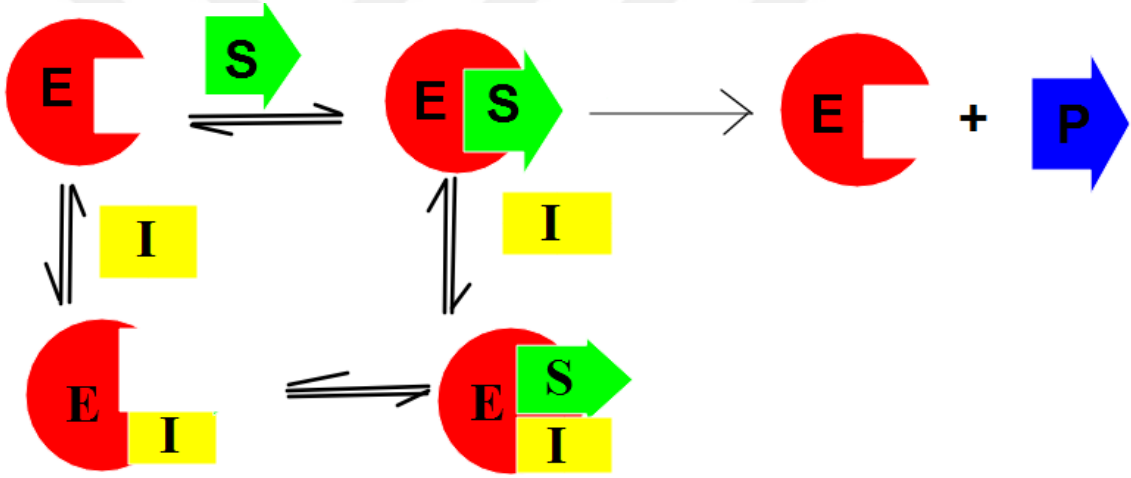
b-Yarışmasız (Nonkompetitif) İnhibisyon;

Yarışmasız inhibisyonda ise inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanma enzimin farklı bölgelerine olduğundan substrat ile inhibitör arasında yarışma söz konusu olmaz. Substrat konsantrasyonunu arttırmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Yarışmasız bir inhibitör etkisini enzimin turnover sayısını yani katalitik

aktivitesini düşürerek gösterir. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M değeri ise değişmez. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin EI ve ESI olmak üzere iki farklı inaktif kompleksi meydana gelmektedir. Yarışmasız inhibisyona örnek olarak enzimlerin sülfidril (-SH) gruplarına bazı ağır metal iyonlarının merkaptan oluşturacak şekilde dönüşümlü olarak bağlanması verilebilir [Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].



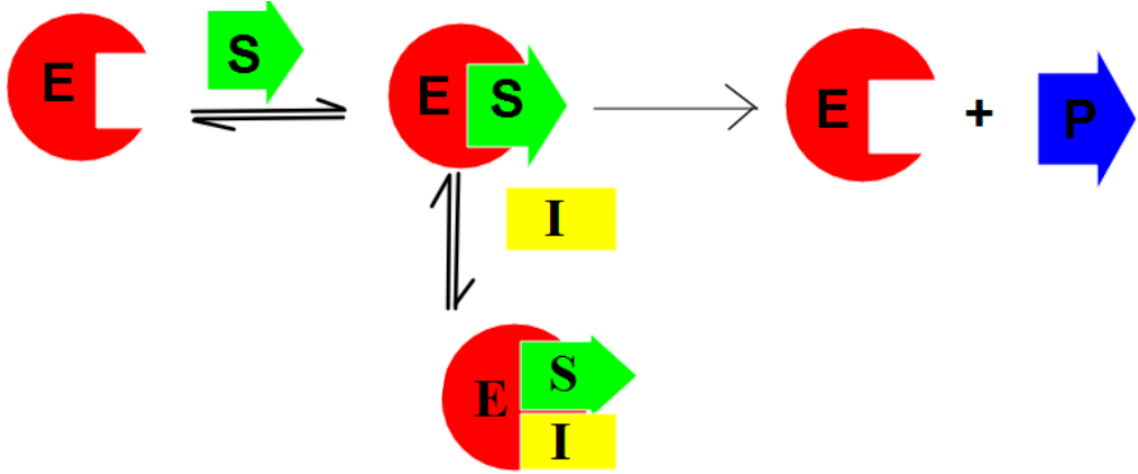
Burada -SH grubu aktif bölgede bulunabileceği gibi, enzimin üç boyutlu yapısının oluşumunda etkili olan bir bölgesinde de yer alabilir.



Şekil 1.8. Yarışmasız inhibisyonun şematik gösterimi [Telefoncu, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2009].

c-Yarı Yarışmalı (Unkompetitif) İnhibisyon;

Bu inhibisyon türünde ise inhibitör serbest haldeki enzime değil de, ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyon az görülür. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha çok rastlanır. ESI kompleksi ortamda sürekli olarak var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşmasıyla ES kompleksi ortamdan sürekli azalacağından, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür [Segel, 1975; Telefoncu, 1986].



Şekil 1.9. Yarı yarışmalı inhibisyonun şematik gösterimi [Segel, 1975; Telefoncu, 1986].

Birçok multienzim sistemi, reaksiyon hızlarını düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda, seri reaksiyonun son ürünü belirli bir konsantrasyona ulaştığında sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere allosterik enzim, bu olaya da feed-back (geri besleme) inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptid zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde; inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla, değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşmelerle allosterik inhibisyon meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere modülatör adı verilir. Allosterik enzimlerin kinetiği, sigmoidal grafikler gösterdiğinden Michaelis-Menten kinetiğinden farklıdır [Stryer, 1988].

İnhibisyon çeşidinin ve ilgili K_i sabitinin belirlenmesi için en çok başvurulan yöntem Lineweaver-Burk eğrileridir. Bu yöntemde $1/V'$ 'ye karşı $1/[S]$ grafiği en az üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda çizilir ve kesim noktalarından değerlendirmeler yapılır. K_i sabitlerinin bulunmasının ikinci yöntemi ise Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki sabit substrat konsantrasyonunda $1/V-[I]$ grafiği çizilerek kesim noktalarından K_i sabitleri hesaplanır [Telefoncu, 1986].

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ

2.1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Kısa Tarihçesi

Karbonik anhidraz (CA; EC 4.2.1.1.) enzimi ilk kez 1933 yılında iki laboratuvar tarafından gerçekleştirilen çalışmaların direkt sonucu olarak eritrositlerde karakterize edilmiştir. Bu çalışmalarda eritrositlerden HCO_3^- 'in hızlı transferi için gerekli olduğu teorik olarak saptanan bir katalitik faktör araştırılmıştır.

1933'e kadar CA ilgi çeken bir enzim değildi. Başlangıçta CA araştırmaları eritrositler ile ilgili olmuştur ve 1940'larda enzimin böbrekte keşfinden sonra ilgi ürenin asidifikasyonuna ve böbreğe kaymıştır. CA üzerine yoğun araştırmaların yapılmasından yarım asırdan fazla bir süre önce halen CA'ın vücuttaki varlığını gösterecek kesin bir delil bulunmamıştır.

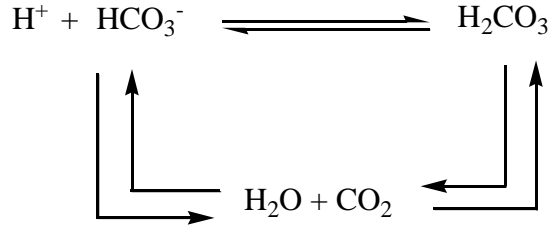
İlk CA derlemesi 1935 yılında birçok vücut organında CA aktivitesinin varlığı veya yokluğunun tanımlanması ile yayınlanmıştır. Dr. Roughton kesin olarak kaslarda CA aktivitesinin olduğunu, karaciğerde ise olmadığını belirtmiştir. 1935'den beri, çeşitli CA izozimleri kas ve karaciğerde bulunmuş ve insan vücudunda en azından onaltı farklı CA izoziminin bulunduğu ifade edilmiştir [Tashian ve Hewett-Emmett, 1984].

2.1.2. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (karbonat hidroliyz, E.C. 4.2.1.1) ilk keşfedilen Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA), genel olarak metabolik CO_2 transportunun sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda, H^+ ve HCO_3^- 'in birikiminde de rol almaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metotlarla, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularda da CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir [Maren, 1967; Pocker ve Joan, 1974].

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan CO_2 'i H_2CO_3 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3 'i CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır [Gökçe, 2009].

Katalizlenen reaksiyon;

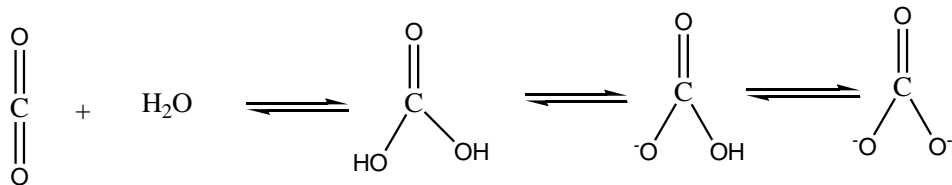


Böbrek tubullerinde ise, aynı reaksiyonlarla, Na^+ ve H_2O geri emilimini sağlamaktadır. Diğer dokularda da yine yukarıdaki reaksiyonla ya CO_2 transferini, ya da H^+ iyonu birikimini temin ederek, hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Nitekim omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon sistemidir [Carter ve ark., 1982; Dogson ve ark., 1983; Keha ve Küfreviöglu, 2004].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, mitokondriyel CA enziminin (CA IV), sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanabilir. Yine iskelet kasında CA, laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [Pocker ve Joan, 1973].

2.1.3. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında, önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmada son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kayıp olmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [Pocker ve Janjic, 1989]. Karbonik anhidraz, CO_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH'ına göre HCO_3^- ve CO_3^- iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO_2 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H_2CO_3 'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzim de sitoplazmada çözülmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28000 dalton olup, 259 veya 260 amino asitten ibaret tek bir polipeptid zincir halindedir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{+2} iyonu ihtiva etmektedir. Zn^{+2} iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar [Armstrong ve ark., 1966; Scher ve Dietsch, 1984].

2.1.4. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

2.1.4.1. Karbonik Anhidraz I

CA-I; 30 kDa molekül ağırlığı olan düşük aktiviteli sitoplazmik bir enzimdir [Armstrong ve ark.1966]. Kapiler endotelyum, korneal endotelyum, göz lensi, plasenta ve memeli fetal membranlarında bolca bulunmuştur [Axen ve Ernback, 1971]. CA-I geni insan genomik cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır [Cuatrecasas, 1970].

2.1.4.2. Karbonik Anhidraz II

Fizyolojik koşullarda $1,3-1,9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ turnover sayısına sahip olan CA-II izoenzimi bilinen en verimli enzimlerdendir [Laemmli, 1970]. İnsan CA-II geni, CA-I ve CA-III genleri gibi kromozom 8 üzerindedir [Kohn ve Wilchek 1978, Kandel ve ark. 1970]. Hemen hemen tüm insan doku ve organlarında bulunan CA-II karbonik anhidraz gen ailesinde en fazla dağılmış izoenzimdir. İlk olarak CO_2 'nin hidratasyonunda yer aldığı eritrositlerde tespit edilmiştir [Armstrong ve ark., 1966].

2.1.4.3. Karbonik Anhidraz III

CA-III iskelet kası tip 1 fiberlerinin sitoplazmasında bol miktarda bulunur. Bunun yanında insan ve fare karaciğerinde de varlığı tespit edilmiştir. Molekül kütlesi 30 kDa'dır ve gen mimarisi CA-II geni için tanımlanana çok benzerdir. CA-III çok düşük CA aktivitesine sahiptir ve asetazolamid'e karşı nispeten daha dirençlidir. Ayrıca karboksil esteraz ve fosfataz aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir [Supuran, 2007; 2008].

2.1.4.4. Karbonik Anhidraz IV

CA-IV, tanımlanan ilk membrana bağlı izoenzimidir. 35 kDa'luk protein üreten insan böbrek CA-IV enzimini kodlayan cDNA, COS-7 hücrelerinde eksprese edilmiş, klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır [Supuran, 2007; 2008].

2.1.4.5. Karbonik Anhidraz VA

CA-VA sadece mitokondriyal matrikse lokalizasyona sahip bir izoenzimidir. İnsan ve kemirgenlerin karaciğer ve pankreasında varlığı tespit edilmiştir ve cDNA'sı insan karaciğer cDNA kütüphanesinden klonlanmış ve geni kromozom 16'ya haritalanmıştır. CA-VA düşük CA aktivitesine sahiptir, fakat hepatositlerin mitokondrisinde üre devri ve glukoneogenez gibi iki önemli metabolik proseste görev aldığı düşünülmektedir [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.6. Karbonik Anhidraz VB

Yeni bir mitokondriyal karbonik anhidraz izoformu olan CA-VB, son zamanlarda klonlanmış ve kromozom X'e haritalanmıştır. Northern blot, CA-VB'in mRNA'sının normal insan kalp ve iskelet kasında eksprese olduğunu belirtmiştir. Ayrıca pankreas, böbrek ve salgı bezlerinde hassas RT-PCR tekniğiyle pozitif sinyal belirlenmiştir. Deneysel yaklaşımlarla kanıtlanmamasına rağmen mitokondriyal CA-VA ve CA-VB izoenzimlerinin farklı dağılımları, değişik fizyolojik roller oynadıklarını bildirilmiştir [Supuran, 2007; 2008].

2.1.4.7. Karbonik Anhidraz VI

CA-VI ilk olarak memelilerde tükürük bezleri ve tükürükte rastlanmıştır. Biyokimyasal ve immunokimyasal özellikleriyle sitozolik izoenzimlerden önemli derecede farklılık gösterir ve 34-36 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. Polipeptid zinciri diğer birçok ekstraselüler proteinler gibi disülfid bağlarıyla stabilize edilirler [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.8. Karbonik Anhidraz VII

İlk kez Montgomery tarafından tespit edilmiştir, CA-VII izoenziminin CA-I, CA-II ve CA-III gibi sitoplazmik bir enzim olduğu belirtilmiştir. Rekombinant CA-VII, CA-II'ye bağlandığında yaklaşık % 4 CA aktivitesine sahip olmuştur ve sülfonamidler tarafından inhibe edilmiştir. CA-VII'nin aminoasit sekansı, memelilerde en fazla korunan enzim olduğunu göstermiştir. İnsan tükürük bezlerinde, fare akciğerlerinde ve fare beyinde bu enzimin mRNA'sı belirlenmiştir [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.9. Karbonik Anhidraz VIII

Son yıllarda yeni CA izoenzimlerini kodladığı düşünülen en az dört memeli geni sekans edilmiştir. CA bağlantılı genler insan ve fare genomik kütüphanelerinden izole edilmiş ve karbonik anhidraz türünden proteinleri (CA-RPs) keşfetmek ve isimlendirmek için numaralandırılmıştır. CA-RP VIII, ilk olarak fare beyni cDNA kütüphanesinden tanımlanmıştır, karbondioksit hidrasyon aktivitesi yoktur [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.10. Karbonik Anhidraz IX

CA-IX ilk olarak tümöre bağlı yeni bir antijen olarak tanımlanmıştır (MN). İnsan serviks kanser hücrelerinde ekspresyonu yapılmıştır. MN/CA-IX geni 11 ekzon ve 10 introndan oluşmaktadır. MN proteinin kodlayan cDNA ilk defa Pastorek tarafından klonlanmış ve translasyon olan protein 459 amino asit içermektedir. 49,7 kDa molekül ağırlığına sahiptir [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.11. Karbonik Anhidraz X

Katalitik izoenzim CA-X kısmi cDNA sekansı bir cDNA kütüphanesinde bulunmuştur. Beyin, böbrek, serebellum, amigdala, serebral korteks, hipokampus, talamus, spinal kort, yumurtalık ve hipofiz bezinde eksprese olduğu belirlenmiştir [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.12. Karbonik Anhidraz XI

İlk olarak 36 kDa molekül ağırlıklı CA-RP XI'i koyun beyin cDNA kütüphanesinde açıklamıştır. Protein güçlü bir sinyal sekansa, çeşitli potansiyel fosforilasyon bölgeleri ve

bağlama motiflerine sahiptir ve sinyal uyumunda rol oynadığı belirtilmiştir [Supuran 2007, 2008].

2.1.4.13. Karbonik Anhidraz XII

Türeci yeni bir membrana bağlı izoenzim olan CA-XII'nin renal hücre karsinomasında klonlanarak karakterize edildiğini açıklamıştır. cDNA sekansı 354 amino asitlik içeren, 39 kDa'lık ve tip bir membran proteini özellikleri gösteren bir polipeptid zinciri arındırır [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.14 Karbonik Anhidraz XIII

CA-XIII tükürük bezleri, böbrek, ince bağırsak, kolon, uterus ve testisi içeren çeşitli dokularda eksprese olmuş yeni bir enzimdir. CA-XIII proteinini modelleme çalışmaları globüler bir molekül olduğunu ve CA-I, II ve III sitozolik enzimleriyle yüksek derecede (% 60) özdeşlik gösterdiği belirlenmiştir [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.15. Karbonik Anhidraz XIV

İlk olarak fare böbreğinde; en çok eksprese olduğu proksimal çapraşık tübüllerde tanımlanmıştır. Bir tane amino terminal sinyal sekansı, diğer ekstraselüler CA'larla büyük oranda homoloji gösteren bir CA domaini, bir transmembran domain ve kısa bir intraselüler C-terminal kuyruktan oluşmaktadır [Supuran, 2007, 2008].

2.1.4.16. Karbonik Anhidraz XV

CA aktivitesi için gerekli olan amino asit rezidüsünün mevcut olduğu CA-XV'i kodlayan genomik sekansa sahip 8 tür tespit edilmiştir. RT-PCR çalışmaları insanlarda CA-XV'in eksprese olmadığını belirlenmiştir [Supuran, 2007, 2008].

2.1.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO₂'in hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Tablo 2.1) [Scher ve Dietsch, 1984].

Tablo 2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar [Supuran ve Scozzafava, 2001].

1	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
2	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
3	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
4	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
5	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
6	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
7	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$
8	$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9	$RSO_2 + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$

2.1.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna göre CA enzimi, metabolizma için son derece önemli olmasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [Pocker ve Janjic, 1989].

Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristalografisi çalışmaları metal iyonun, aktif bölümün 15 Å derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü/ hidroksit iyonu tarafından koordine edilmektedir. Çinko bağlı su, Thr-199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu Glu-106'nın karboksilat grubu ile köprü halindedir. Bu bağlantılar çinko bağlı molekülün nükleofilisini artırır ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO_2 'e doğru hareket etmektedir [Supuran ve Scozzafava, 2001].

Enzimin aktif formu; hidroksitin çinkoya bağlı olduğu temel formdur. Bu güçlü nükleofil, CO_2 molekülü ile etkileşir. Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Bu bikarbonat iyonu daha sonra su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Böylece Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır. Bu da enzimin asit formuna yol açar. Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [Stams ve ark., 1998].

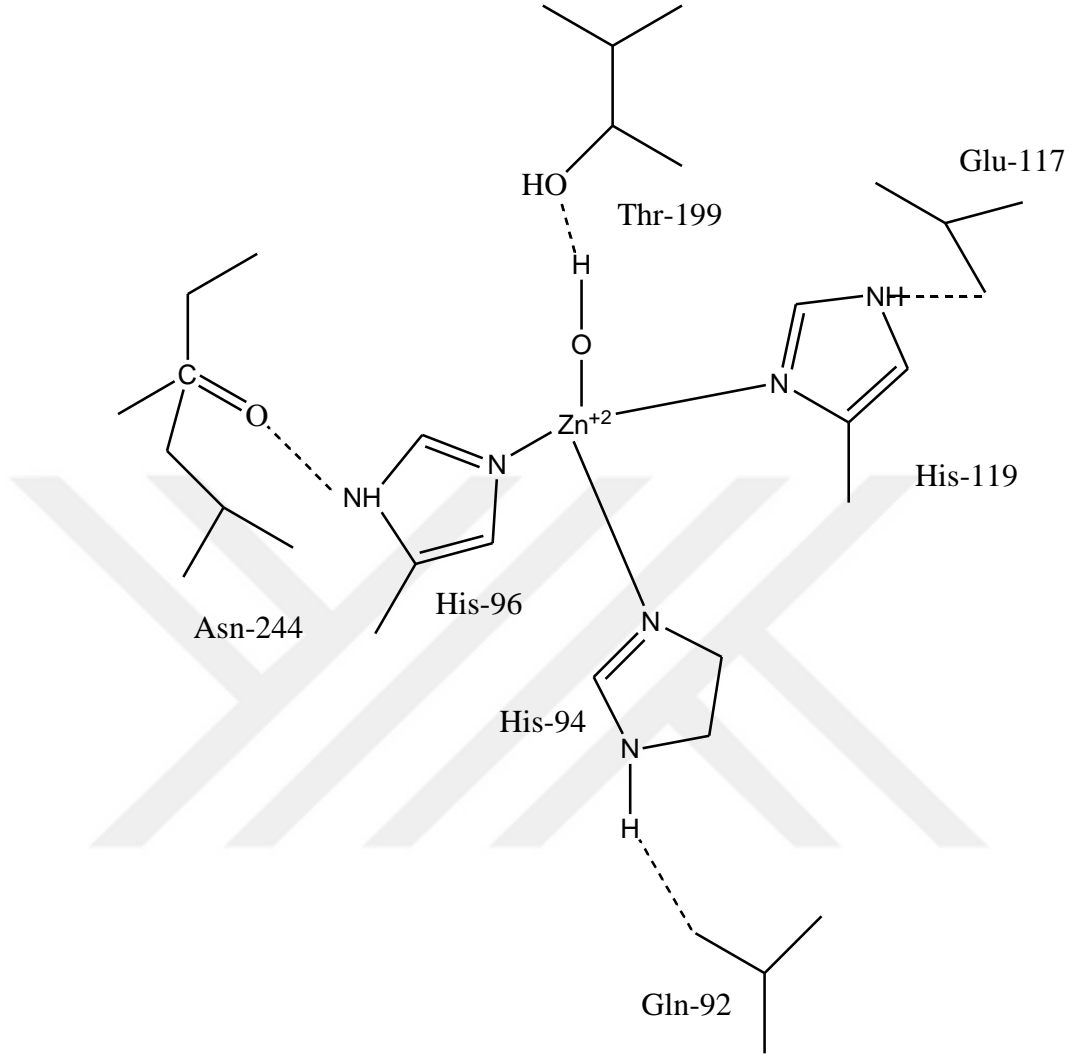
2.1.7. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

CA'lar, α -CA, β -CA, γ -CA, δ -CA, ζ -CA olmak üzere beş farklı familyada incelenmiştir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark bulunmamaktadır, aksine bunların hepsinde çinko iyonu bulunur ve bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdadır [Supuran, 2010]. Üç boyutlu yapılardan ilki α -CA olup, insan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formu bir sıçanın CA-V'i ve Escharia Coli de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipleridir. Aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyukun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi H₂O 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 ve Christianson, 1995].

Metal iyonlu ligandlar ve indirekt ligandların α -CA amino asit dizilişleri sabittir. Bunun yanı sıra 17 amino asitli direkt ve çinko ligandlı indirekt ligandların bütün amino asit dizilişleri çok sıkı şekilde korunmaktadır. Bu rezidülerin bazıları protein yapısını stabilize ederken, bazıları da katalitik aktivite için önemlidir.

β -CA'nın yapısı ise şimdiye kadar henüz açıklanamamıştır. Bilinmeyen yapının çapraz bağlanmaları ve bezelye yapraklarındaki mutantların incelenmesi sonucu, bu yapının belirlenen bir alt ünitesinin oktamer yapısında olduğunu tespit edilmiştir. Mutasyonlar ve X-ray spektroskopisi absorpsiyon sonuçları; ispanaktaki Zn (II) iyonu α -CA'dakinin aksine bir Cys-His-Cys-H₂O grubuyla koordine olmuş bir küre şeklinde olduğunu göstermiştir [Boriack-Sjodin ve ark., 1995].

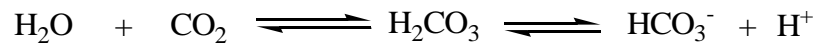
γ -CA ise, son araştırmalarda M. thermophila'dan elde edilen bir yapı olarak ortaya çıkarılmıştır. Bu trimetrik molekül, α -CA'daki katlanmalardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi ifade etmektedir. Her bir ünite, her dönüşteki üç kısa iplikçiğin sol el β -heliks yapısının 7 dönüşüyle oluşmaktadır. Bunun sonucunda birbirinin yanında üç tane yassı β -şeridi meydana gelmektedir. Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar [Kisker ve ark., 1996].



Şekil 2.2. İnsan CA II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandaları gösteren şematik görünümü [Kisker ve ark., 1996].

2.1.8. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

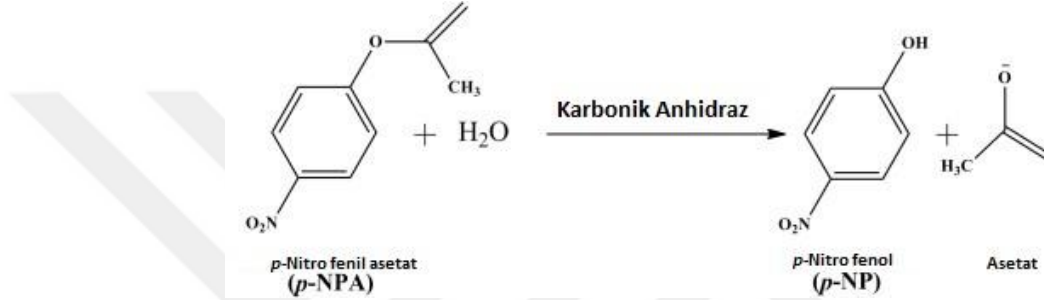
Enzimin CO₂'i hidratasyonu, bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO₂ hidratasyonunda pH'nın 8.2'den 6.3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır.

Enzim birimi ise, enzimsiz CO₂-hidratasyon süresi (to) ile enzimli reaksiyon süresi (tc) arasındaki farkın, tc'ye bölünmesi ile belirlenir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [Landolfi ve ark., 1998].

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitrofenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitrofenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilir [Verpoorte ve ark., 1967; Landolfi ve ark., 1998].



2.1.9. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri, inorganik anyon ve kationlar ve organik inhibitörler olmak üzere iki sınıfta incelenir. Çoğu tek değerli olan anyonlar CA enzimini inhibe ederler [Lindskog, 1997].

Sığır CA'sı ile yapılan esteraz aktivitesi deneylerinde; artan etkinliğe göre F⁻, Cl⁻, CH₃COO⁻, Br⁻, NO₃⁻, HSO₃⁻, HCO₃⁻, ClO₄⁻, I⁻, N³⁻, SCN⁻, CNO⁻, HS⁻, CN⁻ anyonlarının p-nitrofenil asetatın hidrolizini inhibe ettikleri tespit edilmiştir. Bunlardan dışında kafein, nikotin, nikotinamid, Ca²⁺, Ni²⁺, Sr²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Sb³⁺, Cu²⁺ ve Al³⁺ iyonlarının da CA enzimini inhibe ettiği, Ca²⁺, Ni²⁺, Sr²⁺, Mn²⁺ ve Hg²⁺ kationlarının enzimin aktif bölgesinde olan sisteinlerin tiyol gruplarına bağlandıkları farklı araştırmacılar tarafından çalışmalar ile gösterilmiştir [Yeşilyaprak, 2004]. Yapılan çalışmalar, CA'nın en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermiştir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir.



Sülfonamidler esas itibarı ile p-aminobenzensülfonamid (sülfanilamid) maddesinin türevidir. Bu sınıfa asetazolamid, metazolamid, klorozolamid, benzolamid, sülfanilamid ve etoksizolamid de girer. Bu bileşikler farklı şekillerde CA'ya etki ederler. Asetazolamid ve azid, CA'nın CO₂ hidrasyon aktivitesini inhibe ederler. Bu iki madde bilinen bütün memeli CA'ları inhibe ederler.

Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir -SO₂NH₂ grubu veya bir -SO₂NH(OH) grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde, (R-SO₂NH⁻ veya R-SO₂N(OH⁻)) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, CA'ya güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur [Maren, 1987; Arslan, 2001].

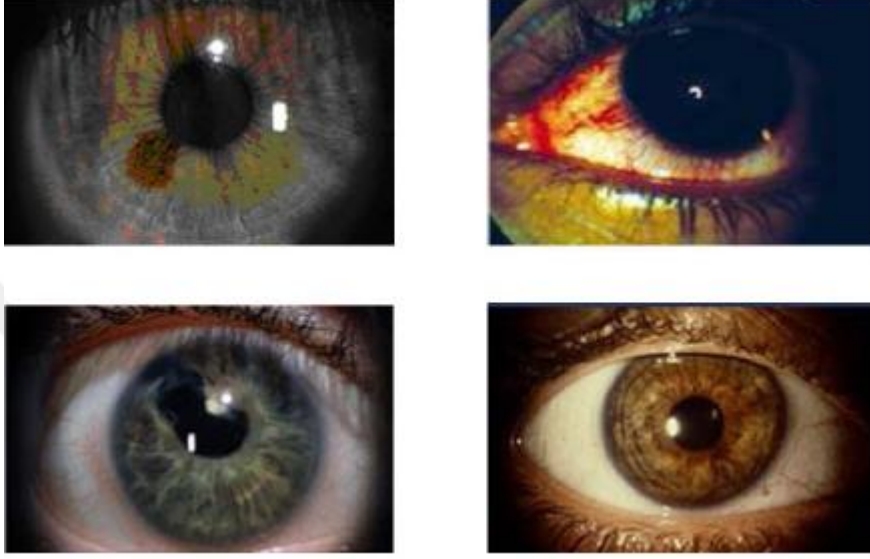
Süstitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında; yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grup taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise; yalnızca hidrofobik bağlanmadan dolayı, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitörler değildir [Maren ve ark., 1983].

Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını ortaya koymak için yapı aktivite ilişkileri ve enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjileri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre, sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı şekilde Van der Waals etkileşmelerinden dolayı K_i değerlerinde önemli fark olduğunu göstermiştir. CA inhibitörleri olan sülfonamidler, R-SO₂NH₂, 50 yıldan fazla bir süredir diüretik ve sistematik etkili antiglokom ilaçları olarak kullanılmaktadır. Klinikte ya da klinik araştırmalarda kullanılan sülfonamid ya da sülfamat sınıfından birçok ilaç bulunmaktadır. Asetazolamid (AAZ), Ethoksozolamid (EZA), Diklorofenamid (DCP), Dorzolamid (DZA) ve Brinzolamid (BRZ) inhibitörleri diüretik olarak, glokom tedavisinde, epilepsi tedavisinde, obezite tedavisinde, kanser karşıtı, ağrı kesici ve antibakteriyel olarak kullanılmaktadır [Supuran, 2010].

2.2. Göz Bozukluklarının Tedavisinde Kullanılan Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Glokom; kronik, bozulmuş, optik sinir başında geri döndürülemez zarara sebep olan yüksek göz içi basıncı (GİB) ile karakterize edilen bir göz hastalığıdır. Bu hastalık görme fonksiyonu kaybıyla ve ileriki aşamada da körlükle sonuçlanır [Mincione ve ark., 2007].

Aköz hümörün dinamikleri ve kimyası ile ilgili çalışmalar bu salgılamamanın ana bileşeninin sodyum bikarbonat olduğu bulunmuştur. CA'lar gözün ön damar tabakasında bulunurlar ve bikarbonat salgılamasından sorumludurlar.



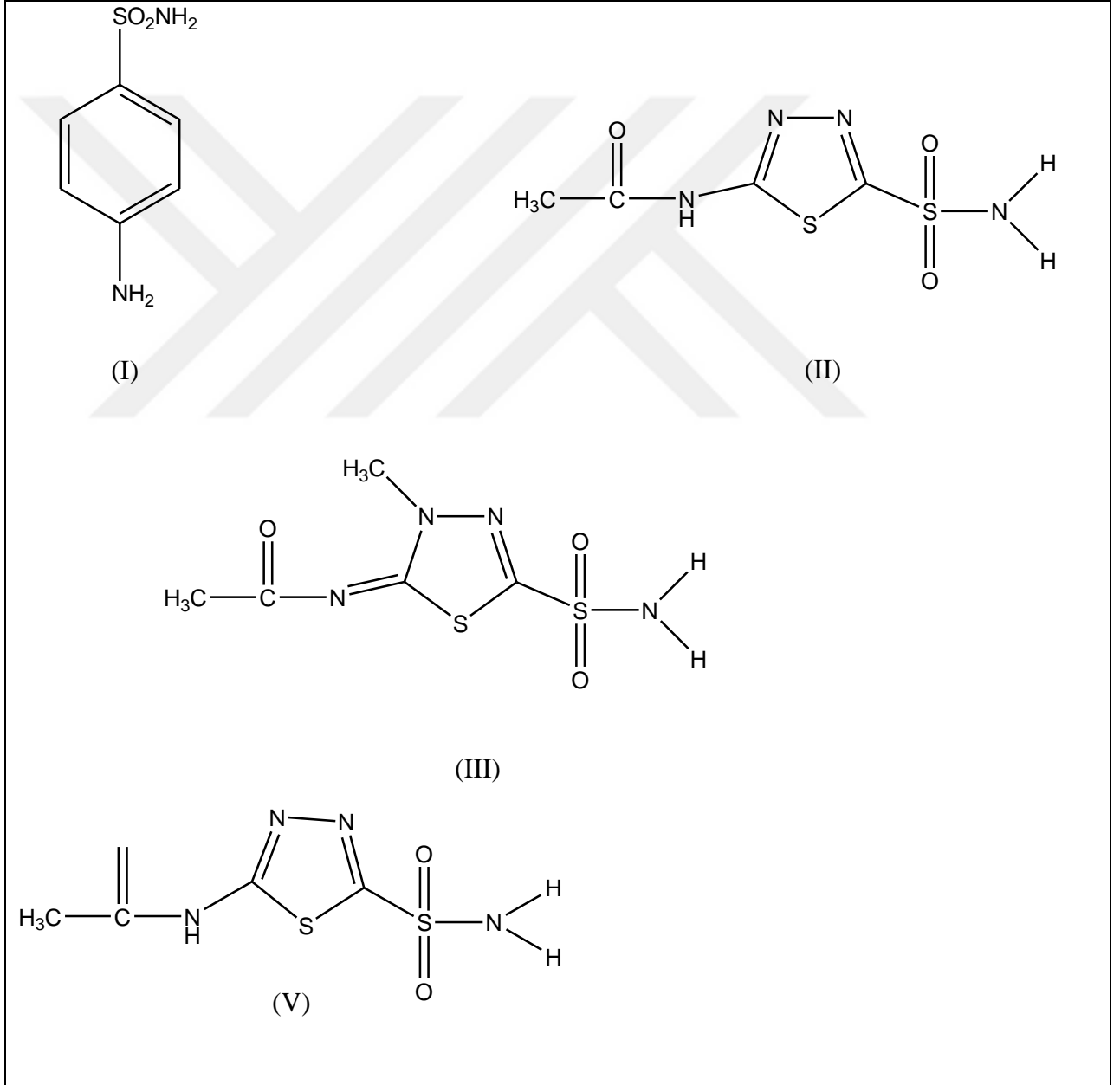
Şekil 2.3. Glokom hastalığına yakalanmış göz örnekleri [Cox ve ark., 1988; Sugrue, 2000]

Lekli (benekli) ödemin tedavisinde sistemik asetazolamidin etkili olduğu gözlemlenmiştir. Son zamanlarda benzer verimlilik değerleri dorzolamid ve brinzolamidin topikal uygulamaları içinde gözlemlenmiştir. Ödemin kaybolması ve görme fonksiyonunun gelişmesinin, retinadaki dolaşımın doğrudan etkisi sebebiyle, sülfonamidin düşük tansiyona sebep olan aktivitesinden bağımsız olduğu varsayılmaktadır. Asetazolamid, dorzolamid veya brinzolamidler büyük olasılıkla bu organdaki kan akışını regüle eden ve bundan dolayı metabolik çöp ürünlerini temizleyen, lokal damar genişleten ilaçlar olarak kullanılmaktadır [Cox ve ark., 1988; Sugrue, 2000].

Son zamanlarda CA II'nin glokom hastalarının gözlerinde büyük oranlarda salgılandığı tespit edilmiştir. Bu durumun hastalığın yüksek GİB oluşmasında önemli bir etkisinin olduğu varsaymaktadır. CA II'nin klinik olarak kullanılan bütün antiglokom sülfonamidleri tarafından yüksek oranda inhibe edildiği de bilinmektedir [Maren, 1995; Innocenti ve ark., 2005].

Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü bulunan karbonik anhidrazın inhibisyon yolu ile glokomlu hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir. Karbonik

anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri **(I)** 1940 yılında Mann ve Keilin tarafından sentezlenmiştir. Glokom tedavisinde uzun zamandan beri 4 çeşit sistemik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler asetozolamid **(II)**, metazolamid **(III)**, etokzolamid **(IV)** ve diklorfenamid **(V)** bileşikleridir [Maren ve Jankowska, 1985; Supuran ve Scozzafava, 2000].



Şekil 2.4. Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri [Maren, 1967; Supuran ve Scozzafava, 2000].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

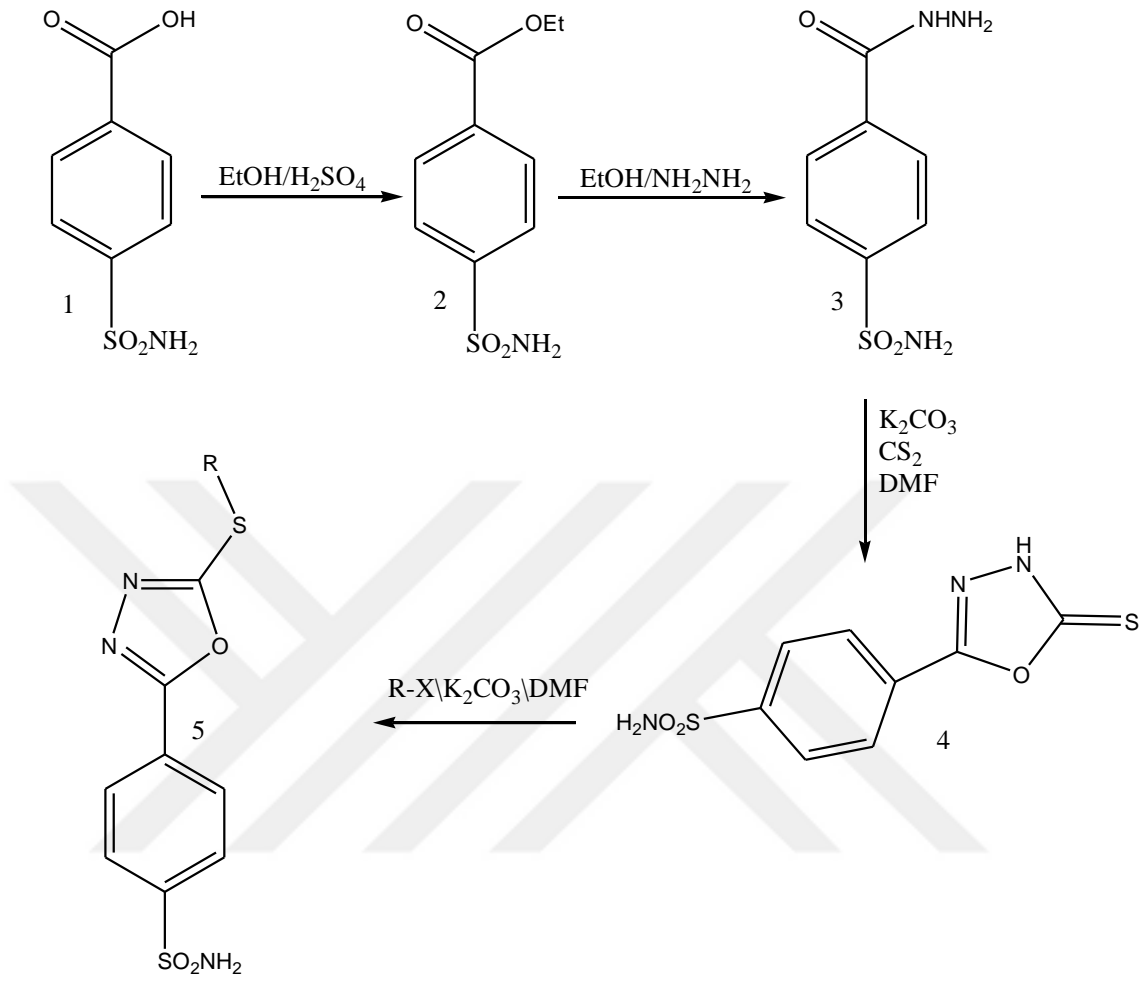
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, L-tirozin, sülfanilamid, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, dekstroz, hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat (NaHCO₃), Tris-SO₄, Tris-Base, sülfirik asit (H₂SO₄), sodyum sülfat (Na₂SO₄), Tris-HCl, sodyum perklorat (NaClO₄), sodyum asetat trihidrat (NaCH₃COO.3H₂O), p-nitrofenil, Aseton.

Bu çalışmalarda kullanılan organik bileşikler, Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ARSLAN ve laboratuvar çalışanlarınca, Organik Kimya Laboratuvarlarında sentezlenen orijinal sülfonamid türevleridir. Bileşiklerin kodları ve isimleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Orijinal sülfonamid türevlerinin kodları ve isimleri

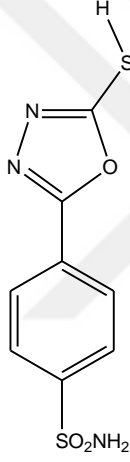
Bileşik Kodu	Bileşiğin Adı
5a	4-(5-(mercapto-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5b	4-(5-(metiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5c	4-(5-(etiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5d	4-(5-(propiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5e	4-(5-(pentiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5f	4-(5-(hegziltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5g	4-(5-(heptiltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5h	4-(5-(büt-3-en-1-iltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5i	4-(5-(büt-3-in-1-iltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5j	4-(5-(sikloheks-2-en-1-iltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5k	4-(5-((4-nitroenzil)tio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5l	4-(5-(enziltio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5m	4-(5-((naftalin-1-ilmetil)tio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5n	4-(5-((antrasen-9-ilmetil)tio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid
5o	4-(5-((2-okso-2-fenilet)lio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid



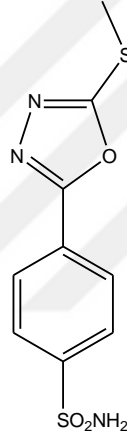
Şekil 3.1. Alkil ile süstitüe edilmiş 4- (5-tiokso-4,5-dihidro-1,3,5-oksadiazol-2-il) benzensülfonamit bileşiklerinin sentezi.

Tablo 3.2. Bisoksadiazol süstitüye sülfonamid bileşiklerin sentezi

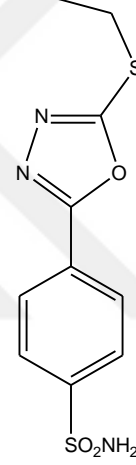
BİLEŞİKLER	R	BİLEŞİKLER	R	BİLEŞİKLER	R
5a	-H	5f	-C ₆ H ₁₃	5k	-CH ₂ -C ₆ H ₄ -NO ₂
5b	-CH ₃	5g	-C ₇ H ₁₅	5l	-CH ₂ -C ₆ H ₅
5c	-CH ₂ -CH ₃	5h	-CH ₂ -CH ₂ =CH ₂	5m	-CH ₂ -C ₁₀ H ₇
5d	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	5i	-CH ₂ -C≡CH	5n	-CH ₂ -C ₁₄ H ₉
5e	-C ₅ H ₁₁	5j	-C ₆ H ₉	5o	-CH ₂ -CO-C ₆ H ₅



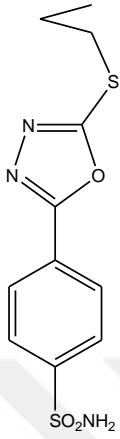
Kimyasal Formül: C₈H₇N₃O₃S₂
Molekül ağırlığı:257,29 g



Kimyasal Formül: C₉H₉N₃O₃S₂
Molekül ağırlığı:271,32 g

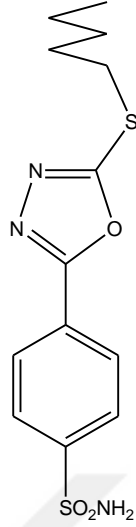


Kimyasal Formül: C₁₀H₁₀N₃O₃S₂
Molekül ağırlığı:285,34 g



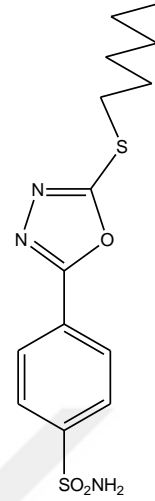
5d

Kimyasal Formül: $C_{11}H_{13}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 355,48 g



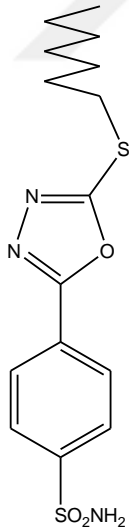
5e

Kimyasal Formül: $C_{13}H_{17}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 327,42 g



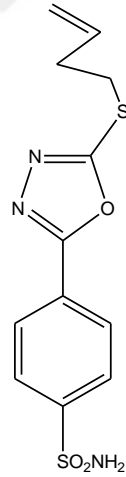
5f

Kimyasal Formül: $C_{14}H_{19}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 341,45 g



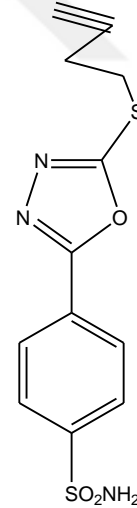
5g

Kimyasal Formül: $C_{15}H_{21}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 355,48 g



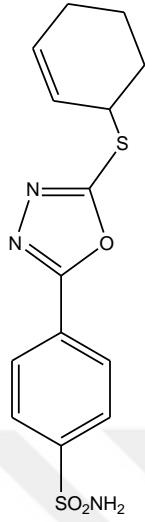
5h

Kimyasal Formül: $C_{12}H_{13}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 311,38 g



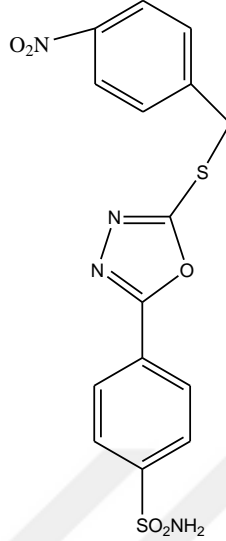
5i

Kimyasal Formül: $C_{12}H_{11}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 309,36 g



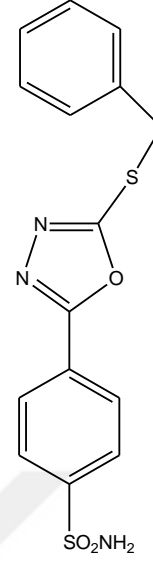
5j

Kimyasal Formül: $C_{14}H_{15}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 337,42 g



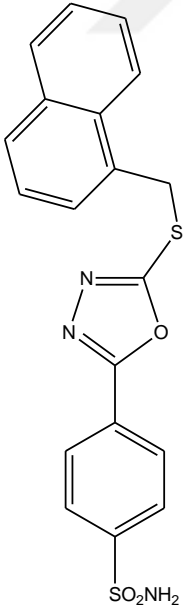
5k

Kimyasal Formül: $C_{15}H_{13}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 3347,41 g



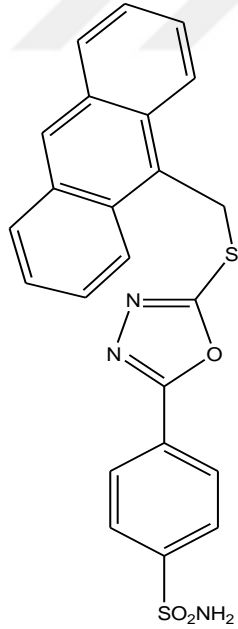
5l

Kimyasal Formül: $C_{15}H_{13}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 3347,41 g



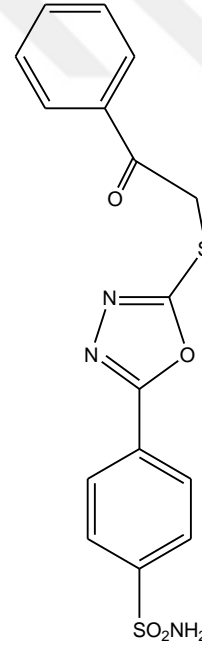
5m

Kimyasal Formül: $C_{19}H_{15}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 397,47 g



5n

Kimyasal Formül: $C_{23}H_{17}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 447,53 g



5o

Kimyasal Formül: $C_{16}H_{13}N_3O_3S_2$
Molekül ağırlığı: 375,42 g

Şekil 3.2. Bisoksadiazol sübtitüye sülfonamid bileşikler

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

MTOPS MS300HS ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, DHCL Group Solutions P400.C6A18 Vakum Pompası, Four E'S Scientific MI0102008 karıştırıcı, FUZHOU HUAKE Electronics Instrument hassas terazi (0.001-320 gr.), İSOLAB 613.03.001 manyetik karıştırıcı, İSOLAB pH. mV. Temp. pH metre, VWR UV-VIS Spektrofotometre (UV-6300PC), Mini Pure 1 MDM-0170 saf su cihazı, Altus AL 306 E mini buzdolabı, THERMO Scientific megafuge 16R soğutmalı santrifüj, Nüve çeker ocak deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Kanın pıhtılaşmasını önlemek için hazırlanan çözelti

Antikoagulant sıvı; 22 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ (sodyum sitrat dihidrat), 8 g $C_6H_8O_7$ (sitrik asit) ve 24 g $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ (dekstroz) bir miktar distile suda çözülüp son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Afinite jelin sentezinde kullanılan çözeltiler ve tamponlar

1 M HCl çözeltisi; %37'lik HCl'den 8,3 mL bir miktar distile suya eklendi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

1 M NaOH çözeltisi; 4 g NaOH bir miktar distile suda çözülüp son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

4 M NaOH çözeltisi; 16 g NaOH bir miktar distile suda çözülüp son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

0,1 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 10,0); 8,401 g (0,1 mol) $NaHCO_3$ 950 mL distile suda çözülüp, 1M NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

0,2 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 8,8); 8,401 g (0,1 mol) $NaHCO_3$ 450 mL distile suda çözülüp, 1M NaOH ile pH'sı 8,8'e getirildi ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

0,05 M Tris- SO_4 tamponu (pH 7,5); 1,5143 g Tris-base 200 mL distile suda çözülüp, H_2SO_4 ile pH'sı 7,5'e getirildi ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Afinite jelin dengelenmesi için kullanılan tampon (pH 8,7); 14,20 g Na_2SO_4 ve 3,0275 g Tris-HCl 950 mL distile suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 8,7'ye getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Hemolizat tatbikinden sonra afinite jeli yıkama tamponu (pH 8,7); 3,124 g Na₂SO₄ ve 3,0275 g Tris-HCl 950 mL distile suda çözülüp 1 M HCl ile pH'sı 8,7'ye getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Afinite jele bağlanmış BCA enziminin elüsyonu için kullanılan çözelti (pH 5,6); 15,31 g NaClO₄ ve 2,0508 g NaCH₃COO.3H₂O 200 mL distile suda çözülüp pH'sı 1 M HCl ile 5,6'ya getirildi ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Suizat çözeltisi; 0,027 g p-nitrofenil asetat 1 mL asetonunda çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL distile suyun içine yavaş yavaş ilave dildi.

Aktivite tamponu; 6,055 g Tris-SO₄ 950 mL distile suda çözülüp pH'sı 1 M H₂SO₄ ile 7,4'e getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı; SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Tablo 3.2'de verilmektedir.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi; Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Afinite Jelinin Hazırlanması

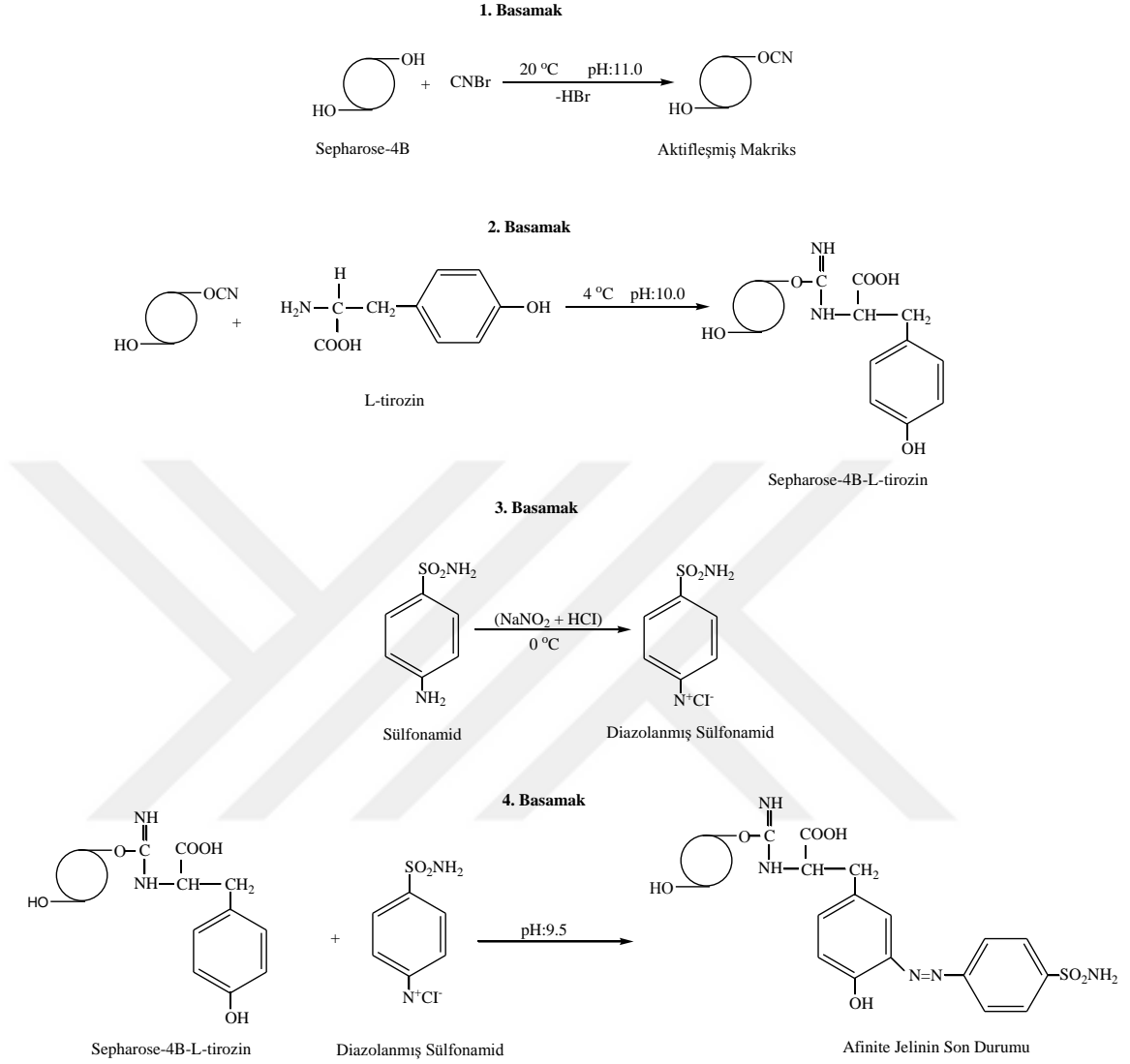
Çalışmada kullanılan afinite jeli, afinite jelinin sentezi, afinite jelinin sentezinde kullanılan tamponlar, Küfrevioğlu, Ö.İ. danışmanlığında, Arslan, (1994) tarafınca hazırlanan tezden yararlanılarak ilgili prosedüre göre hazırlanmıştır [Arslan, 1994]. 10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimde distile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g CNBr'in tamamı birden katıldı. pH metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile kullanılarak 11'e çıkarıldı ve tepkime bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyon pH değişmeyene kadar sürdürüldü (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona eklenerek ve karışım bir buhner hunisine aktarıldı. Daha

sonra 250 mL soğutulmuş 0,1 M NaHCO₃ tamponu (pH 10,00) ile yıkandı ve behere aktarıldı.

Daha sonra 0,08 g tirozin içeren soğuk 20 mL 0,1 M NaHCO₃ tamponunun (pH 10.0) çözeltisi eklenerek 90 dk yavaş tempoda karıştırılmaya bırakıldı ve karışım sonunda alınan süspansiyon +4 °C'de 16 saat dinlenmeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda Buchner hunisine aktarılan süspansiyon 1 L soğuk saf su ile yıkandı, böylece tepkimeye girmeyen tirozin ortamdaki tamamen uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra yıkama işlemine 100 mL'lik soğuk 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH: 8,8) ile devam edildi ve elde edilen jel aynı tamponun 40 mL'si içine konuldu.

Daha sonra; 0,025 g sülfanilamid 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 0,075 g NaNO₂ 0 °C 5 mL saf suda çözüldü. Elde edilen NaNO₂ çözeltisi, sülfonamid çözeltisine damla damla ilave edildi ve 10 dakika boyunca karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra elde edilen diazolanmış sülfonamid çözeltisi tampon içinde bulunan jel süspansiyonun üzerine hızlıca ilave edildi ve 4 M NaOH ile pH'sı 9.5'e ayarlandı ve daha sonra 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmaya bırakıldı. Karıştırma işleminden sonra jel tekrardan buchner hunisine aktarıldı ve önce 1 L saf su daha sonra da 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra 0,05 M Tris-SO₄ tamponu içine alınan jel +4 °C de muhafaza edildi.

Sepharose-4B jelinin oluşum mekanizması basamaklar halinde aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Afinite jelinin hazırlanma reaksiyonları [Arslan, 1994]

3.2.2. Sığır Eritrositlerinden BCA Enziminin Saflaştırılması

Çalışmada kullanılan BCA enzimi, Ö.İ. Küfrevioğlu, danışmanlığında, Arslan, (1994) tarafınca hazırlanan tezden yararlanılarak ilgili prosedüre göre saflaştırılmıştır [Arslan, 1994].

3.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi

Deneyle için sığır kanı Siirt ilindeki hayvan kesim noktalarından, ticari et amaçlı kesilen sığırlardan kesim anında alınmıştır. Kanın pıhtılaşmasını önlemek amacıyla daha önceden hazırlanan asit-sitrat dekstroz antikoagulant sıvısından her 100 mL kan için 15 mL

eklenerek kanın pıhtılaşması engellenmiştir. Daha sonra +4 °C’de muhafaza edilerek aynı gün içerisinde kullanılmıştır.

Eritrositleri ayırmak amacıyla kanlar 30 mL’lik teflon tüplere konulmuştur ve 5000 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerde üstte kalan serum kısmı dikkatli bir şekilde atılarak altta kalan eritrositler % 0.9’lik NaCl çözeltisi kullanılarak yıkanmıştır ve üstteki sıvı kısım atılmıştır. Daha sonra eldeki eritrositler 1,5 katı soğuk distile su ile hemoliz edilmiştir. Hemoliz edilen tüpler birleştirilerek, hemolizin tam gerçekleşmesi için tüpler bir süre hafif bir şekilde çalkalanmıştır.

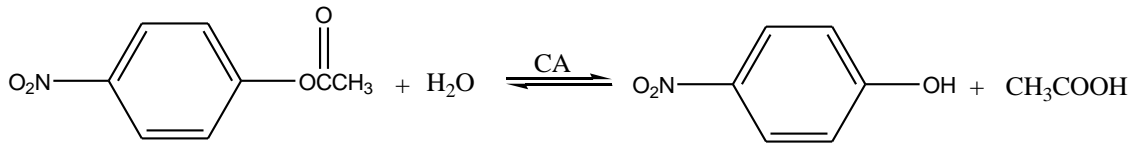
Daha sonra hemolizati hücre zarlarından ayırmak amacıyla +4 °C’de 15000 rpm’de 45 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Hücre zarlarından ayrılan üstteki hemolizat kısmı dikkatli bir şekilde alınmıştır ve pH’sı trisma-base ile 8.7’ye getirilmiştir.

3.2.2.2. Hemolizattan Enzimin Saflaştırılması

Daha önce hazırlanan ve +4 °C’de muhafaza edilen afinite jeli alınıp kolona paketlenmiştir ve dengeleme tamponu ile dengelenmiştir. Daha sonra elde edilen hemolizat alınarak kolona tatbik edilmiştir. Kolon, yıkama tamponu ile yıkanarak safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra BCA, elüsyon tamponu yardımı ile afinite jelinden saflaştırılarak 3 mL’lik tüplere alınmıştır. Aktivite tayini için hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. Enzimin Aktivite Tayini

Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapıldı. U yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitro fenil asetatı, p-nitro fenol ve p-nitro fenolata hidroliz etmekte ve bu da 348 nm de absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon denklemi şu şekildedir;



Şekil 3.4. p-nitro fenil asetatın hidrolizi

Ölçümü yapılan 348 nm de dalga boyu, p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun izosestlik olduğu, yani her ikisinin de aynı absorbansı verdiği bölgedir. Fenol grupları asidik oldukları için ortamın pH'ına göre değişen oranda fenolat ve H⁺ iyonlarına ayrışır. 348 nm de p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun absorbansları aynı anda okunabildiği için bu durum absorbans ölçümünü etkilemez. p-nitro fenol'ün molar ekstraksiyon katsayısı $\epsilon_{348} = 5,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Bu dalga oyunda p-nitrofenil asetatın çok az ir absorbasyonu vardır ve molar ekstraksiyon katsayısı $\epsilon_{348} = 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Eğer ölçümler 1 cm'lik küvetlerde yapılırsa, 348 nm'deki absorbans artışı beşe bölünmekle hidrolizlenen p-nitrofenil asetat miktarı mmolar cinsinden bulunur [McIntosh, 1970].

Tayin işlemlerinde şu prosedür uygulandı: Kuvartz küvetlere 1.5 mL tamponlanmış enzim çözeltisi ve 1,5 mL substrat (+inhibitör) kullanılmasından 3 dakika sonra, 25 °C de 348 nm de absorbans okundu. Spektrofotometre daha önce enzimsiz reaksiyon karışımının 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle, 3 dakika içerisinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitrofenil asetatın mevcut olan çok az absorbasyonu içinde ir düzeltme yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitroasetat substrat çözeltisi günlük olarak hazırlandı. 27 mg ester. 1 mL aseto içerisinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya, yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi. Enzim çözeltisinin tamponlanması için 0,5 M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltisi ile yapıldı.

3.2.4. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Afinite jeliyle saflaştırılan BCA enziminin protein miktar tayinleri bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [Bradford ve ark., 1976]. Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün yanı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 100 mM Tris-HCl tamponu (pH:8,00) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1mL’ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbands değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL’lik 100 mM Tris-HCl (pH:8,00) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri (Tablo 4.1.) ile standart grafik hazırlandı (Şekil 4.1.).

Hazırlanacak enzim çözeltilerinden 0,1’er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5’er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vortekste karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm’de absorbandsları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbandsına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Karbonik Anhidraz proteinleri Laemmli’nin [Laemmli, 1970] metodu kullanılarak, %12’lik ayırıcı (separating) jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılarak incelendi. Elektrofrez işleminde Biorad marka minijel unitesi kullanıldı. SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları (Abcam ab48854 Cambridge, UK) ve saflaştırılmış enzim örnekleri Laemmli buffer (0.5M Tris-HCl, pH6.8, %10 Gliserol, %1 SDS, %0.05 bromfenol mavisi ve %2 B-merkaptotanol) ile eşit oranda karıştırılarak su banyosunda 5 dakika kaynatıldı. Minijel ünitesinin alt ve üst buffer tankları elektrot buffer (0.025M Tris, pH 8.3, 0.192M Glisin ve %0.1 SDS) ile doldurulduktan sonra otomatik pipet ile jelde bulunan kuyucuklara enzim örnekleri yüklendi. Elektrofrez işlemi güç ünitesine bağlı olarak her jel için 20 mA kullanılmak suretiyle sabit akımda yaklaşık 1.5-2.0 saat sürede oda ısısında gerçekleştirildi. Belirteç boya olarak kullanılan bromfenol mavisi çizgisi jelin alt ucuna ulaşınca elektrofrez işlemi durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Yığılma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu. 1.5-2.0 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zeminrengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde

çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

Tablo 3.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis</u> Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	16,65 mL	2,6 mL
<u>Distile su</u>	20,1 mL	12,2 mL
<u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u> Tris-HCl 11.82 g Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12,5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10 'luk SDS</u> SDS 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0,5 µL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>%10'luk amonyum persülfat</u> Amonyum persülfat 1g Alınarak son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	750 µL	400 µL

3.2.6. BCA Enziminin Aktivitesini Yarıya Düşüren İnhibitör Konsantrasyonunun (IC₅₀) Hesaplanması

Orijinal sentez sülfonamid türevlerinin (5a→5o) IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda p-nitrofenil asetat substratının 2,98 mM sabit derişiminde çalışıldı. Önce sülfonamid türevlerinin bulunmadığı ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik sülfonamid derişimlerine karşılık gelen absorbsanslar 348 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbsans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite - [Sülfonamid türevleri] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir sülfonamid türevleri için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.2.7. Cheng&Prusoff Denklemiyle İnhibisyon Sabitlerinin (K_i) Hesaplanması

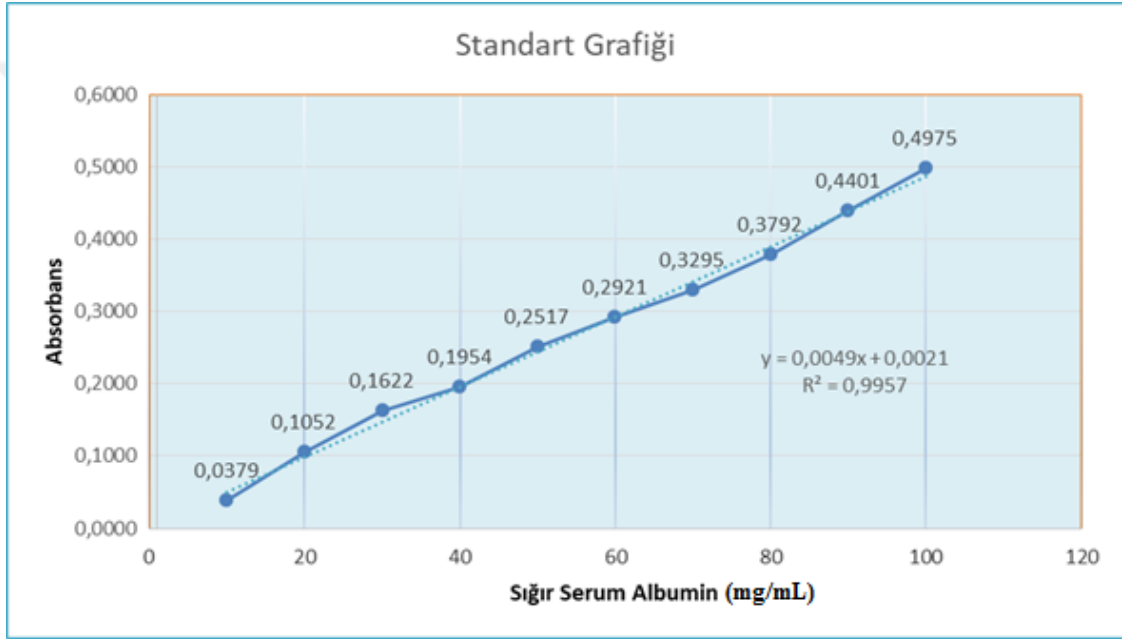
Orijinal sentez sülfonamid türevlerinin (5a→5o) inhibisyon sabitleri (K_i) aşağıdaki Cheng&Prusoff denkleminden yararlanılarak hesaplanmıştır [Cheng ve ark., 1973].

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 3.2.4.'de açıklandığı gibi hazırlandı. Saflaştırma sonrası elde edilen enzim çözeltisinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

4.2. Kantitatif Protein Tayini İle Tespit Edilen BCA Enzimi Protein Miktarı

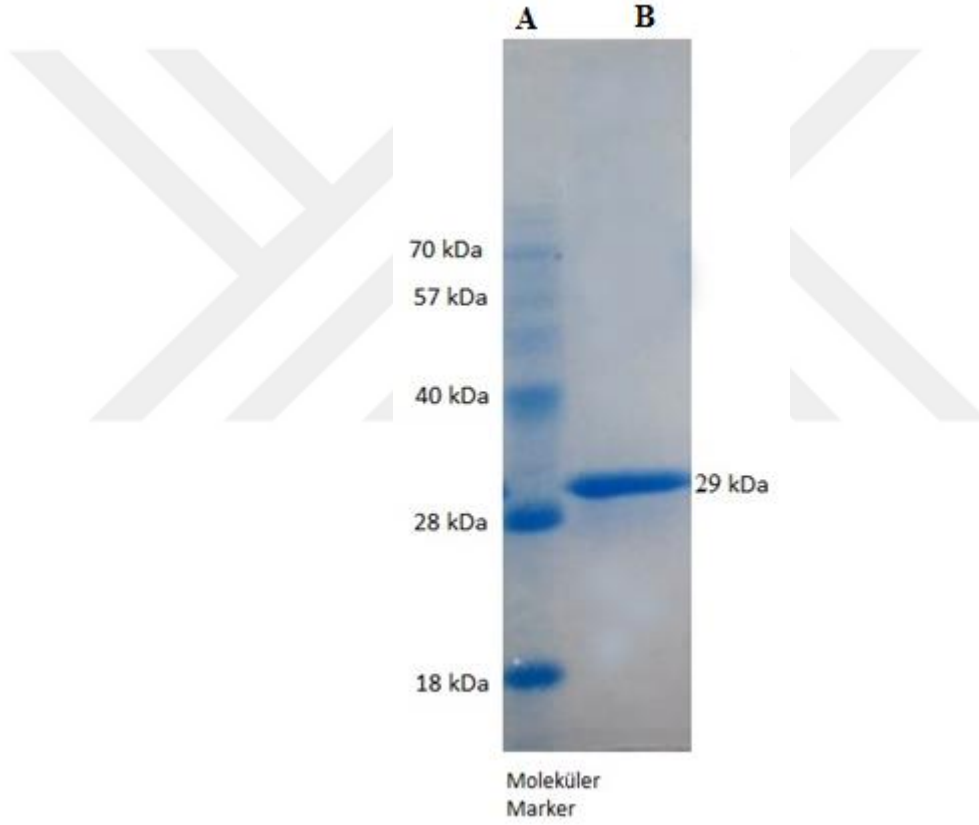
Tablo 4.1. BCA Enzimi Protein Miktarı

	1 abs	2 abs	3 abs	ort	BSA türünden
BCA Enzimi	0,3408	0,3269	0,3297	0,3325±0,0073	674,21±1,5 mg/mL

(100 µl enzim kullanılmıştır.)

4.3. BCA Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezine İle Safsızlık Kontrolü

Afinite kromatografisi kolonundan saflaştırılan BCA enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla Bölüm 3.2.5.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektrofrezine sığır kanından saflaştırılan BCA enzim numunesi tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan BCA enziminin SDS-polakrilamid jel elektrofrezine görüntüsü. (Soldan sağa sütun-A); moleküler markerlar [(baştan sona);70kDa, 57kDa, 40kDa, 28kDa, 18kDa], (sütun B); sığır karbonik anhidraz (29 kDa).

4.4. Enzimin Saflaştırılması

Sığır kanı Siirt ilindeki hayvan kesim noktalarından alınmıştır. Pıhtılaşmasını önlemek amacıyla antikoagulant sıvıdan her 100 mL kan için 15 mL eklenerek kanın

pıhtılaşması engellenmiştir ve +4 °C'de muhafaza edilerek aynı gün içerisinde kullanılmıştır.

Eritrositleri ayırmak amacıyla kanlar 30 mL'lik falkon tüplere konulmuştur. 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj işleminden sonra serum atılmak suretiyle eritrositlerden uzaklaştırılmıştır. Eritrositler % 0.9'lık NaCl çözeltisi ile yıkanmış ve üstteki sıvı kısım atılmıştır. Bu işlemden sonra eritrositler 1,5 katı soğuk distile su ile hemoliz edilmiştir. Hemolizatlar birleştirilerek, hemolizin tam gerçekleşmesi için tüpler bir süre hafif bir şekilde çalkalanmıştır. Hemolizati hücre zarlarından ayırmak için +4 °C'de 15000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hemolizatlar alınarak pH'sı trisma-base ile 8.7'ye getirilmiştir.

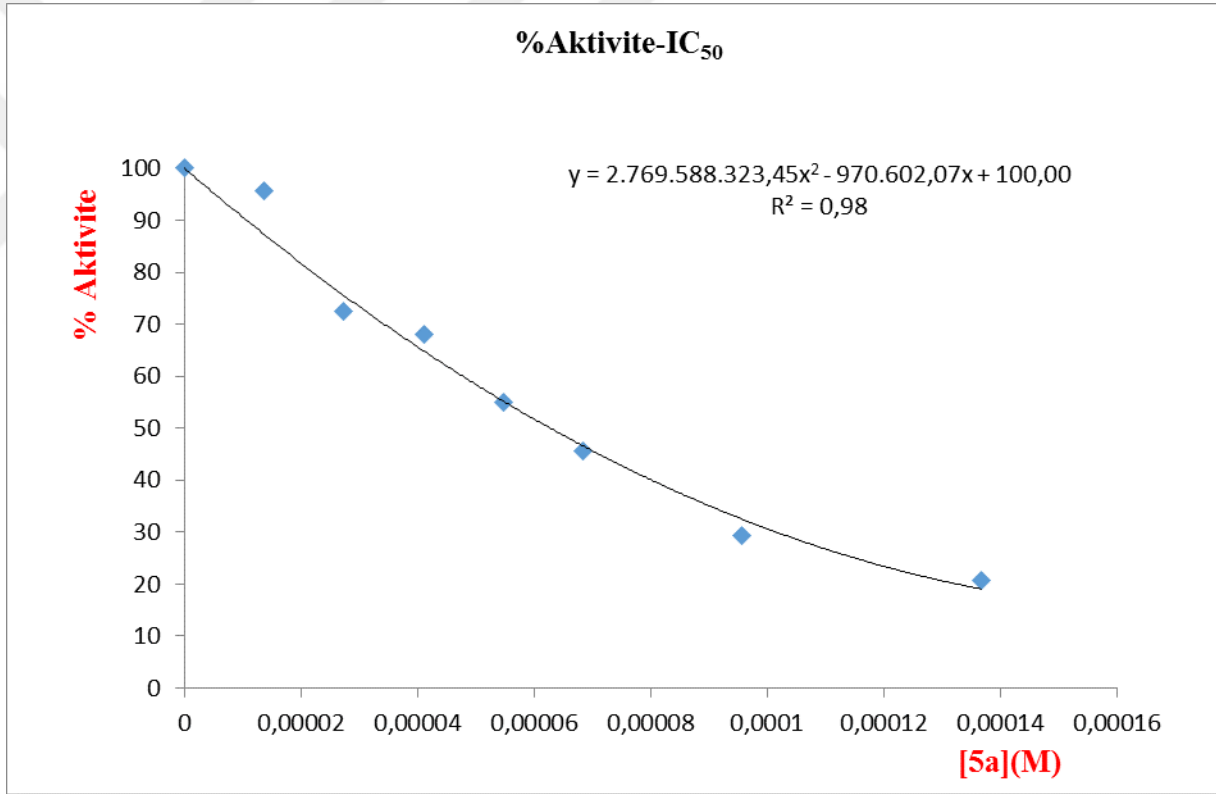
4.4.1. Hemolizatın Afinite Kolonuna Yüklenmesi ve Enzimin Elüsyonu

Hemolizat yüklenmeden önce +4 °C'de muhafaza edilen afinite jeli dengeleme tamponu ile dengelenmiştir. Ardından hemolizat kolona yüklenerek, yıkama tamponu vasıtasıyla safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında, BCA enzimi elüsyon tamponu yardımı ile afinite jelinden saflaştırılarak 3 mL'lik tüplere alınıp aktivite çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

4.4.2. BCA Enzimine Ait Aktivite Çalışmaları ve Elde Edilen Veriler

TABLO 4.2. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5a kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

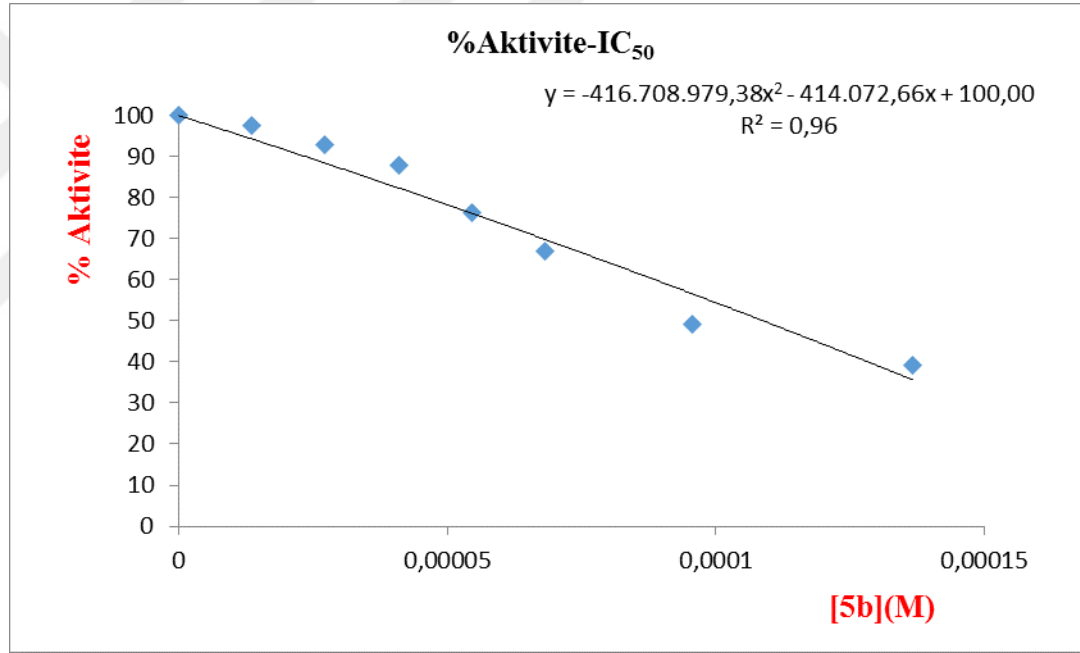
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5a Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki 5a Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,017	0,113	70,625
750			220	15	41,00	0,016	0,107	66,875
750			215	20	54,67	0,013	0,087	54,375
750			210	25	68,33	0,011	0,073	45,625
750			200	35	95,67	0,007	0,047	29,375
750			185	50	136,67	0,005	0,033	20,625



Şekil 4.3.5a kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5a] grafiği

TABLO 4.3. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5b kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

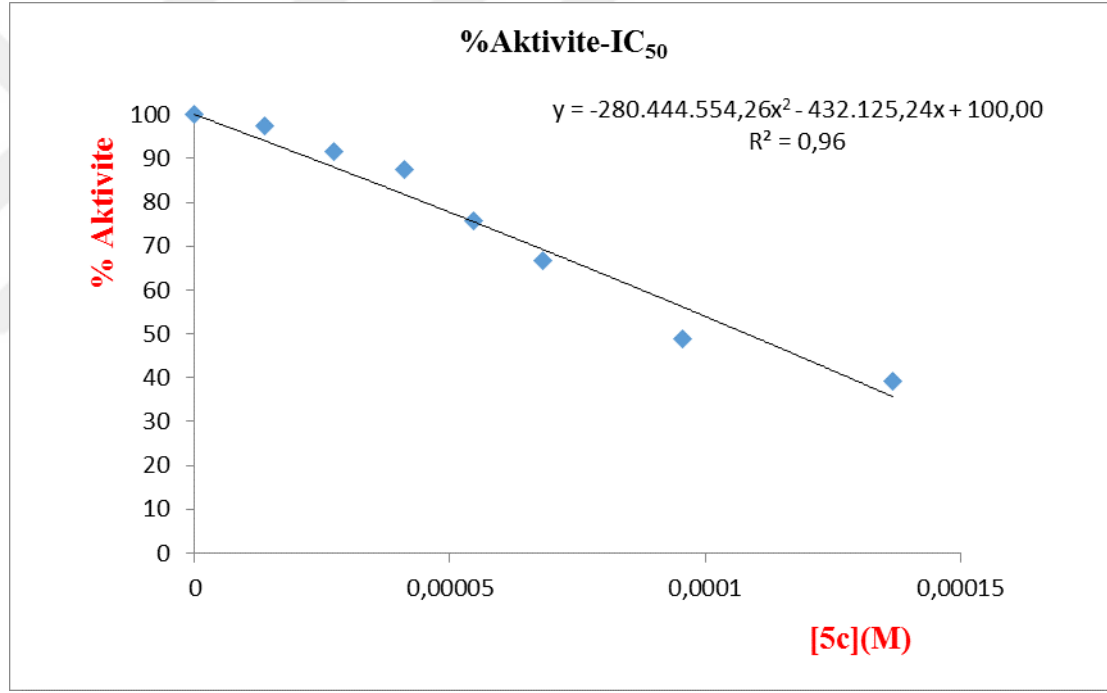
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5b Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 5b Bileşiminin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,022	0,147	91,875
750			220	15	41,00	0,021	0,140	87,500
750			215	20	54,67	0,018	0,120	75,000
750			210	25	68,33	0,016	0,107	66,875
750			200	35	95,67	0,012	0,080	50,000
750			185	50	13,67	0,009	0,060	37,500



Şekil 4.4. 5b kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5b] grafiği

TABLO 4.4. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5c kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

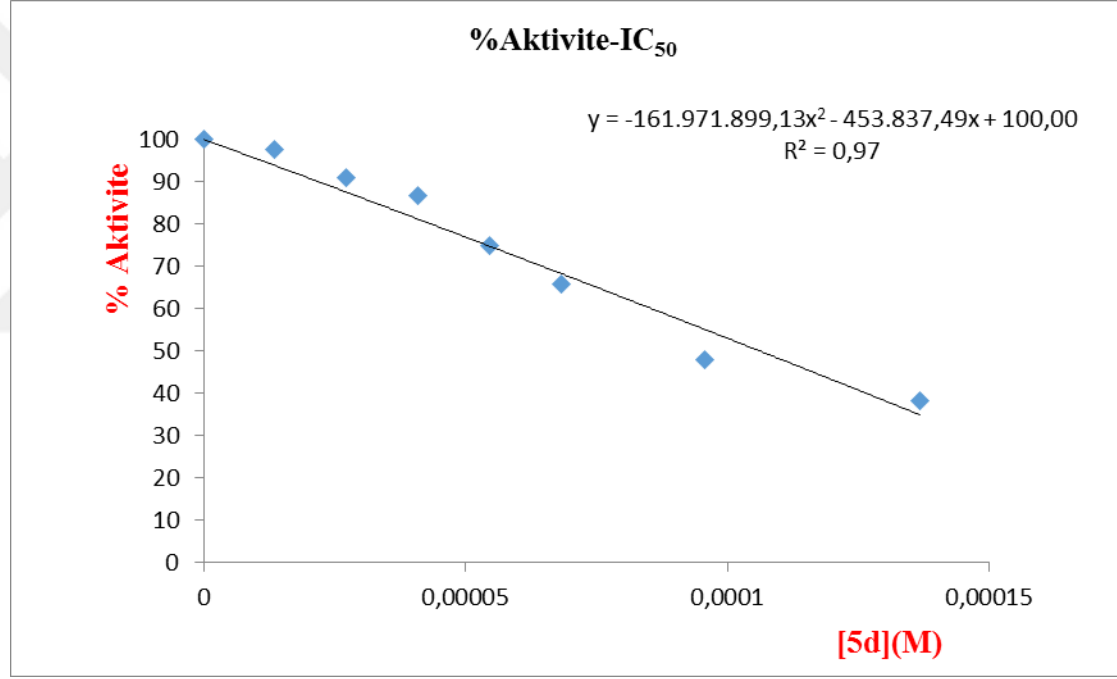
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5c Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki 5c Bileşiminin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,022	0,147	91,875
750			220	15	41,00	0,021	0,140	87,500
750			215	20	54,67	0,018	0,120	75,000
750			210	25	68,33	0,016	0,107	66,875
750			200	35	95,67	0,012	0,080	50,000
750			185	50	136,67	0,009	0,060	37,500



Şekil 4.5. 5c kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5c] grafiği

TABLO 4.5. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5d kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

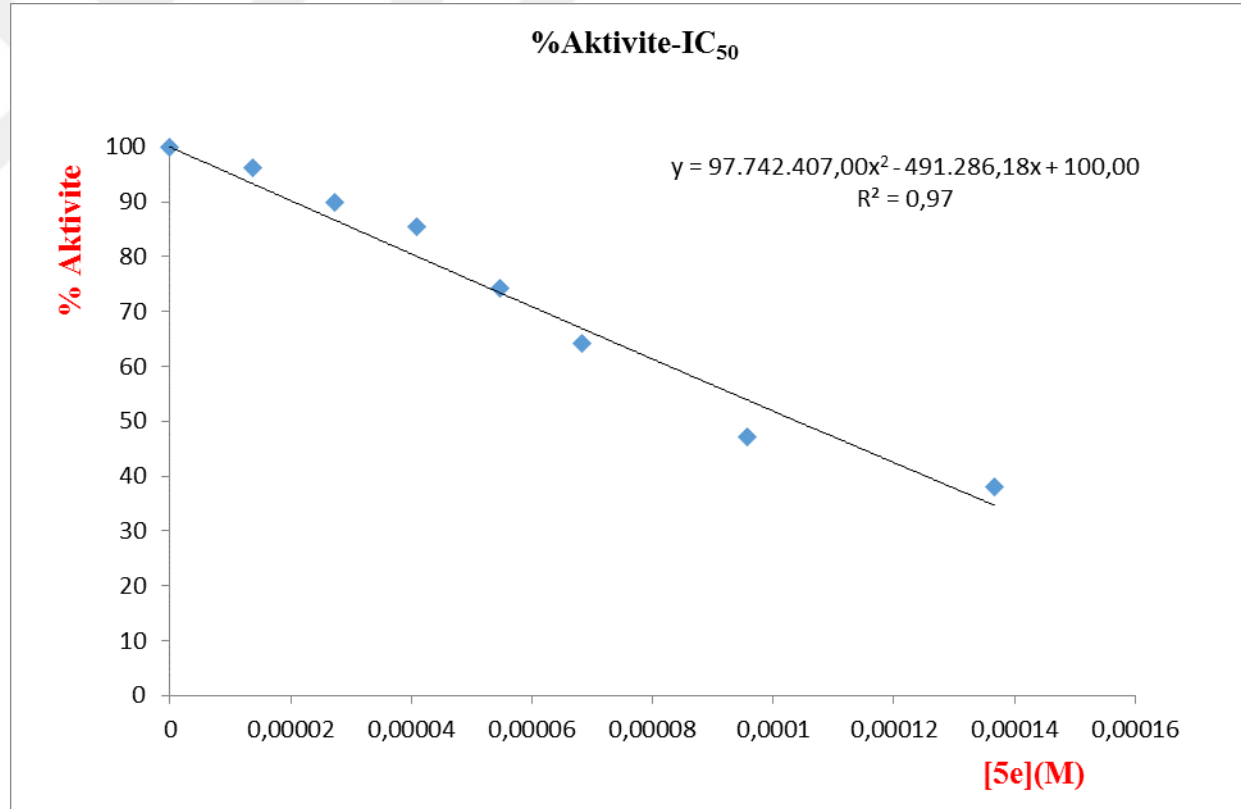
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5d Bileşğinin Hacmi (µL)	Küvetteki 5d Bileşğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,022	0,147	91,875
750			220	15	41,00	0,021	0,140	87,500
750			215	20	54,67	0,018	0,120	75,000
750			210	25	68,33	0,016	0,107	66,875
750			200	35	95,67	0,012	0,080	50,000
750			185	50	136,67	0,009	0,060	37,500



Şekil 4.6. 5d kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5d] grafiği

TABLO 4.6. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5e kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

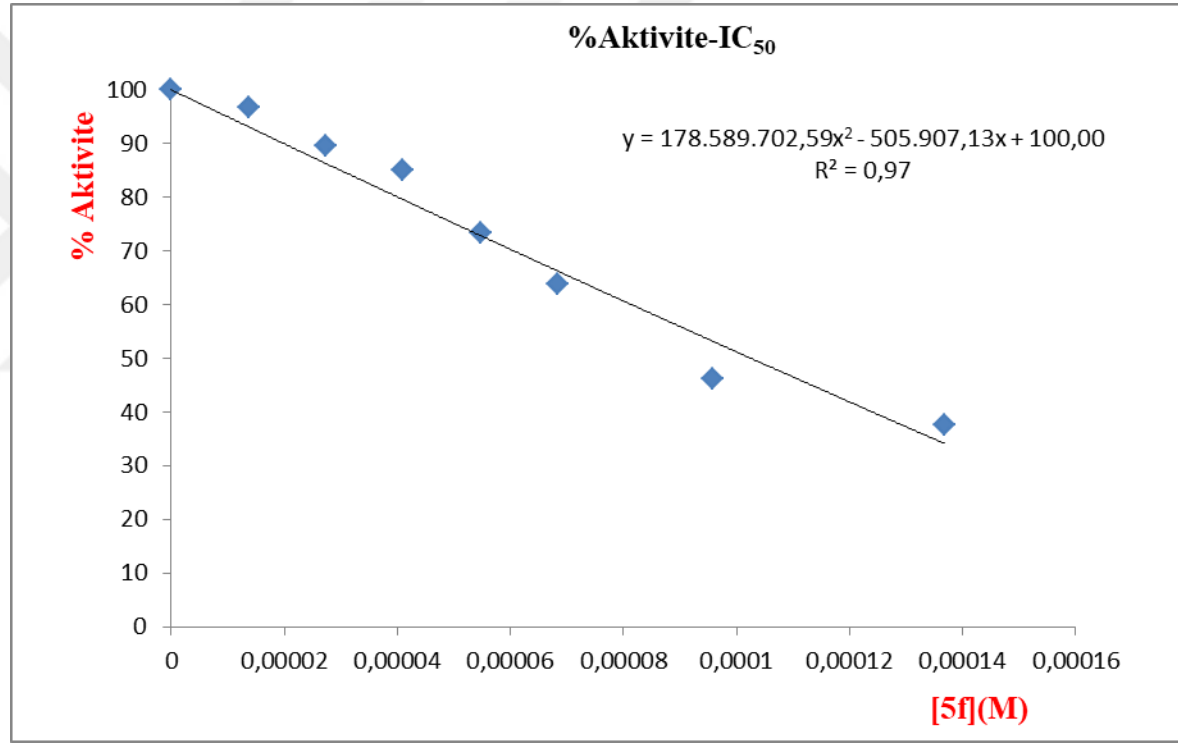
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5e Bileşiğin Hacmi (µL)	Küvetteki 5e Bileşiğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,022	0,147	91,875
750			220	15	41,00	0,021	0,140	87,500
750			215	20	54,67	0,018	0,120	75,000
750			210	25	68,33	0,015	0,100	62,500
750			200	35	95,67	0,011	0,073	45,625
750			185	50	136,67	0,009	0,060	37,500



Şekil 4.7. 5e kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5e] grafiği

TABLO 4.7. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5f kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

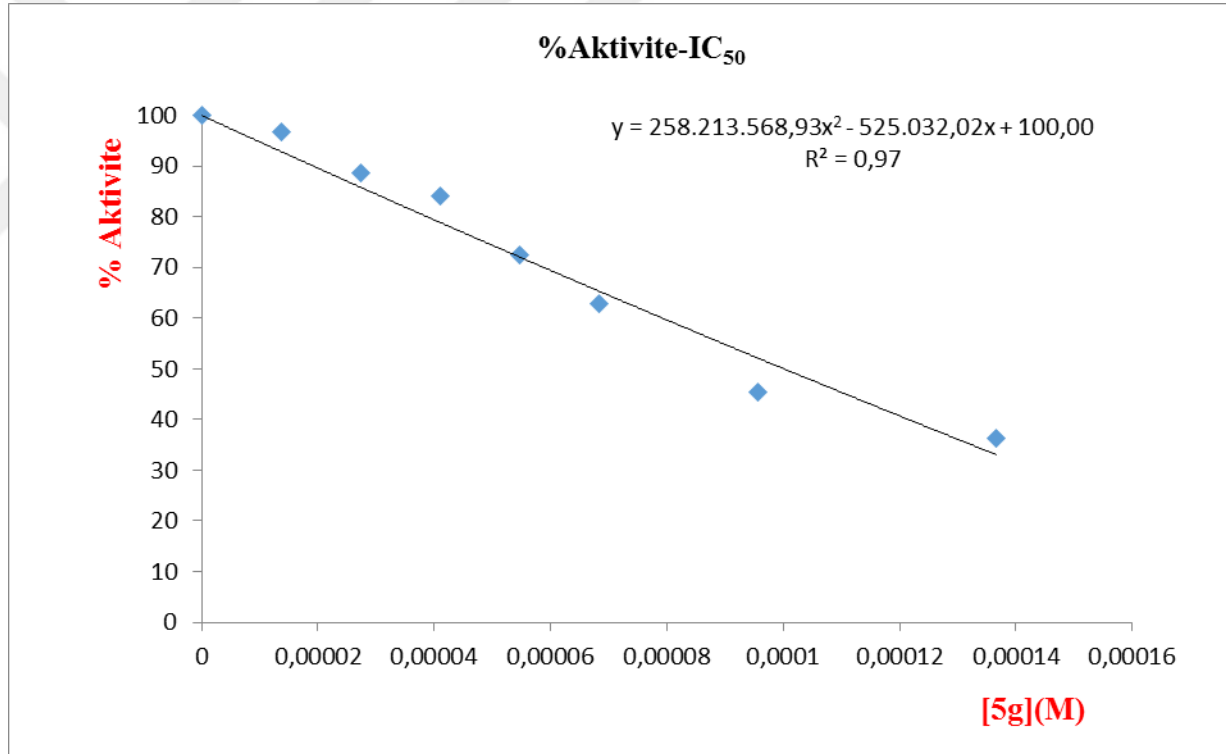
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5f Bileşğinin Hacmi (µL)	Küvetteki 5f Bileşğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,022	0,147	91,875
750			220	15	41,00	0,020	0,133	83,125
750			215	20	54,67	0,018	0,120	75,000
750			210	25	68,33	0,015	0,100	62,500
750			200	35	95,67	0,011	0,073	45,625
750			185	50	136,67	0,009	0,060	37,500



Şekil 4.8. 5f kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5f] grafiği

TABLO 4.8. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5g kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

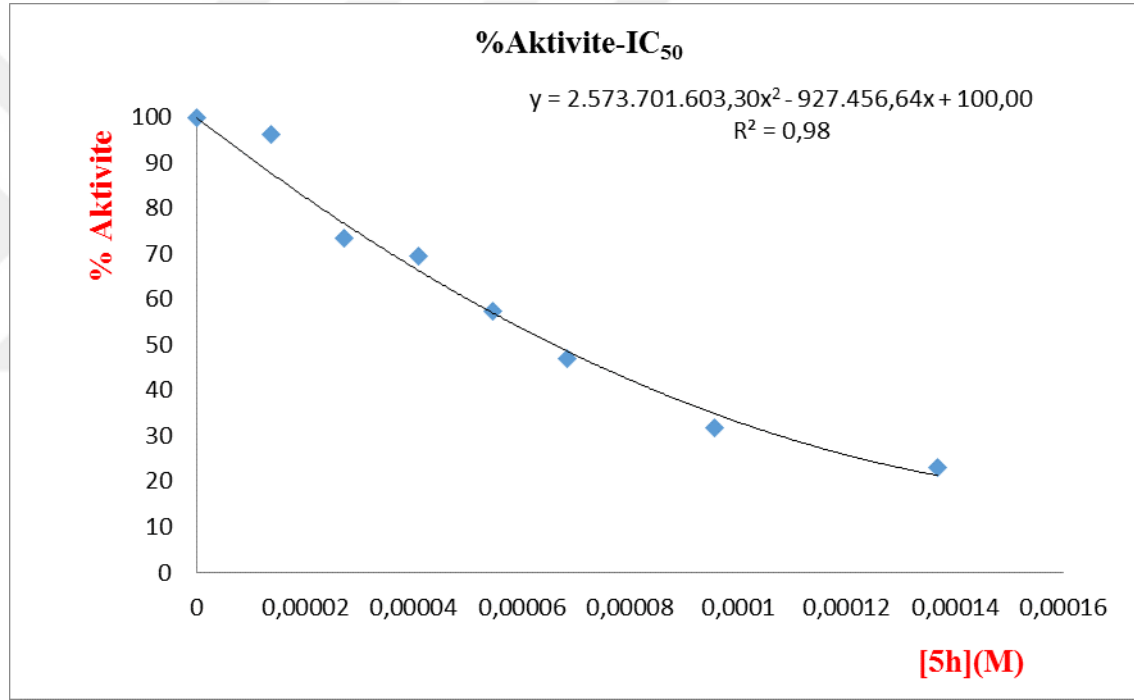
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5g Bileşiğin Hacmi (µL)	Küvetteki 5g Bileşiğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,021	0,140	87,500
750			220	15	41,00	0,020	0,133	83,125
750			215	20	54,67	0,017	0,113	70,625
750			210	25	68,33	0,015	0,100	62,500
750			200	35	95,67	0,011	0,073	45,625
750			185	50	136,67	0,009	0,060	37,500



Şekil 4.9. 5g kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5g] grafiği

TABLO 4.9. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5h kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

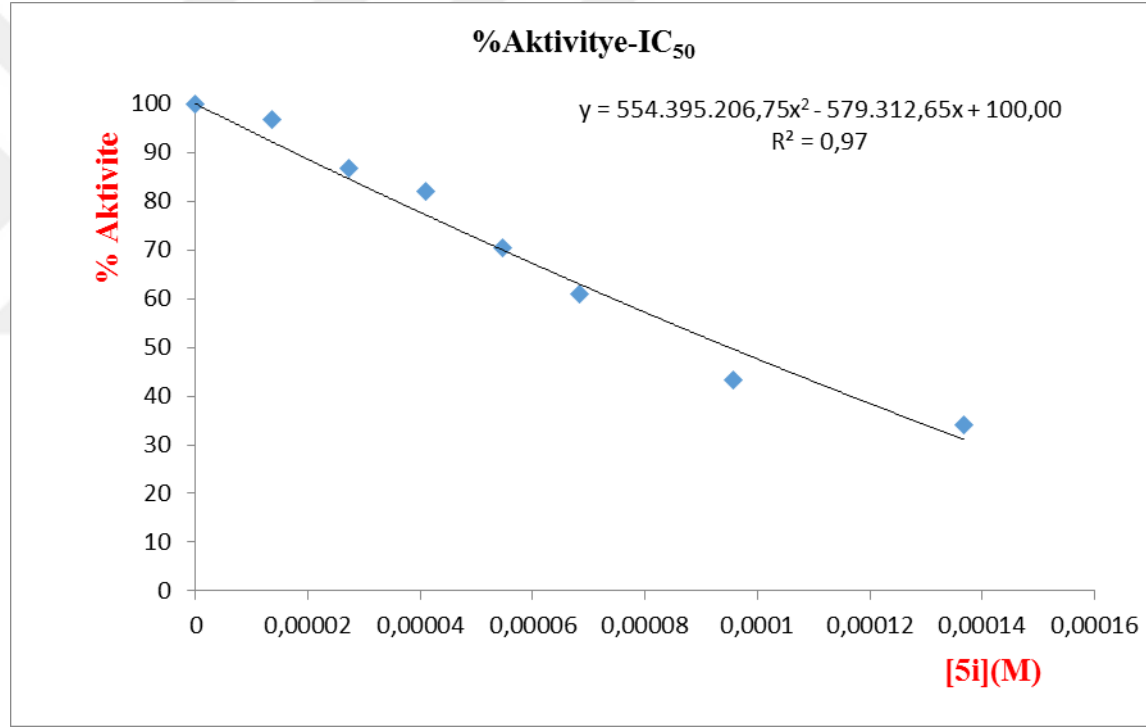
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5h Bileşiğın Hacmi (µL)	Küvetteki 5h Bileşiğının Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,018	0,120	75,000
750			220	15	41,00	0,017	0,113	70,625
750			215	20	54,67	0,014	0,093	58,125
750			210	25	68,33	0,011	0,073	45,625
750			200	35	95,67	0,008	0,053	33,125
750			185	50	136,67	0,006	0,040	25,000



Şekil 4.10. 5h kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5h] grafiği

TABLO 4.10. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5i kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

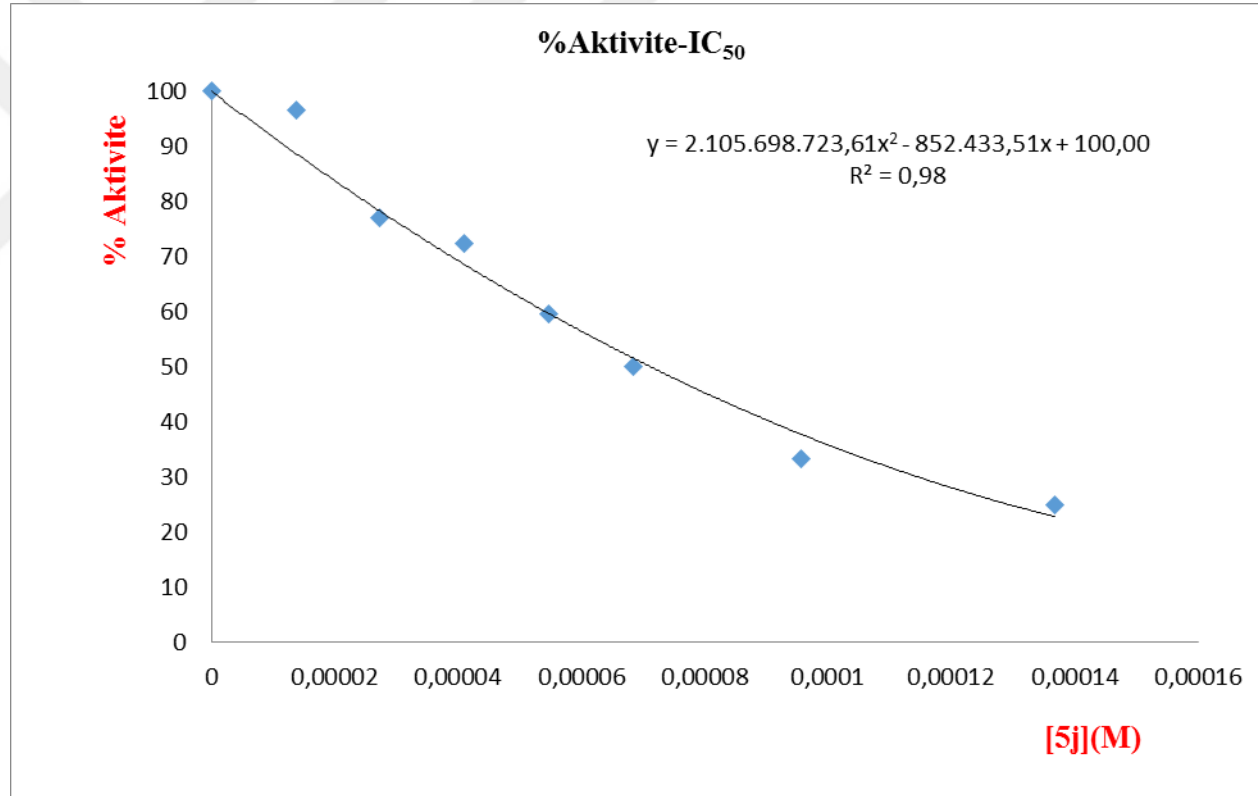
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5i Bileşiğın Hacmi (µL)	Küvetteki 5i Bileşiğının Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,021	0,140	87,500
750			220	15	41,00	0,020	0,133	83,125
750			215	20	54,67	0,017	0,113	70,625
750			210	25	68,33	0,015	0,100	62,500
750			200	35	95,67	0,010	0,067	41,875
750			185	50	136,67	0,008	0,053	33,125



Şekil 4.11. 5i kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5i] grafiği

TABLO 4.11. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5j kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

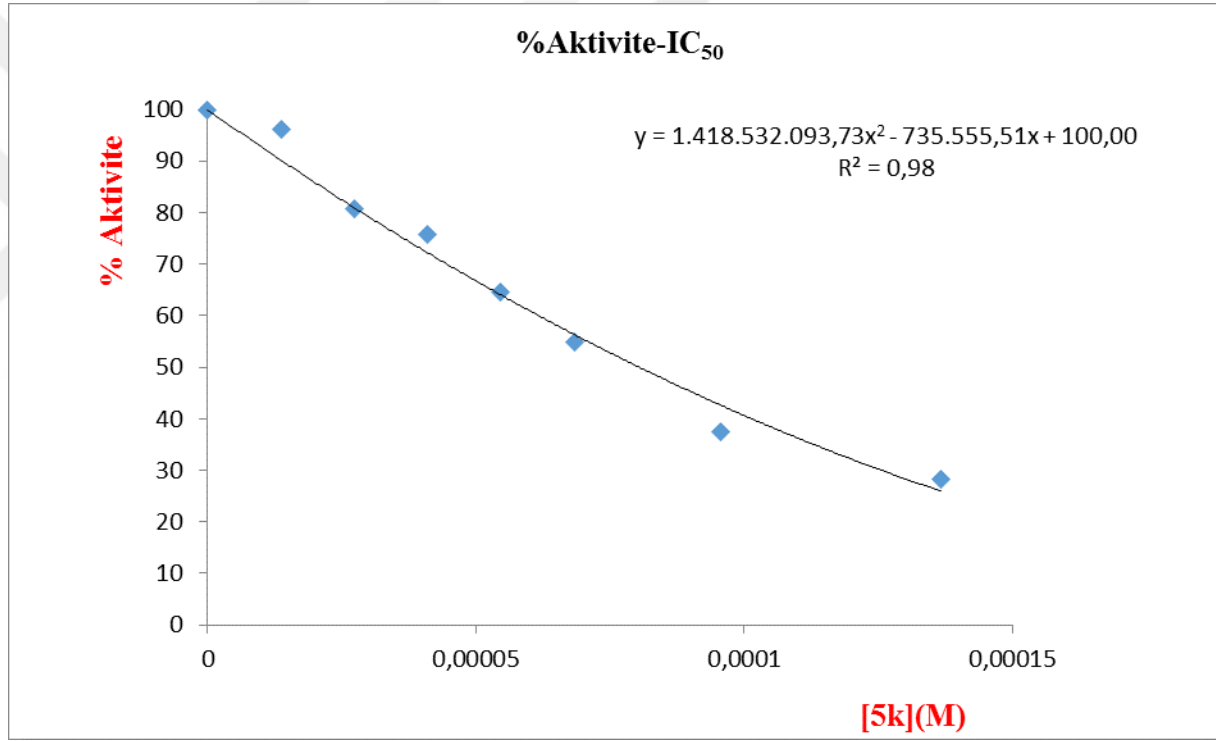
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5j Bileşiğın Hacmi (µL)	Küvetteki 5j Bileşiğının Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,019	0,127	79,375
750			220	15	41,00	0,017	0,113	70,625
750			215	20	54,67	0,014	0,093	58,125
750			210	25	68,33	0,012	0,080	50,000
750			200	35	95,67	0,008	0,053	33,125
750			185	50	136,67	0,006	0,040	25,000



Şekil 4.12. 5j kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5j] grafiği

TABLO 4.12. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5k kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

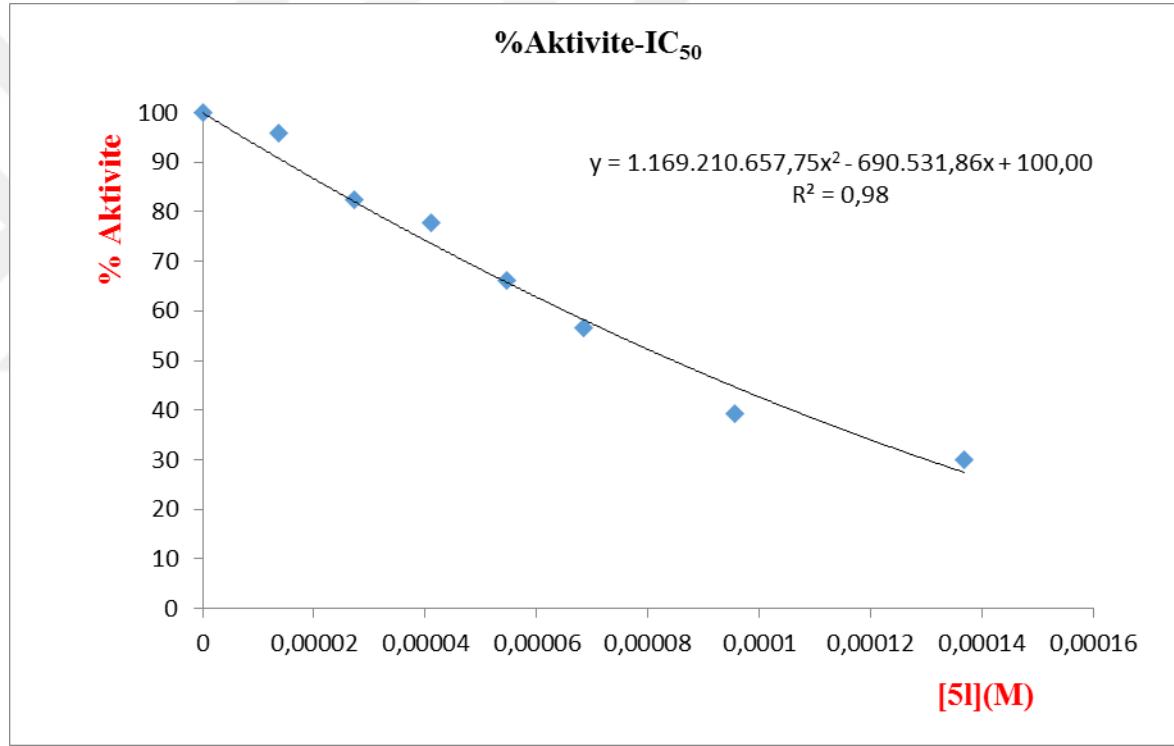
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5k Bileşiğinin Hacmi (µL)	Küvetteki 5k Bileşiğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,019	0,127	79,375
750			220	15	41,00	0,018	0,120	75,000
750			215	20	54,67	0,016	0,107	66,875
750			210	25	68,33	0,013	0,087	54,375
750			200	35	95,67	0,009	0,060	37,500
750			185	50	136,67	0,007	0,047	29,375



Şekil 4.13. 5k kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5k] grafiği

TABLO 4.13. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5l kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

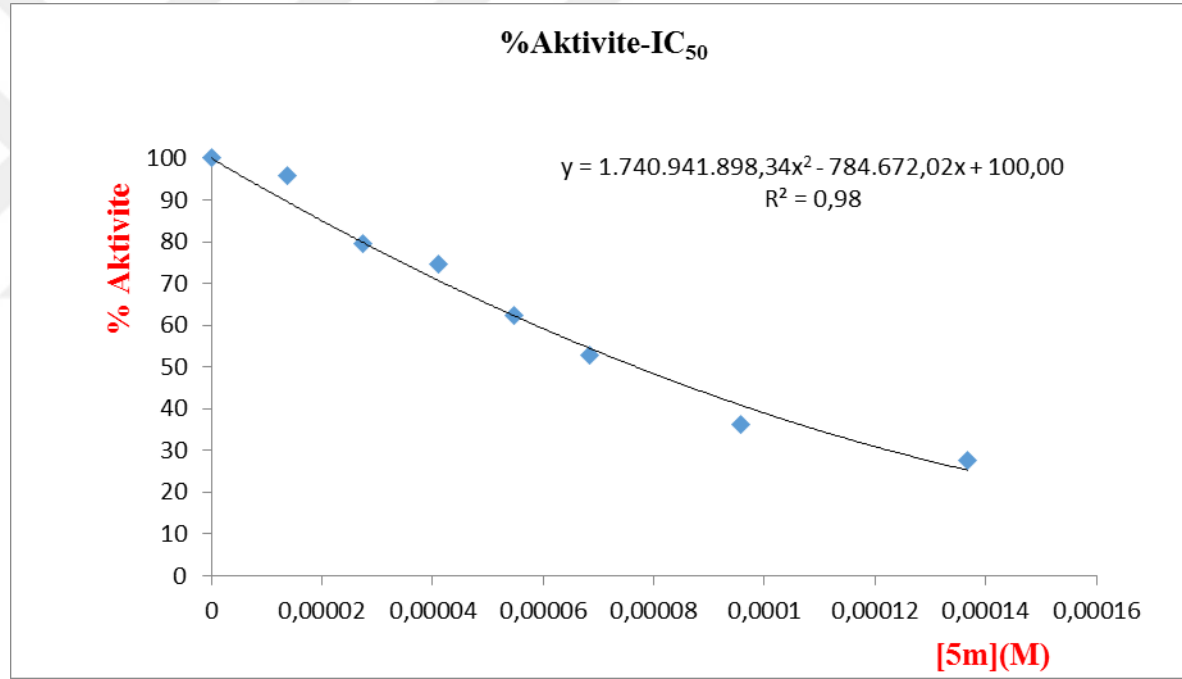
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5l Bileşğinin Hacmi (µL)	Küvetteki 5l Bileşğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,020	0,133	83,125
750			220	15	41,00	0,019	0,127	79,375
750			215	20	54,67	0,016	0,107	66,875
750			210	25	68,33	0,014	0,093	58,125
750			200	35	95,67	0,009	0,060	37,500
750			185	50	136,67	0,007	0,047	29,375



Şekil 4.14. 5I kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5I] grafiği

TABLO 4.14. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5m kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

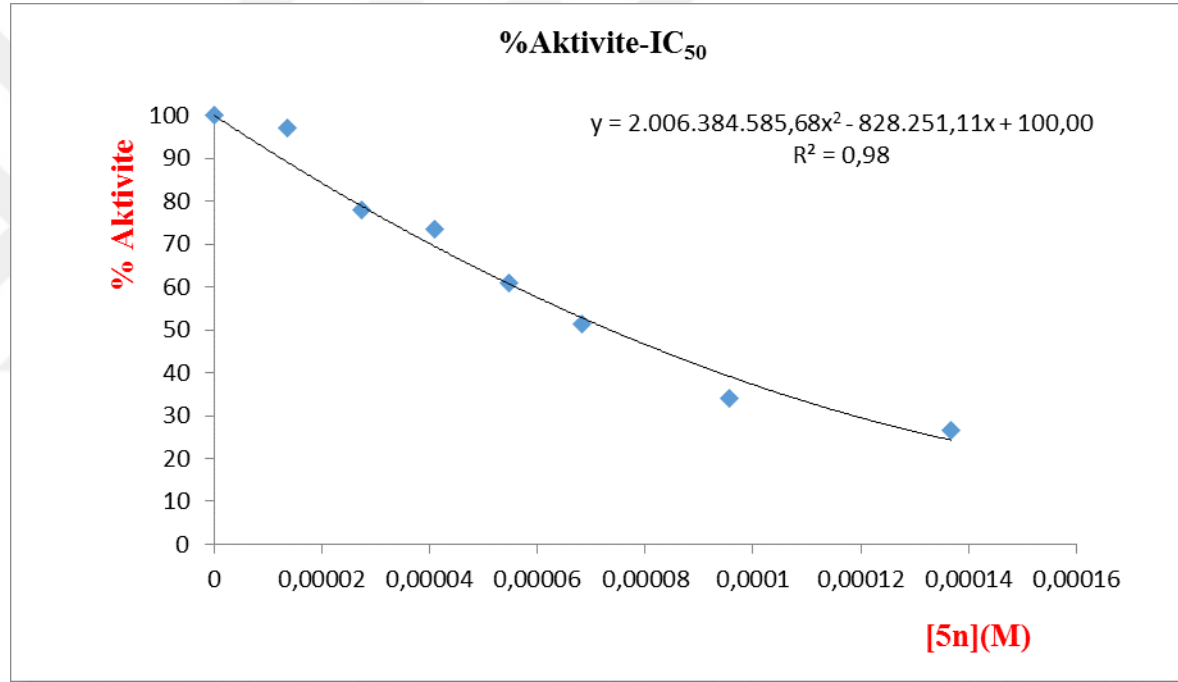
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5m Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 5m Bileşiminin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,019	0,127	79,375
750			220	15	41,00	0,018	0,120	75,000
750			215	20	54,67	0,015	0,100	62,500
750			210	25	68,33	0,013	0,087	54,375
750			200	35	95,67	0,009	0,060	37,500
750			185	50	136,67	0,007	0,047	29,375



Şekil 4.15. 5m kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5m] grafiği

TABLO 4.15. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5n kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

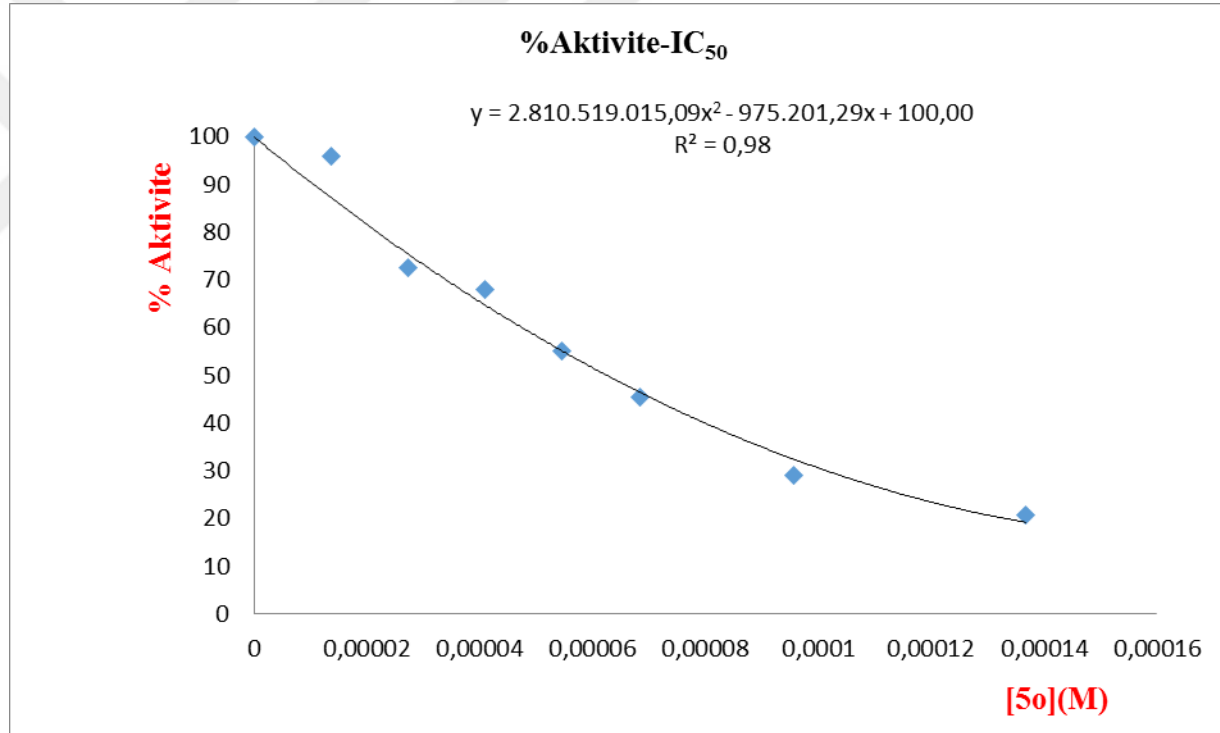
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5n Bileşiğinin Hacmi (µL)	Küvetteki 5n Bileşiğinin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,019	0,127	79,375
750			220	15	41,00	0,018	0,120	75,000
750			215	20	54,67	0,015	0,100	62,500
750			210	25	68,33	0,012	0,080	50,000
750			200	35	95,67	0,008	0,053	33,125
750			185	50	136,67	0,006	0,040	25,000



Şekil 4.16. 5n kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5n] grafiği

TABLO 4.16. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 5o kodlu kimyasala ait IC₅₀ değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ile bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

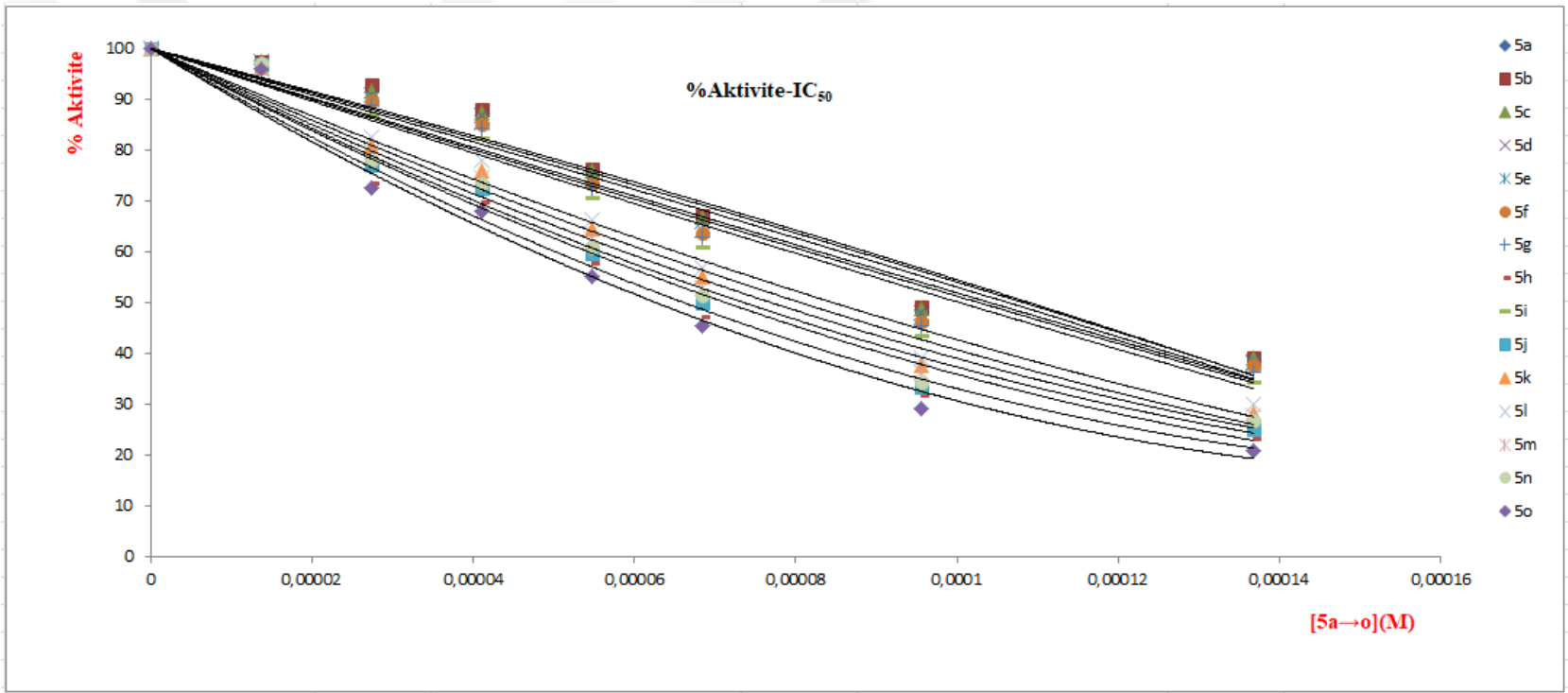
50 Mm Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	5o Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 5o Bileşiminin Kons. (mg/mL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,024	0,160	100,000
750			230	5	13,67	0,023	0,153	95,625
750			225	10	27,33	0,017	0,113	70,625
750			220	15	41,00	0,016	0,107	66,875
750			215	20	54,67	0,013	0,087	54,375
750			210	25	68,33	0,011	0,073	45,625
750			200	35	95,67	0,007	0,047	29,375
750			185	50	136,67	0,005	0,033	20,625



Şekil 4.17. 5o kodlu bileşiğe ait %Aktivite - [5o] grafiği

Tablo 4.17. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren orijinal sentez sülfonamid türevlerinin IC₅₀ değerleri ve Cheng&Prusoff denkleminde göre hesaplanmış K_i değerleri

Madde kodu	IC₅₀ değeri (μM)	K_i (μM)
5a	62,53	11,94
5b	108,83	20,78
5c	108,11	20,64
5d	106,15	20,27
5e	103,92	19,84
5f	102,54	19,58
5g	100,16	19,12
5h	65,99	12,60
5i	94,93	18,13
5j	71,15	13,58
5k	80,45	15,36
5l	84,49	16,13
5m	76,80	14,66
5n	73,42	14,02
5o	51,80	9,89



Şekil 4.18. 5a kodlu bileşikten 5o kodlu bileşiğe kadar %Aktivite - [5a→5o] grafiği

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu lisansüstü tez çalışmasında, glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya potansiyel aday olan ve Sakarya Üniversitesi Organik Kimya Anabilim Dalı çalışanları tarafından sentezlenip kodlarıyla birlikte Tablo 3.1’de sunulan orijinal sülfonamid türevlerinin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan BCA enzimi, Ö.İ. Küfrevioğlu, danışmanlığında, Arslan (1994) tarafından hazırlanan tezden yararlanılarak ilgili prosedüre göre saflaştırılmıştır [Arslan, 1994]. Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonamid kimyasal yapısına sahip afinite jeli üç farklı reaksiyon sonucunda sentezlenebilmiştir. Bunlardan birincisi Sepharose-4B matriksinin CNBr vasıtasıyla aktifleştirilmesi olup, ikinci reaksiyon ise uzantı kolu olarak nitelendirilen L-tirozinin Sepharose-4B matriksine bağlanmasıdır. Üçüncü ve son reaksiyon ise Sepharose-4B-L-tirozin yapısına daha öncesinde tarafımızca diazolanmış olan p-aminobenzen sülfanilamidin kenetlenmesidir.

Çalışmanın dizayn edilmesi sürecinde katı destek materyali olan maktriiks seçiminde farklı matrikslerin kullanılması düşünülmüştür. Ancak Sepharose-4B’nin serbest –OH gruplarının, özellikle CNBr yardımıyla hem kısa sürede hem de verimli bir şekilde aktifleşebildiği ve ilgili matriksin gayet iyi akış kabiliyetine sahip olması literatürden görülünce, çalışmamızda matriks olarak tekrardan Sepharose-4B’nin kullanılmasına sebebiyet vermiştir.

Çalışmamızda BCA enziminin aktivite tayin metodu olarak ilgili enzim esteraz aktivitesinden faydalanılmıştır. Karbonik anhidrazın ester bağını hidroliz etme yeteneğine dayanan bu yöntem Armstrong ve arkadaşlarınca geliştirilmiştir [Armstrong ve ark., 1966]. p-Nitrofenil asetatın karbonik anhidraz enzimi vasıtasıyla p-nitrofenile hidroliz edilmesi ve p-nitrofenilin de 348 nm’de absorpsiyon vermesi esasına dayanan bu yöntem ilgili literatürden yararlanılarak tarafımızca kullanılmıştır.

Glokom tedavisinde kullanılmaya potansiyel aday olan karbonik anhidraz inhibitörleri, bilim insanları tarafınca onlarca kez araştırmalara konu olmuş ve halen araştırıldığı düşünülmektedir. [Demirhan ve ark., 2014; Celik ve ark., 2014; Mikuš ve ark., 2018; Buğday ve ark., 2018; Eldehna ve ark., 2018; Angeli ve ark., 2018; Alyar ve ark.,

2018; Daryadel ve ark., 2018; Qamar ve ark., 2018; Ökten ve ark., 2019; Koyuncu ve ark., 2019; Andreucci ve ark., 2019]

Her geçen gün yeni sentez organik yapıların hastalıkla mücadele edilmesine yönelik literatüre eklendiği görülmektedir. [Demirhan ve ark., 2014; Celik ve ark., 2014; Ezeokonkwo ve ark., 2018; Buğday ve ark., 2018; Angeli ve ark., 2018; Alyar ve ark., 2018; Daryadel ve ark., 2018; Qamar ve ark., 2018 Ökten ve ark., 2019; Canakci ve ark., 2019]. Bu kadar yaygın olarak çalışılmasındaki yegâne sebep, karbonik anhidrazın inhibisyonun daha uygun olarak sağlanabilmesidir. Bu amaçla, geçmişten günümüze gerek *in vivo* gerekse *in vitro* birçok çalışma olağan hızıyla devam etmekte olduğu literatürden açıkça görülmektedir [Mishra ve ark., 2018; Chiaramonte ve ark., 2018; Vanchanagiri ve ark., 2018; Dohle ve ark., 2018; Masand ve ark., 2018]. Bilim insanları sentezlenen organik yapıları bileşiklerin çoğu halen asetazolamid türevleri olduğu ve bunun sebebinin ise glokom hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaç etken maddesi olduğu bilinmektedir [Arslan, 1994]. Öyleki, tüm bu sentezlenen bileşiklerin karbonik anhidraz enzimine karşı afiniteleri çoğu kez asetazolamid ile kıyaslandığı yine birçok literatürce desteklenmektedir. [Mikuš ve ark., 2018; Guerrini ve ark., 2018; Mullens ve ark., 2018; Qamar ve ark., 2018; Rosenbaek ve ark., 2018]. Bilinen en iyi CA inhibitörlerinden sülfonamidler aromatik ve heteroaromatik özelliklerinden dolayı enzime hem hidrofob hem de hidrofilik etkileşmelerin sonucunda bağlanabilmektedir. Bu bağlamda çalışmamızda da kullanılan kimyasal yapılar orijinal sentez sülfonamidlerden oluşmaktadır. Bir inhibitörün, bir enzim üzerine inhibisyon etkisini saptamada K_i ve IC_{50} değerlerinden faydalanabilmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktivite belirlenebilmektedir. Sonrasında %50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanabilmektedir. Daha kolay uygulanması nedeniyle, her ne kadar K_i sabiti gibi hassas olmasa da IC_{50} değeri pratikte oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu sebeplerin hepsi göz önüne alındığında yedi farklı inhibitör konsantrasyonu için substrat konsantrasyonu sabit tutularak IC_{50} değerleri ve Cheng&Prusoff denkleminde göre K_i değerleri BCA enzimi için tespit edilmiştir.

Orijinal sentez bileşiklerin BCA enzimi için inhibisyon etkisi incelendiğinde 50 kodlu ve 4-(5-((2-okso-2-feniletil)tio)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid isimli

yapının 51,80 μM IC_{50} ve 9,89 μM K_i ile en iyi inhibitör olduğu saptanmıştır. Çalışmada kullanılan sũlfonamid tũrevli diğer tũm bileşiklerin BCA enzimi farklı dũzeylerde inhibe ettiği gũrũlmũřtũr.

Aromatik ve heteroaromatik inhibitũrlerin BCA enzimi için yapılan inhibisyon çalışmalarında enzimi inhibe ettiği açıkça gũrũlmũřtũr. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetat enzimin aktif bũlgesine çok yakın histidin amino asidinin imidazol halkasına bağlandığı literatũrce bilinmektedir. Ayrıca sũlfonamid inhibitũrleri karbonik anhidraz enziminin aktif bũlgesinde bulunan Zn^{+2} 'ye bağlı OH^- grubuna bağlandığı bilinmektedir. Karbonik anhidraz enziminin aktif bũlgesine yakın amino asitlerle hidrojen bağı yapabilen sũlfonamid tũrevli inhibitũrler ve p-nitrofenil asetat, karbonik anhidraz enzimine farklı bũlgelerden bağlandıkları için aralarında bağlanma hususunda herhangi bir yarıştan bahsedilemez. Dolayısıyla karbonik anhidraz enziminin inhibisyon çalışmasında p-nitrofenil asetat substrat olarak kullanıldığında sũlfonamid tũrevleri karbonik anhidraz enzimini nankompetitif inhibisyon tũrũ olarak inhibe eder.

Sonuç olarak; Sakarya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakũltesi, Kimya Bũlũmũ Organik Kimya Anabilim Dalı ğretim yesi Prof. Dr. Mustafa ARSLAN ve laboratuvar çalışanlarınca, Organik Kimya Laboratuvarlarında sentezlenen orijinal sũlfonamid tũrevlerinin sığır eritrositlerinde olduğca fazla bulunan BCA enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış olup bu bileşiklerin sũz konusu enzime afinitelerinin farklı dũzeylerde olsa da her birinin inhibisyon etkisi gũsterdiđi bulmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Altan, N., 2000. Biyokimya olgu sunumlu yaklaşım. Palme Yayıncılık, 69 -74, Ankara.
- Alyar, S., Şen, C., Alyar, H., Adem, Ş., Kalkancı, A., Ozdemir, U.O., 2018. Synthesis, characterization, antimicrobial activity, carbonic anhydrase enzyme inhibitor effects, and computational studies on new Schiff bases of Sulfa drugs and their Pd (II), Cu (II) complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1171, 214-222.
- Andreucci, E., Ruzzolini, J., Peppicelli, S., Bianchini, F., Laurenzana, A., Carta, F., Supuran, C.T., Calorini, L., 2019. The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 sensitises cancer cells to conventional chemotherapy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 117-123.
- Angeli, A., Tanini, D., Capperucci, A., Malevolti, G., Turco, F., Ferraroni, M., Supuran, C.T., 2018. Synthesis of different thio-scaffolds bearing sulfonamide with subnanomolar carbonic anhydrase II and IX inhibitory properties and X-ray investigations for their inhibitory mechanism. *Bioorganic Chemistry*, 81, 642-648.
- Armstrong, J., Mc, D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A., Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 241(21), 5137-5149.
- ARSLAN, O., 2001. Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds, *Biochemistry*, 66, 1206-1208.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma Hastalığı tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum*, 26-27, 139.
- Axen, R. and Ernback, S., 1971, Chemical fixation of enzymes Halide activated polysaccharide carriers. *European Journal of Biochemistry*, 18, 351 p.
- Bayşu, N., Sözbilir Bayşu, N., 2008, Biyokimya, Güneş Tıp Kitapevleri, İstanbul, 632 s.
- Boriack-sjodin, P.A., Heck, R.W., Laipis, P.J., Silverman, D.N., Christianson, D.W., 1995. Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 92, 10949-10953.
- 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(1-2), 248-254.
- Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., 1996. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 37. Novel classes of isozyme I and II inhibitors and their

- mechanism of action. Kinetic and spectroscopic investigations on native and cobalt-substituted enzymes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 31(12), 1001-1010.
- Buğday, N., Küçükbay, F.Z., Küçükbay, H., Bua, S., Bartolucci, G., Leitans, J., Kazaks, A., Tars, K., Supuran, C.T., 2018. Synthesis of novel dipeptide sulfonamide conjugates with effective carbonic anhydrase I, II, IX, and XII inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 81, 311-318.
- Campbell, L.K., 1999. Sulphonamides: Updates On Veterinary Medicine, *Veterinary Dermatology*, 10, 205-215.
- Canakci, D., Koyuncu, I., Lolak, N., Durgun, M., Akocak, S., Supuran, C.T., 2019. Synthesis and cytotoxic activities of novel copper and silver complexes of 1, 3-diaryltriazene-substituted sulfonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 110-116.
- Carter, N. D, Jeffrey, S., Shiels, A., 1982, _mmunoassay carbonic anhydrase III in rat tissues. *FEBS lett.*, 139,265. COX, S.N., HAY, E., BIRD, A.C., 1988, Treatment of chronic macular edema with acetazolamide, *Archives of Ophthalmology*, 106, 1190–1195.
- Celik, F., Arslan, M., Kaya, M.O., Yavuz, E., Gencer, N., Arslan, O., 2014. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of tetrazole-and oxadiazole substituted 1, 4-dihydropyrimidinone compounds. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42(1), 58-62.
- Cheng, Y., Prusoff, W.H. 1973. Prusoff relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22, 3099-3108.
- Chiaromonte, N., Bua, S., Ferraroni, M., Nocentini, A., Bonardi, A., Bartolucci, G., Durante, M., Lucarini, L., Chiapponi, D., Dei, S., Manetti, D., 2018. 2-Benzylpiperazine: A new scaffold for potent human carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis, enzyme inhibition, enantioselectivity, computational and crystallographic studies and in vivo activity for a new class of intraocular pressure lowering agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 151, 363-375.
- Cuatracases, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059-3065.
- Cox, S.N., Hay, E., Bird, A.C., 1988, Treatment of chronic macular edema with acetazolamide. *Archives of Ophthalmology*, 106(9), 1190–1195.
- Daryadel, S., Atmaca, U., Taslimi, P., Gülçin, İ. Çelik, M., 2018. Novel sulfamate derivatives of menthol: Synthesis, characterization, and cholinesterases and carbonic anhydrase enzymes inhibition properties. *Archiv der Pharmazie*, 351(11), 1800209.

- Demirhan, H., Arslan, M., Kaya, M.O., Kaya, Y., Gencer, N., Arslan, O., 2014. In vitro inhibition of purified human carbonic anhydrase I and II by novel fluorene derivatives. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 33(2), 199-207.
- Devlin, T.M., 2002. Biochemistry with Clinical Correlations, *John Wiley & Sons*, Canada.
- Dikmen, N. ve Özgünen, T., 2004, Harper Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 928 s.
- Domagk, G.J., 1935. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen infektionen, *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 61, 250-253.
- Dohle, W., Jourdan, F.L., Menchon, G., Prota, A.E., Foster, P.A., Mannion, P., Hamel, E., Thomas, M.P., Kasprzyk, P.G., Ferrandis, E., Steinmetz, M.O., 2018. Quinazolinone-based anticancer agents: synthesis, antiproliferative SAR, antitubulin activity, and tubulin co-crystal structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(3), 1031-1044.
- Dogson, S. J., Foster, R.E., Schwed, D. A., Storey, B. T., 1983, Contribution of matrix carbonic anhydrase to citrulline synthesis in isolated puinea pig liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 258(12), 7696-7701.
- Doğu, H., 1994, Türkiye’de satılan bazı sülfö grubu ilaçların fizikokimyasal parametrelerinin tayinleri üzerinde çalışmalar, *Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 51s.
- Dökmeci, İ., 1992, Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar, *Nobel Tıp Kitabevi*, 1. Baskı, İstanbul, 976s.
- Durdagi, S., Şentürk, M., Ekinci, D., Balaydın, H.T., Goksu, G., Kufreviöglu, O.I., 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 (2011), 1381–1389.
- Eldehna, W.M., Nocentini, A., Al-Rashood, S.T., Hassan, G.S., Alkahtani, H.M., Almehizia, A.A., Reda, A.M., Abdel-Aziz, H.A., Supuran, C.T., 2018. Tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX and XII inhibitory properties of certain isatin-bearing sulfonamides endowed with in vitro antitumor activity towards colon cancer. *Bioorganic Chemistry*, 81, 425-432.
- Ezeokonkwo, M.A., Eze, C.C., Okafor, S.N., Onoabedje, E.A., Godwin-Nwakwasi, E.U. Ibeanu, F.N., 2018. Diazabenzö [a] phenoxazone sulphonamides: synthesis, in-silico and in-vitro antimicrobial studies. *Medicinal Chemistry Research*, 27(11-12), 2482-2493.
- Ferraroni, M., Tilli, S., Briganti, F., Chegwidde, W.R., Supuran, C.T., Wiebauer, K.E., Tashian, R.E., Scozzafava, A., 2002. Crystal structure of a zinc-activated variant of human carbonic anhydrase I, CA I Michigan 1: evidence for a second zinc binding site involving arginine coordination. *Biochemistry*, 41(20), 6237-6244.

- Geers, C. and Gros G. 2000. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 681-715.
- Gökçe, B., 2009. Tiyadiazol türevleri bileşiklerinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak insan karbonik anhidraz enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 5.
- Guerrini, G., Criscuoli, M., Filippi, I., Naldini, A., Carraro, F., 2018. Inhibition of smoothed in breast cancer cells reduces CAXII expression and cell migration. *Journal of Cellular Physiology*, 233(12), 9799-9811.
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., 1996. Differentiation dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10 (4), 481-490.
- Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas Exchange organs. *Respiration Physiology*, 121 (1), 1-12.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. *Birkhauser Verlag, Basel*, 29-78.
- Innocenti, A., Gülçin, I., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2010, Carbonic anhydrase inhibitors. Antioxidant polyphenol effectively inhibit mammalian isoforms I-XV, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5050-5053.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M., 2006, *Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara*, 975-591-131-6.
- Kandel, M., Gonall, A. G., Wong, S., Kondel, S. I., 1970, Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 2444-2450.
- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel Yönden Tıbbi Farmakoloji, *Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti.* 10. Baskı, Ankara,1726 s.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004, *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, 642 s. Erzurum
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2009, *Biyokimya, Aktif Yayınevi*, 637-645. Erzurum
- Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B.E., Ferry, J.G., Rees, D.C., 1996, A left handed β -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*, *The EMBO Journal*, 15, 2323-2330.
- Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, A Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84(1), 7-14.
- Koyuncu, I., Gonel, A., Durgun, M., Kocyigit, A., Yuksekdağ, O., Supuran, C.T., 2019. Assessment of the antiproliferative and apoptotic roles of sulfonamide

- carbonic anhydrase IX inhibitors in HeLa cancer cell line. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 75-86.
- Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680-685.
- Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H., Tashian, R. E., 1996, Expression of carbonic anhydrase of mouse VII. in E. Coli. And demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226, 268-272.
- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. Milanese, C., 1998. Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 38, 169-172.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005, Lehninger Principles of Biochemistry, 3. baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç, N.), *Palme Yayıncılık*.Ankara.
- Lesburg, C.A., Christianson, D.W., 1995. X-RAY Crystallographic studies oengineered hydrogen-bond network in protein-zinc binding-site, *Journal of The American Chemical Society*, 117, 6838-6844.
- Lindskog, S. 1997. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase, *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 1-20.
- Lindskog, S., Wistrand, P.J. 1988. Inhibitors of carbonic anhydrase. *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, 698-723.
- Maa, J.S., Rodriguez, J.F., Esteban, M., 1990. Structual and functional characterization of a cell surface binding protein of Vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 265, p 1569-1577.
- Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiologyand inhibition. *Physiological Reviews*, 47(4), 595-781.
- Maren, T.H., Jankowska, L., Sanyal, G., Edelhauser, H.F., 1983. The Transkorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion, *Experimental Eye Research*, 36, 457-480.
- Maren, T. H. and Janskowska, L., 1985. Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. *Current Eye Research*, 4(4), 399-408.
- Maren, T.H., 1987. Carbonic Anhydrase: General perspectives and advances in glaucoma research, *Drug Development Research*, 10, 255-276.
- Maren, T.H. and Conroy, C.W., 1993. A new class of carbonic anhydrase inhibitor, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 26233-26239.
- Maren, T.H., 1995. The development of topical carbonic anhydrase inhibitors, *Journal of Glaucoma*, 4, 49-62.

- Masand, N., Gupta, S.P., Khosa, R.L., 2018. N-Substituted Aryl Sulphonamides as Potential Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Current Computer-Aided Drug Design*, 14 (4), 338-348.
- McIntosh, J.E.A., 1970, Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rat. *Biochemical Journal*, 120, 299-310.
- Mikuš, P., Krajčiová, D., Mikulová, M., Horváth, B., Pecher, D., Garaj, V., Bua, S., Angeli, A., Supuran, C.T., 2018. Novel sulfonamides incorporating 1, 3, 5-triazine and amino acid structural motifs as inhibitors of the physiological carbonic anhydrase isozymes I, II and IV and tumor-associated isozyme IX. *Bioorganic Chemistry*, 81, 241-252.
- Mishra, C.B., Kumari, S., Angeli, A., Bua, S., Buonanno, M., Monti, S.M., Tiwari, M., Supuran, C.T., 2018. Discovery of potent anti-convulsant carbonic anhydrase inhibitors: Design, synthesis, in vitro and in vivo appraisal. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 430-443.
- Mincione, F., Scozzafava, A. Supuran, C.T. 2007. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7, 849–854.
- Mullens, W., Verbrugge, F.H., Nijst, P., Martens, P., Tartaglia, K., Theunissen, E., Bruckers, L., Droogne, W., Troisfontaines, P., Damman, K., Lassus, J., 2018. Rationale and design of the ADVOR (Acetazolamide in Decompensated Heart Failure with Volume Overload) trial. *European Journal of Heart Failure*, 20(11), 1591-1600.
- Arslan, O., Genc, H., Ceken, B., Bilen, Ç., Sackes, Z., Gencer, N., 2017. Synthesis and Biological Evaluation of New 4-Thiazolidinone Derivatives as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Letters in Organic Chemistry*, 14(2), 80-85.
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusomoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S. 1995. Carbonic Anhydrase IV role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320, 312-315.
- Ökten, S., Ekiz, M., Koçyiğit, Ü.M., Tutar, A., Çelik, İ., Akkurt, M., Gökalp, F., Taslimi, P., Gülçin, İ., 2019. Synthesis, characterization, crystal structures, theoretical calculations and biological evaluations of novel substituted tacrine derivatives as cholinesterase and carbonic anhydrase enzymes inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1175, 906-915.
- Özalp, E.A.D., 2002, Farmakoloji, *Nobel Tıp Kitap Evleri*, İstanbul.
- Pocker, Y. and Joan, S. Y. 1973. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. *Biochemistry*, 12(25), 5127–5134.
- Pocker, Y., and Joan, S. Y. 1974. Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition. *Biochemistry*, 13(25), 5116-5120.

- Pocker, Y. and Janjic, N. 1989. Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II. *Journal of the American Chemical Society.*, 111(2), 731-733.
- Reeves, D. 1982. Good antimicrobial prescribing: sulphonamides and trimethoprim. *Lancet*, ii, 370-373.
- Rosenbaek, J.B., Pedersen, E.B., Bech, J.N., 2018. The effect of sodium nitrite infusion on renal function, brachial and central blood pressure during enzyme inhibition by allopurinol, enalapril or acetazolamide in healthy subjects: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *BMC Nephrology*, 19(1), 244-255.
- Segel, I.H., C. 1975. Enzyme Kinetics. *John Wiley and Sons*. New York.
- Scher, A., Dietsch, P., 1984. A 54,000 molecular-weight protein with carbonic-anhydrase activity in rabbit erythrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 429, 241-242.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack – Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D. W., 1998. Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Science*, 7(3), 556-563.
- Stryer, L., 1988. Biochemistry 3rd Edition. *W.H. Freeman and Company*, 233-260, Newyork.
- Sugrue, M.F. 2000. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19, 87–112.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A. 2000. Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1, 3, 4 – thiadiazole – 2 sulfonamide derivatives as antitumor agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 867 – 874.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A. 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61- 97.
- Supuran, C.T. 2010. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Molecular Diversity*, 15, 305-316.
- Tashian, R.E., and Hewett-Emmett, D. 1984. Biology and Chemistry of The Carbonic Anhydrase. *The New York Academy of Science*, New York.
- Telefoncu, A. 1986. Temel ve uygulamalı enzimoloji. *Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi yayını*, İzmir (Der) 59.
- Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı*, Van.

- Vanchanagiri, K., Emmerich, D., Brusckke, M., Bache, M., Seifert, F., Csuk, R., Vordermark, D., Paschke, R. 2018. Synthesis and biological investigation of new carbonic anhydrase IX (CAIX) inhibitors. *Chemico-Biological Interactions*, 284, 12-23.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, S.T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *The Journal of Biological Chemistry*, 18, 4221-4229.
- Qamar, R., Saeed, A., Saeed, M., Ashraf, Z., Abbas, Q., Hassan, M., Albericio, F. 2018. Synthesis, carbonic anhydrase inhibitory activity and antioxidant activity of some 1, 3-oxazine derivatives. *Drug Development Research*, 79(7), 352-361.
- Yeşilyaprak, B. 2004. Pazı (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*)' dan karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Biokimya Programı*. İstanbul.

EKLER

EK-1

T.C.
SİİRT ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ONAY BELGESİ

SİİRT UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı: Bazı Sülfonamid Bileşiklerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine In Vitro Etkilerinin Araştırılması

Title of the Research: The Effects of Some Sulfonamide Compounds on Carbonic Anhydrase Enzyme Activity In Vitro

Araştırmacı(lar)
Investigator(s) Yürütücü / Chief investigator: Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA
Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Ercan ALPINAR

Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research:

Tür / species: Sığır/Cow

Sayı / Numbers: 5

Yaş /Age:-

Cinsiyet / Sex: Dişi ve Erkek / Female and Male

Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 17.04.2017

Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date:17.01.2018

Dosya no / File no:2017/18

Karar:

Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmemektedir. Tarih: 19/04/2017; Karar no: 2017/04/04

Decision:

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 19/04/2017; Decision number 2017/04/04

BAŞKAN
Prof. Dr. Nihat ŞINDAK

ÜYE
Doç. Dr. Ayhan YILMAZ

ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Behçet İNAL

ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Nasip
ÖZALTAŞ

ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Zehal KARAKOÇ
ÜYE (Sivil)

RAPORTÖR
Araş. Gör. Ali GÜLLAYDIN
ÜYE (Sivil)

Ahmet ASLAN

Ayşegül KESİCİ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ercan ALPINAR
Doğum Yeri ve : MARDİN – 01.01.1990
Telefon : +90 537 370 91 65
E-posta : ercanalpinar@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Aziz ÖNEN lisesi – Midyat -MARDİN	2006
Üniversite	: Siirt Üniversitesi – Merkez- SİİRT	2014
Yüksek Lisans	: Siirt Üniversitesi – Merkez- SİİRT	2019
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2014-2016	Şırnak ATAK Çaba Dersanesi	Öğretmen
2016-	Siirt Uğur Dersanesi	Öğretmen

UZMANLIK ALANI: Kimya (Biyokimya)

YABANCI DİLLER: İngilizce