

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

**BAZI OKSADİAZOL SÜBSTİTÜYE TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Abdülbaki EYBEK
(163101003)**

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

**Nisan, 2019
SİİRT**

TEZ KABUL VE ONAYI

Abdülbaki EYBEK tarafından hazırlanan “BAZI OKSADİAZOL SÜBSTİTÜYE TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması 09/04/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL

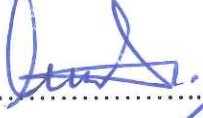
Danışman

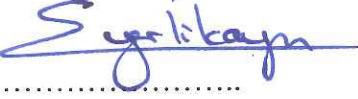
Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Emrah YERLİKAYA

İmza


.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Doç. Dr. Fevzi HANSU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 2017-SİÜFEB-83 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. Öğr. Üyesi Ebru AKKEMİK, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emrah YERLİKAYA, Dr. Öğretim Görevlisi Oğuzhan ÖZDEMİR ve maddi desteklerinden dolayı Siirt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım süresince her türlü yardımlarını esirgemeyen saygı değer Yüksek Lisans arkadaşlarım; Ercan ALPINAR 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, manevi desteklerini esirgemeyen çok değerli aile üyelerim; babam Ali EYBEK, annem Fatma EYBEK, eşim Taybet EYBEK ve oğlum Enes EYBEK'e sonsuz şükranlarımı sunarım.



Abdülbaki EYBEK
SİİRT-2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Oksadiazoller	1
1.1.1. Oksadiazollerin Genel Yapıları ve Adlandırılmaları	1
1.1.2. 1,2,4-Oksadiazoller	2
1.1.3. 1,3,4-Oksadiazol Türevlerinin Sentezlenme Yöntemleri	2
1.2. Enzimler.....	7
1.2.1. Enzim İnhibisyonu.....	8
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	11
2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi (CA; EC: 4.2.1.1)	11
2.1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi	13
2.1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi İnhibitörleri.....	14
2.1.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi.....	16
2.1.3.1. CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi.....	16
2.1.3.2. Esteraz Aktivitesi.....	17
2.1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	18
2.1.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	18
2.2. Glokom Hastalığı ve Karbonik Anhidraz Enzimi.....	20
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyaller.....	22
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	27
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	27
3.2. Yöntemler	29
3.2.1. Afinite Jelin Hazırlanması	29
3.2.2. Sığır Eritrositlerinden BCA Enziminin Saflaştırılması	30
3.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi	30
3.2.2.2. Hemolizattan Enzimin Saflaştırılması	31
3.2.3. Enzimin Aktivite Tayini	31
3.2.4. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	32

3.2.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü.....	33
3.2.6. BCA Enziminin Aktivitesini Yarıya Düşüren İnhibitör Konsantrasyonunun (IC ₅₀) Hesaplanması	34
3.2.7. Cheng&Prusoff Denklemiyle İnhibisyon Sabitlerinin (K _i) Hesaplanması ...	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. Protein miktar Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	36
4.2. Kantitatif Protein Tayini İle Tespit Edilen BCA Enzimi Protein Miktarı	36
4.3. BCA Enziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Safsızlık Kontrolü	36
4.4. Enzimin Saflaştırılması	37
4.4.1. Hemolizatın Afinite Kolonuna Yüklenmesi ve Enzimin Elüsyonu.....	38
4.4.2. BCA Enzimine Ait Aktivite Çalışmaları ve Elde Edilen Veriler	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
5.1. Sonuçlar	79
6. KAYNAKLAR	82
EKLER	89
ÖZGEÇMİŞ	90

TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	18
Tablo 3.1. Orijinal oksadiazol türevlerinin kodları ve isimleri	22
Tablo 3.2. Bisoksadiazol süstitüye sülfonamid bileşiklerin sentezi	23
Tablo 3.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	34
Tablo 4.1. BCA Enzimi Protein Miktarı	36
Tablo 4.2. BCA enzim aktivitesi üzerine 6a bileşiminin etkisi	39
Tablo 4.3. BCA enzim aktivitesi üzerine 6b bileşiminin etkisi	41
Tablo 4.4. BCA enzim aktivitesi üzerine 6c bileşiminin etkisi	43
Tablo 4.5. BCA enzim aktivitesi üzerine 6d bileşiminin etkisi	45
Tablo 4.6. BCA enzim aktivitesi üzerine 6e bileşiminin etkisi	47
Tablo 4.7. BCA enzim aktivitesi üzerine 6f bileşiminin etkisi	49
Tablo 4.8. BCA enzim aktivitesi üzerine 6g bileşiminin etkisi	51
Tablo 4.9. BCA enzim aktivitesi üzerine 6h bileşiminin etkisi	53
Tablo 4.10. BCA enzim aktivitesi üzerine 6i bileşiminin etkisi	55
Tablo 4.11. BCA enzim aktivitesi üzerine 6j bileşiminin etkisi	57
Tablo 4.12. BCA enzim aktivitesi üzerine 6k bileşiminin etkisi	59
Tablo 4.13. BCA enzim aktivitesi üzerine 6l bileşiminin etkisi	61
Tablo 4.14. BCA enzim aktivitesi üzerine 6m bileşiminin etkisi	63
Tablo 4.15. BCA enzim aktivitesi üzerine 6n bileşiminin etkisi	65
Tablo 4.16. BCA enzim aktivitesi üzerine 6o bileşiminin etkisi	67
Tablo 4.17. BCA enzim aktivitesi üzerine 6p bileşiminin etkisi	69
Tablo 4.18. BCA enzim aktivitesi üzerine 6r bileşiminin etkisi	71
Tablo 4.19. BCA enzim aktivitesi üzerine 6s bileşiminin etkisi	73
Tablo 4.20. BCA enzim aktivitesi üzerine 6t bileşiminin etkisi	75
Tablo 4.21. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren orijinal sentez oksadiazol türevlerinin IC ₅₀ değerleri ve Cheng&Prusoff denklemine göre hesaplanmış K _i değerleri.....	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Oksadiazol yapıya sahip farklı dört izomerin gösterimi.....	1
Şekil 1.2. Çeşitli aldehit hidrazon bileşiklerinden 1,3,4-oksadiazol türevli bileşiklerin sentezi	3
Şekil 1.3. Diaçilhitrazit bileşiğinin tiyonil klorür bileşiği ile reaksiyonundan 1,3,4-oksadiazol sentezi.....	3
Şekil 1.4. 5-(4-metoksifenol)-2-amino-1,3,4-oksadiazol bileşiğinin sentezlenme reaksiyonu	3
Şekil 1.5. 2-amino-5-(1-/2-naftiloksümetil)-1-3-4-oksadiazol bileşiğinin sentezlenme reaksiyonu	4
Şekil 1.6. 2-(2-naftiloksümetil)-5-sübstitüeamino-1,3,4-oksadiazol türevli bileşiğin Sentezi	4
Şekil 1.7. 4-sübstitüe tiyosemikarbazit bileşiğinin civa oksit bileşiği ile reaksiyonu ...	4
Şekil 1.8. Hidrazit türevli bileşiğin karboksilik asit türevli bileşik ile reaksiyonu	5
Şekil 1.9. 5-alkil ve 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazol türevli bileşiklerin sentezi	5
Şekil 1.10. (E)-1-benzotriazol-1-il-3-fenil-propenon bileşiğinin benzoik asit hidrazit bileşiği ile reaksiyonu	5
Şekil 1.11. Hidrazit türevli bileşik ve ester türevli bileşiğin reaksiyonu	6
Şekil 1.12. Elektrohalkalaşma ile 1,3,4-oksadiazol türevli bileşiğin sentezi	6
Şekil 1.13. Benzoik benziliden-hidrazit bileşiğinden türetilen 1,3,4-oksadiazol Türevli bileşiğin sentezi	6
Şekil 1.14. Diaçil hidrazit türevli bileşiklerin sülfürik asit ile reaksiyonu	7
Şekil 1.15. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	9
Şekil 1.16. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	9
Şekil 1.17. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	10
Şekil 1.18. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi	10
Şekil 2.1. Karbonik anhidraz enzimi yapısı	11
Şekil 2.2. CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi	13
Şekil 2.3. Sülfonamidlerin Genel Yapısı.....	15
Şekil 2.4. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması.....	16
Şekil 2.5. P-nitrofenilasetatin hidroliz reaksiyonu.....	17
Şekil 2.6. CA enziminin CO ₂ ⁻ hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.7. Glokom hastalığına yakalanmış ve glokom evrelerini gösteren bir göz örneği.....	20
Şekil 3.1. 4-Sülfonilamid ester (2), 4-Sülfonilamidbenzohidrazid (3), 4-(5-(4 siyanofenil)-1.3.4 oksadiazol-2-yl)-benzen-sülfonamid (4), (E)-N'-hidroksi-4 (5(4 sülfamoylfenil)-1,3,4-oksadiazol-2 yl)benzimidamid (5), açıl sübstitüye 4(hidrazin karbonil) benzen sülfonamid türevlerinin (6a-t) genel sentez prosedürü.....	23
Şekil 3.2. Sepharose-4B jeli reaksiyon mekanizması.....	30
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	36
Şekil 4.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan BCA enziminin SDS-polakrilamid Jel elektroforezi görüntüsü. (Soldan sağa sütun-A); moleküler markerlar [(baştan sona);70 kDa, 57 kDa, 40 kDa, 28 kDa, 18 kDa], (sütun B); sığır karbonik anhidraz(29kDa).....	37

Şekil 4.3. 6a kodlu bileşige ait %Aktivite-[6a] grafiği.....	40
Şekil 4.4. 6b kodlu bileşige ait %Aktivite-[6b] grafiği	42
Şekil 4.5. 6c kodlu bileşige ait %Aktivite-[6c] grafiği.....	44
Şekil 4.6. 6d kodlu bileşige ait %Aktivite-[6d] grafiği	46
Şekil 4.7. 6e kodlu bileşige ait %Aktivite-[6e] grafiği.....	48
Şekil 4.8. 6f kodlu bileşige ait %Aktivite-[6f] grafiği.....	50
Şekil 4.9. 6g kodlu bileşige ait %Aktivite-[6g] grafiği	52
Şekil 4.10. 6h kodlu bileşige ait %Aktivite-[6h] grafiği	54
Şekil 4.11. 6i kodlu bileşige ait %Aktivite-[6i] grafiği	56
Şekil 4.12. 6j kodlu bileşige ait %Aktivite-[6j] grafiği	58
Şekil 4.13. 6k kodlu bileşige ait %Aktivite-[6k] grafiği	60
Şekil 4.14. 6l kodlu bileşige ait %Aktivite-[6l] grafiği	62
Şekil 4.15. 6m kodlu bileşige ait %Aktivite-[6m] grafiği	64
Şekil 4.16. 6n kodlu bileşige ait %Aktivite-[6n] grafiği	66
Şekil 4.17. 6o kodlu bileşige ait %Aktivite-[6o] grafiği	68
Şekil 4.18. 6p kodlu bileşige ait %Aktivite-[6p] grafiği	70
Şekil 4.19. 6r kodlu bileşige ait %Aktivite-[6r] grafiği.....	72
Şekil 4.20. 6s kodlu bileşige ait %Aktivite-[6s] grafiği	74
Şekil 4.21. 6t kodlu bileşige ait %Aktivite-[6t] grafiği	76
Şekil 4.22. 6a→t kodlu bileşiklere ait %Aktivite-[6a→t] grafiği	77

KISALTMALAR VE SİMGELERLİSTESİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
CA	: Karbonik anhidraz enzimi (Carbonic Anhydrase)
BCA	: Sığır karbonik anhidraz enzimi (Bovine Carbonic Anhydrase)
HCA	: İnsan karbonik anhidraz enzimi (Human Carbonic Anhydrase)
E.C.	: Enzim kod numarası (Enzyme Commission)
M	: Molarite
g	: Gram
L	: Litre
mL	: Mililitre
kDA	: Kilodalton
RNA	: Ribonükleik Asit
UV	: Ultraviyole
rpm	: Devir/Dakika
K_m	: Michaelis-Menten Sabiti
V_{max}	: Maksimum Hız
nm	: Nanometre
K_i	: İnhibisyon sabiti

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI OKSADİAZOL SÜBSTİTÜYE TÜREVLİ BİLEŞİKLERİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE *in vitro* ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Abdulkaki EYBEK

Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan KAYA

2019, 89 + xi 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 absorbans 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 IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. Diğer inhibisyon sabiti olan K_i değerleri ise Cheng&Prusoff denklemi yardımıyla matematiksel olarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: İnhibisyon, *in vitro*, IC₅₀, Karbonik Anhidraz, Oksadiazol,

ABSTRACT

MS THESIS

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

Abdulkali EYBEK

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, 89 + xi 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 3rd 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 data obtained from experimental studies. The other inhibition constant, Ki, was calculated mathematically with the help of the Cheng&Prusoff equation.

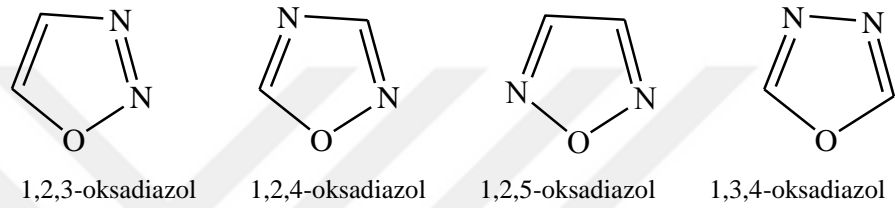
Keywords: Inhibition, *in vitro*, IC₅₀, Carbonic Anhydrase, Oxadiazole.

1. GİRİŞ

1.1. Oksadiazoller

1.1.1. Oksadiazollerin Genel Yapıları ve Adlandırılmaları

Genel formülleri $C_2H_2ON_2$ şeklinde olan, yapılarında bir oksijen ve iki azot atomu bulunan beş üyeli halka sistemine sahip bileşiklerdir. Oksadiazoller, eski literatür kaynaklarında furadiazoller olarak da adlandırılırlar ve dört farklı izomere sahiptirler. Bunlar; 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5- ve 1,3,4-oksadiazol olarak isimlendirilirler (Şekil 1.1.) [Başaran, 2011; Rajak ve ark., 2011].



Şekil 1.1. Oksadiazol yapıya sahip farklı dört izomerin gösterimi [Rajak ve ark., 2011]

1,2,4-oksadiazol, 1,2,5-oksadiazol, ve 1,3,4-oksadiazol bileşikleri bilinen oksadiazollerdendir. Fakat 1,2,3-izomeri kararsız bir yapıya sahiptir ve diazoketon tautomerine dönüşür. Kararlı yapıya sahip olan diğer oksadiazoller ise birçok ilacın içerisinde bulunmaktadır.

Halka sistemindeki azot kolayca protonlanır ve protonlanmış 1,3,4-oksadiazol türevleri elektrofilik saldırılara daha dayanıklıdır. Genellikle 2,5-disübsitüe-1,3,4-oksadiazol türevleri kararlı olma isteğindedir. Özellikle 2,5-diaril-1,3,4-oksadiazol türevleri 2,5-dialkil-1,3,4-oksadiazol türevlerinden daha kararlı yapıdadır [Kulkarni ve ark., 2010; Başaran 2011].

Oksadiazollerin yüksek hidrolitik ve metabolik kararlı yapıda olmaları, farmakokinetik davranışları ve gözlemlenen *in vivo* etkileri bu bileşiklerin ilaç endüstrisi yönünden önemli bir yere taşınmalarını sağlamıştır. İlaç kimyasında önemli rol oynadıklarından dolayı kimyacılar tarafından yakından incelenmektedir. Oksadiazoller ilaç araştırmalarında birçok farklı amaçla kullanılmaktadır. Bazı durumlarda farmakoforların asıl kısımlarını, bazı durumlarda da ligantlarla bağlantıyı sağlayan bölümlerini oluşturmaktadır. Genellikle karbamatlar, esterler, amidler gibi karbonil grubu içeren bileşiklerin yerine geçebilmektedirler [Boström ve ark., 2011; Arslantaş, 2013].

1.1.2. 1,2,4-Oksadiazoller

1,2,4-oksadiazol halkası içeren doğal ve sentetik bileşikler benzersiz kimyasal yapıları ve tirozin kinaz inhibitörü, muskarinik agonist, histamin H3 antagonist, antitümör ve monoamin oksidaz inhibitörü gibi geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinden dolayı son zamanlarda araştırmacıların ilgisini çekmiştir [Bezerra ve ark., 2005; Kemnitzer ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2009].

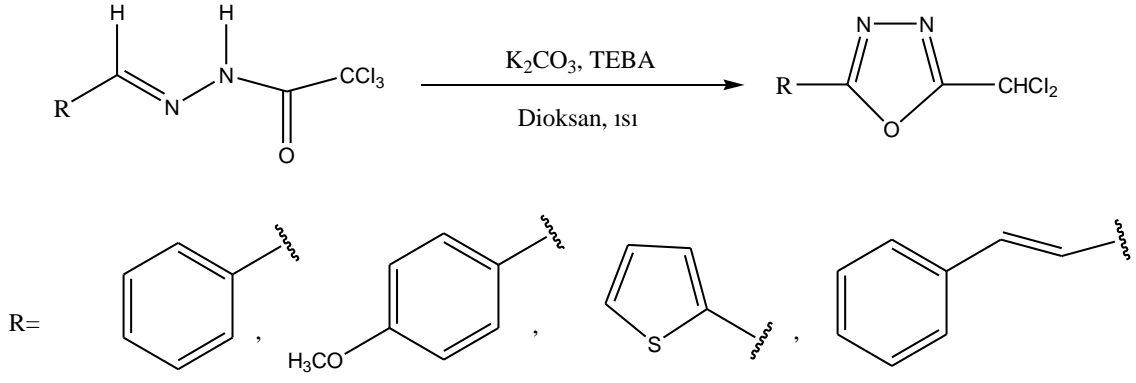
Bunun yanısıra, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, aneljezik, fungusid, herbisid, diüretik, anti-helmintik ve sitotoksik aktiviteleri de literatürde kayıt edilmiştir [Leite ve ark., 2000; Anjos ve ark., 2009].

Ayrıca, 1,2,4-oksadiazoller, esterler ve amidler için önemli biyoizosterler olup bu grupların bir heterohalka ile yer değiştirmesi bunların biyolojik aktivitelerini de arttırmıştır. Bu nedenle peptit kimyasında ve peptidomimetiklerin geliştirilmesinde uygulama olanağı elde edilmiştir [De Freitas ve ark., 2007; Jakopin ve ark., 2007; Sureshbabu ve ark., 2008].

1,2,4-oksadiazol bileşiklerinin farmakolojik önemi üzerinde çokça durulmasının yanında son yıllarda artan çalışmalar bu bileşik sınıfının lüminesant sıvı kristaller, optik cihazlar için uygun materyaller ve organik light-emitting diyodes (OLEDs) için yük taşıyıcı olarak da uygulama alanı bulduğunu göstermiştir [Oyston ve ark., 2005; Parra ve ark., 2006; Gallardo ve ark., 2008; Arslantaş, 2013].

1.1.3. 1,3,4-Oksadiazol Türevlerinin Sentezlenme Yöntemleri

Kaim ve arkadaşları; 1998 yılındaki çalışmalarında çeşitli aldehit hidrazonları, faz transfer şartları altında potasyum karbonat ile etkileştirmeleri sonucunda tek basamakta yeni 1,3,4-oksadiazol türevlerini sentezleyebilmişlerdir (Şekil 1.2.) [Kaim ve ark., 1998].



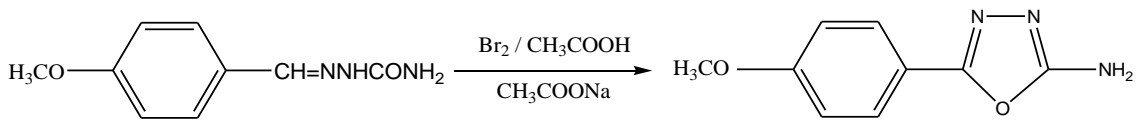
Şekil 1.2. Çeşitli aldehit hidrazon bileşiklerinden 1,3,4-oksadiazol türevli bileşiklerin sentezi [Kaim ve Ark., 1998]

Ayrıca, araştırmacılar bu çalışmada diaçilhidrazitlerin tiyonil klorür ile geri soğutucu altında ve piridin katalizörlüğünde ısıtılması yöntemiyle de 1,3,4-oksadiazol türevlerini sentezlemişlerdir (Şekil 1.3) [Kaim ve ark., 1998].



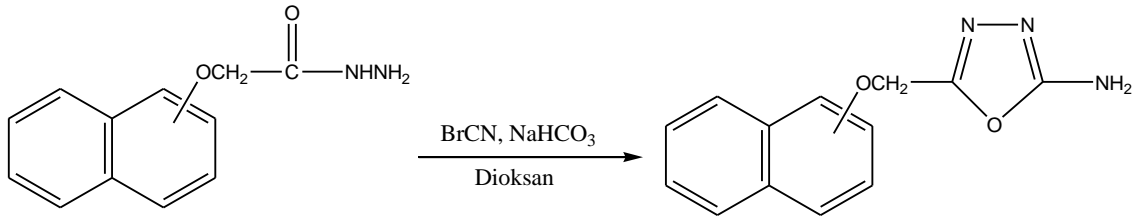
Şekil 1.3. Diaçilhidrazit bileşiğinin tiyonil klorür bileşiği ile reaksiyonundan 1,3,4-oksadiazol sentezi [Kaim ve ark., 1998]

Kocabalkanlı ve arkadaşları; 4-metoksibenzaldehit semikarbanozu glasiyal asetik asit içerisinde, susuz sodyum asetat ve brom ile karıştırarak 5-(4-metoksifenol)-2-amino-1,3,4-oksadiazol bileşiğini elde etmişlerdir (Şekil 1.4.) [Kocabalkanlı ve ark., 2001].



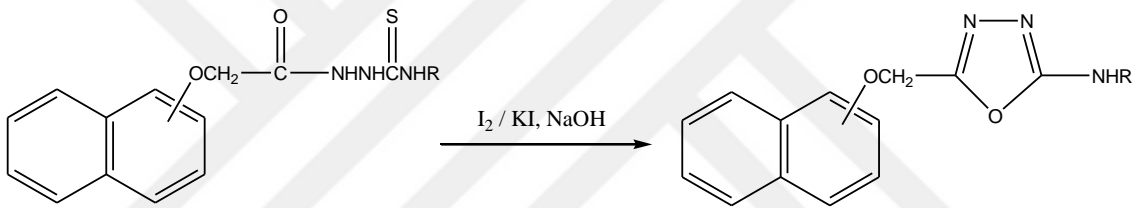
Şekil 1.4. 5-(4-metoksifenol)-2-amino-1,3,4-oksadiazol bileşiğinin sentezlenme reaksiyonu [Kocabalkanlı ve ark., 2001]

Şahin ve arkadaşları; 1-/2-naftiloksiasetil hidrazin türevini dioksan içerisinde çözdükten sonra oluşan çözeltinin içerisine sodyum bikarbonat ve bromosiyanyür katarak dört saat oda sıcaklığında karıştırarak 2-amino-5-(1-/2-naftiloksimetil)-1-3-4-oksadiazol türevini elde etmişlerdir (Şekil 1.5.) [Şahin ve ark., 2002].



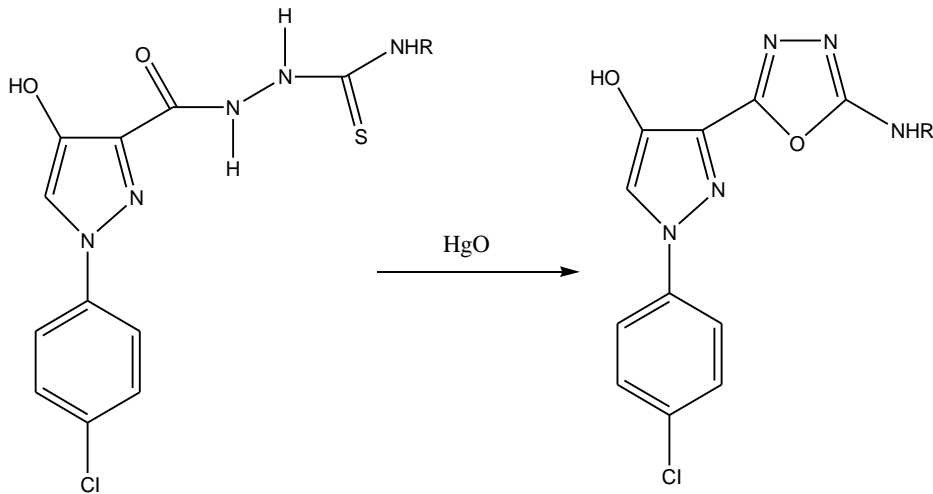
Şekil 1.5. 2-amino-5-(1/2-naftiloksümetil)-1-3-4-oksadiazol bileşiğinin sentezlenme reaksiyonu [Şahin ve ark., 2002]

Palaska ve arkadaşları; çalışmalarında 1-(2-naftiloksiasetil)-4-süstitüe tiyosemikarbazit türevli bileşiklerine etanollü ortamda 4N sodyum hidroksit çözeltisinden ve %5 iyotlu potasyum iyodür çözeltisinden renk değişimi gözleninceye kadar ekleyerek ve oda sıcaklığında karıştırarak 2-(2-naftiloksümetil)-5-süstitüeamino-1,3,4-oksadiazol türevli bileşikleri sentezlemiştirler (Şekil 1.6.) [Palaska ve ark., 2002].



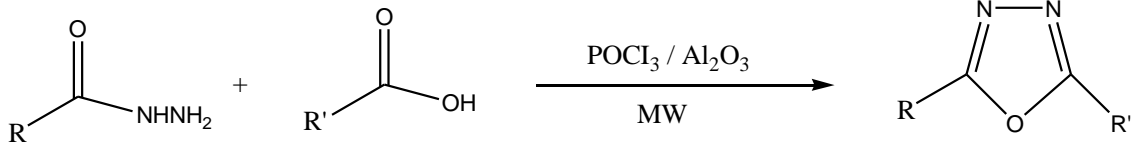
Şekil 1.6. 2-(2-naftiloksümetil)-5-süstitüeamino-1,3,4-oksadiazol türevli bileşiğinin sentezi [Palaska ve ark., 2002]

Rostom ve arkadaşları; sentezledikleri 4-süstitüe tiyosemikarbazitleri etanol ortamında civa oksit ile ısıtarak halkalaşma reaksiyonu sonucu 1,3,4-oksadiazol türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 1.7.) [Rostom ve ark., 2003].



Şekil 1.7. 4-süstitüe tiyosemikarbazit bileşiğinin civa oksit bileşiği ile reaksiyonu [Rostom ve ark., 2003]

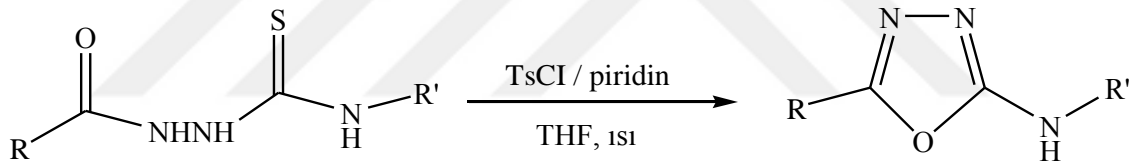
Khan ve arkadaşları; mikrodalga tekniğini kullanarak hidrazit türevlerini farklı karboksilik asitler ile fosfor oksiklorür varlığında mikrodalga ışığına tutarak kısa sürede 2,5-disübstitüe-1,3,4-oksadiazol türevli bileşikleri elde etmeyi başarmışlardır (Şekil 1.8) [Khan ve ark., 2004].



R= 3-Piridinil

Şekil 1.8. Hidrazit türevli bileşiğin karboksilik asit türevli bileşik ile reaksiyonu [Khan ve ark., 2004]

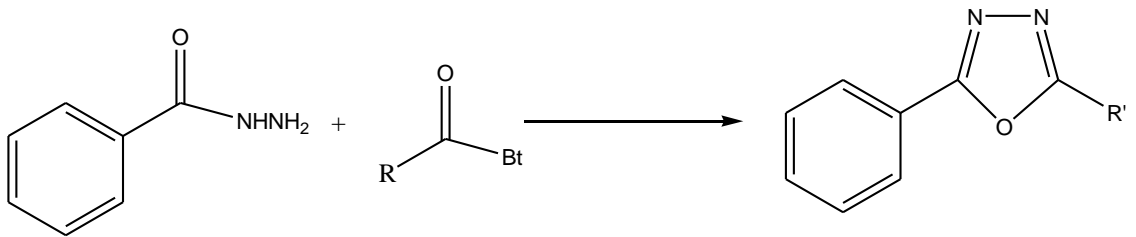
Dolman ve arkadaşları; sübstitüe tiyosemikarbazite piridin katalizörlüğünde THF (tetra hidrofuran) ortamında p-toluen sülfoniklorürü ekleyerek geri soğutucu altında 20 saat ısıtarak 5-alkil ve 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazol türevli bileşikleri elde etmişlerdir (Şekil 1.9) [Dolman ve ark., 2006].



R= alkil, aril R'= alkil, aril

Şekil 1.9. 5-alkil ve 5-aril-2-amino-1,3,4-oksadiazol türevli bileşiklerin sentezi [Dolman ve ark., 2006]

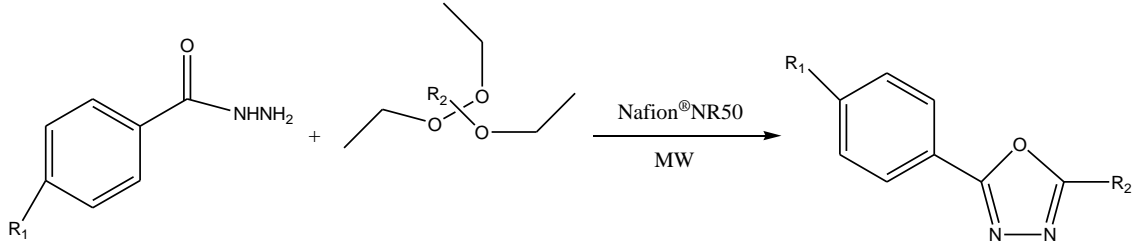
Katritzky ve arkadaşları; çalışmalarında (E)-1-benzotriazol-1-il-3-fenil-propenon ve benzoik asit hidraziti diklorometan içerisinde oda sıcaklığında karıştırarak sodyum hidrür katarak gerçekleştirdikleri tepkime sonucu 1,3,4-oksadiazol türevini elde etmişlerdir (Şekil 1.10) [Katritzky ve ark., 2008].



Bt= benzotriazol-1-il

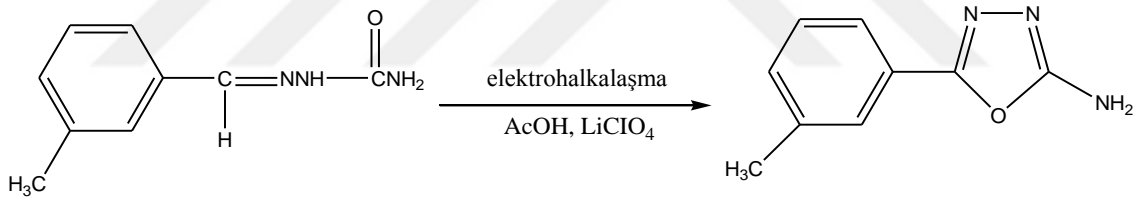
Şekil 1.10. (E)-1-benzotriazol-1-il-3-fenil-propenon bileşiğinin benzoik asit hidrazit bileşiği ile reaksiyonu [Katritzky ve ark., 2008].

Polshettiwar ve Varma; çeşitli hidrazitleri, trietil ortoformat, trietil ortoproponat ve trietil ortobenzoatlar ile Nafion®NR50 katalizörlüğünde mikrodalga ışığına tutarak 1,3,4-oksadiazol türevli bileşikleri elde etmişlerdir (Şekil 1.11) [Polshettiwar ve Varma, 2008].



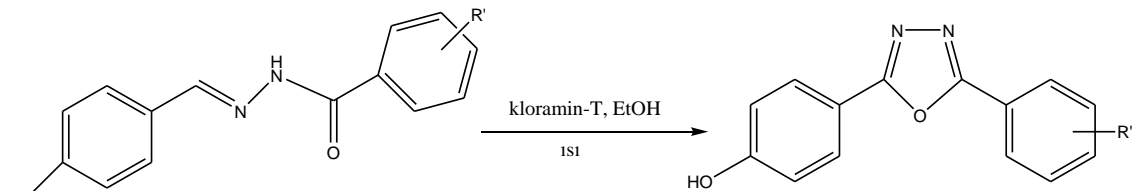
Şekil 1.11. Hidrazit türevli bileşik ve ester türevli bileşiğin reaksiyonu [Polshettiwar ve Varma, 2008]

Kumar; sentezlemiş olduğu semikarbazon türevini, lityum perklorat ve asetik asit içerisinde bir platin tabaka ve kalomel doymuş elektrot kullanarak oluşturulan hücre içerisinde oluşan elektrohalkalaşma ile 1,3,4-oksadiazol türevli bileşikleri elde etmiştir (Şekil 1.12) [Kumar, 2010].



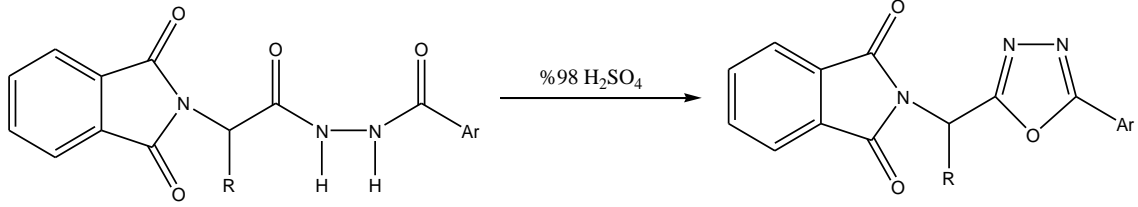
Şekil 1.12. Elektrohalkalaşma ile 1,3,4-oksadiazol türevli bileşiğin sentezi [Kumar, 2010]

Shailaja ve arkadaşları; benzoik benziliden-hidrazite etanol ortamında kloramin-T ekleyerek geri soğutucu altında 5 saat ısıtarak 1,3,4-oksadiazol türevlerini elde etmişlerdir (Şekil 1.13) [Shailaja ve ark., 2010].



Şekil 1.13. Benzoik benziliden-hidrazit bileşiğinden türetilen 1,3,4-oksadiazol türevli bileşiğin sentezi [Shailaja ve ark., 2010]

Foroughifar ve arkadaşları; diaçil hidrazit türevli bileşiklerin %98'lik sülfürik asit içerisinde halkalaşması sonucu ile 1,3,4-oksadiazol türevli bileşikleri elde etmişlerdir (Şekil 1.14) [Foroughifar ve ark., 2010].



R= H, CH₃, (CH₃)₂CH, PhCH₂ Ar= 3-piridil, 4-piridil

Şekil 1.14. Diaçil hidrazit türevli bileşiklerin sülfürik asit ile reaksiyonu [Foroughifar ve ark., 2010]

1.2. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına olanak tanımadan spesifik olarak % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörler olup, katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu dışındaki bütün enzimler protein yapısındadırlar. Enzimler genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı özellikte olan reaksiyonları katalizler [Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Tunca, 2012]. Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 1015 ile 1020 kat daha hızlıdırlar. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne dönüştürebilme gücüne sahiptir [Champe ve Harvey, 1997; Bozkurt, 2012]. Aynı organizmada aynı reaksiyonları katalizledikleri halde molekül yapıları bakımından farklılık gösterebilen enzimler de vardır. Bunlara ise izoenzimler veya izozimler adı verilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı, substratlarına karşı ilgileri değişik olabilir. İzoenzimlere örnek olarak karbonik anhidraz enzimi verilebilir. Öyleki bu enzimin on altı tane izoenzimi olduğu, yapılan çalışmalarla literatürden bilinmektedir [Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Kalaycıoğlu ve ark., 2006; Tunca, 2012].

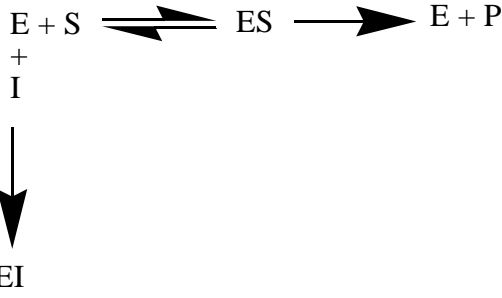
Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nce (IUBMB) sistematik olarak isimlendirilmiştir. Bu isimlendirme sistemine göre enzimler altı ana sınıfa ayrılmış ve sırasıyla, oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olarak belirlenmiştir. Bunlar da, kendi içinde alt gruplara ayrılmıştır. 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 hidroliyazdır" [Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Tunca, 2012].

- 1. Oksidoredüktazlar:** İki substrat arasında redoks (elektron transferi) tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Bu grup enzimler dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar, peroksidazlar olarak da bilinen enzimlerdir.
- 2. Transferazlar:** İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini gerçekleştiren enzimlerdir. Fosforil grubu transferini sağlayan kinaz enzimleri bu grupta yer alır.
- 3. Hidrolazlar:** Bir su molekülünün katılması suretiyle ester, eter, peptid, glikozit, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının parçalandığı hidroliz reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler, 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.

1.2.1. Enzim İnhibisyonu

Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması veya yok edilmesine “inhibisyon” denir. Bu olayı gerçekleştiren bileşiklere “inhibitör” adı verilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, önemli bir olaydır [Kuzucu, 2011].

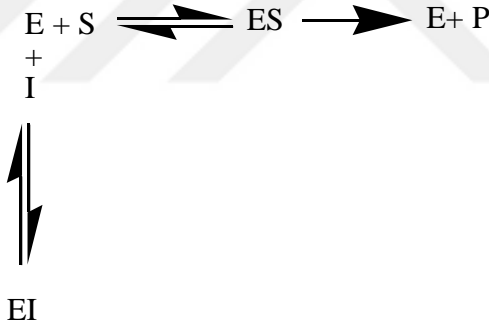
Enzim inhibisyonu dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitörler bir enzimle birleşen veya enzimin aktivitesi için temel olan bir işlevsel grubu bozan veya özellikle kararlı bir yapı meydana getiren bileşiklerdir. Dönüşümsüz inhibitör ve enzim arasında sıklıkla kovalent bağlanmanın oluşumuna rastlanır (Şekil 1.15) [İnan ve Gül 2001; Lehninger, 2005; Tunca, 2012].



Şekil 1.15. Dönüşümsüz inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

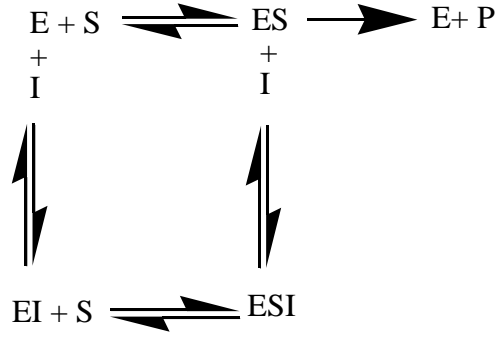
Dönüşümlü inhibisyonda ise enzim ile inhibitörün etkileşmesi arasında bir denge söz konusudur. Dönüşümlü inhibisyon; yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyon ve lineer karışık tip inhibisyon olmak üzere dört çeşittir [Keha ve Küfrevioğlu,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

Yarışmalı inhibitör substrat için K_m değerini artırmada rol oynar. İnhibitör konsantrasyonu arttıkça K_m değeri de artar. V_{max} değeri değişmeden kalır, ancak yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} değerine ulaşabilmek için daha yüksek substrat konsantrasyonu gereklidir (Şekil 1.16) [Sly ve Hu, 1995; Supuran ve ark., 2001].



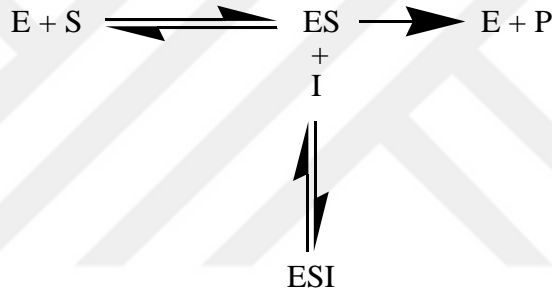
Şekil 1.16. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

Yarışmasız inhibisyonda inhibitör ve substrat, enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Dolayısıyla bağlanma enzimin aynı bölgesinde değildir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_m sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir (Şekil 1.17) [Keha ve Küfrevioğlu, 2004].



Şekil 1.17. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

Yarı yarışmalı enzim inhibisyonunda ise inhibitör inaktif ESI kompleksi vermek üzere enzim-substrat kompleksine dönüşümlü olarak bağlanır, serbest enzime bağlanamaz. Tek reaktantlı sistemlerde nadir görülür. Daha çok birden fazla reaktant içeren sistemlerde görülür (Şekil 1.18) [Segel, 1976].



Şekil 1.18. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi

Lineer karışık tip inhibisyon türü yarışmasız inhibisyonun özel bir tipidir. Bu inhibisyon substratın EI kompleksine bağlanabildiği zaman gerçekleşir. Her iki durumda da inaktif ESI kompleksi oluşur.

Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilen birçok kimyasal maddenin, çeşitli hastalıkların tedavisinde ve ilaç yapımında potansiyel birer aday molekül olarak kullanıldığı uzun yıllardan beri bilinmektedir. Enzim inhibitörlerinin de bu konuda önemli bir yer edindiği tarafımızca düşünüldüğünden, çalışmamızda çeşitli organik kimyasal maddelerin karbonik anhidraz enzimi üzerine *in vitro* etkileri araştırılmıştır.

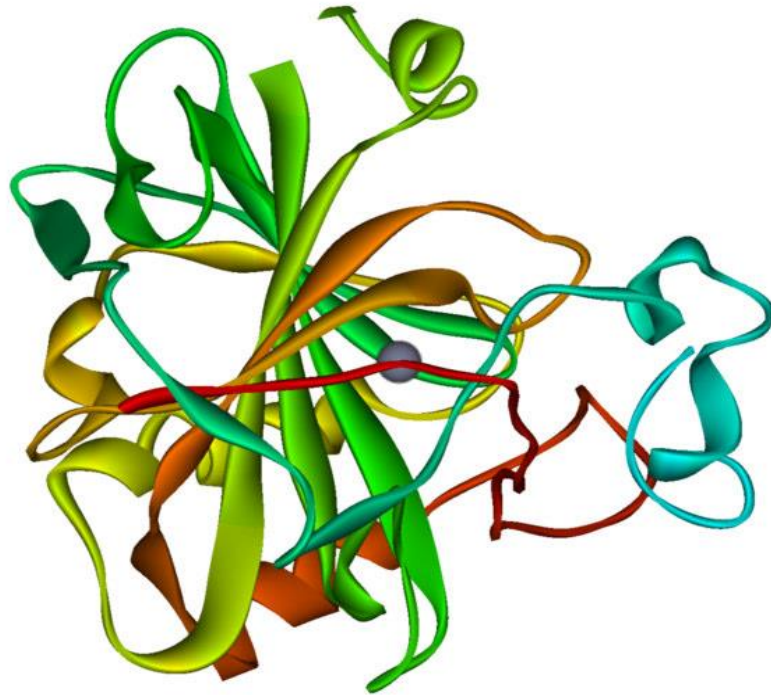
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi (CA; EC: 4.2.1.1)

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton tarafından ilk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen ve bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan, aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren canlılarda CO_2 'nin hidrasyonu ve HCO_3^- 'ün dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir metaloenzimdir [Dökmeçi, 1992; Supuran ve Scozzafava, 2001; Şahin 2008].



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiş olup daha sonraki yıllarda; insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlelerinin 30 kDa civarında olduğu tespit edilmiştir [Feldstein ve Silverman, 1984; Krungkrai ve ark., 2001; Beydemir ve ark., 2002; Yazıcıoğlu, 2013].



Şekil 2.1. Karbonik anhidraz enzimi yapısı [Lindskog, 1997]

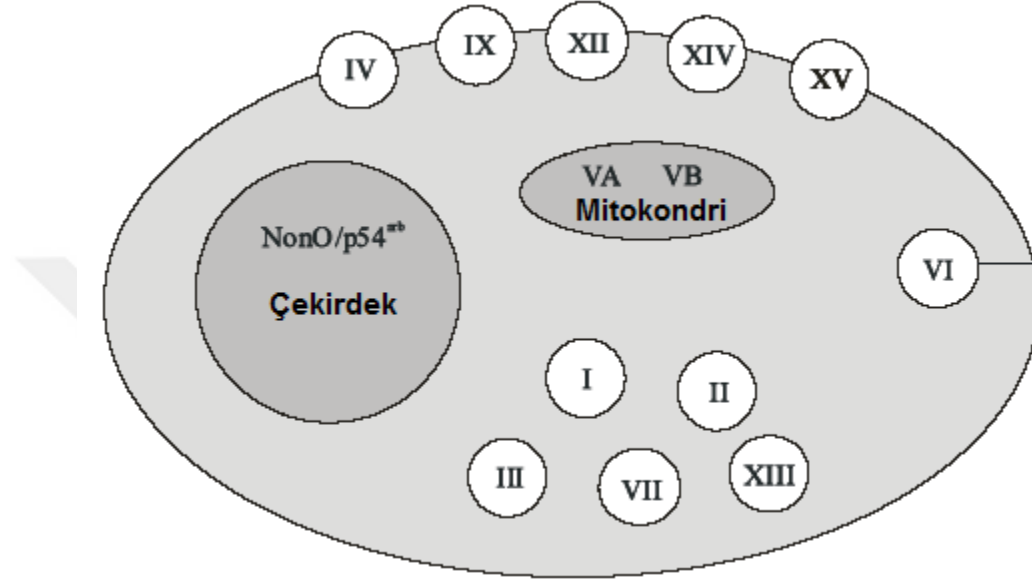
Karbonik anhidraz enzimi eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak görev yapmaktadır. Başta asit-baz dengesi olmak üzere birçok metabolik olayda rol oynadığı bilinmektedir. Doku/organlar ile akciğer arasındaki $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO_2 homeostazında, biyosentetik reaksiyonlarda (glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi), kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik olayda görev almaktadır [Supuran ve Scozzafava, 2000; Yazıcıoğlu, 2013].

Canlı metabolizmasının önemli bir metaboliti olan CO_2 'nin çevresel konsantrasyonunun yüksek olması nadiren görülür. Ayrıca CO_2 , karbonik asit ve bikarbonat oluşumu ile dengededir. Bikarbonat negatif yüklüdür ve sulu çözeltilerde yüksek bir çözünürlüğe sahip olmasına rağmen, lipitlerde çözünürlüğü çok azdır. CO_2 'nin ise hem sulu çözeltilerde hem de lipitlerde çözünürlüğü yüksektir. Bu sebeple CO_2 çok kolay şekilde hücre içine ve dışına difüze olurken, bikarbonatın hücre membranından geçmesi için taşınması gerekmektedir. pH: 6.3'ün üzerinde, CO_2 ve HCO_3^- arasındaki denge HCO_3^- 'a doğru kayar ve böylece hücre içinde ihtiyaç duyulan CO_2 ve HCO_3^- konsantrasyonlarının sürdürülebilmesinde bazı sorunlar oluşur. Fizyolojik pH'da CO_2 'nin HCO_3^- 'e dönüşümü çok yavaş olur ve enzim tarafından katalizlenmesi gerekmektedir. CO_2 'nin HCO_3^- 'e çevrimi CO_2 'nin hücre içinde tutulmasında önemli iken, HCO_3^- 'ün CO_2 'ye çevrimi ise bikarbonatın hücre içine girişini kolaylaştırır. Böylece, enzimatik olarak CO_2 ve HCO_3^- 'ün çevrilmesi yalnızca hücrel enzimlerin ihtiyaç duydukları seviyede hücrenin CO_2 miktarını artırmasında değil, ayrıca hücrel işlemlerin başarılabilmesi için uygun hücre içi CO_2 ve HCO_3^- seviyelerinin devamında da hücreye yardımcı olur. İşte, CO_2 ve HCO_3^- 'ün birbirlerine çevrilmesi reaksiyonlarını katalizleyen enzim karbonik anhidrazdır [Smith ve Ferry, 2000; Yazıcıoğlu, 2013].

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve kimyasal yapıları farklı olan enzimlere izoenzim denilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı olup, substrat, kofaktör ve inhibitörlere karşı afiniteleri değişik olabilirler [Keha ve Küfrevioğlu, 2009].

Hayvanlar aleminde karbonik anhidraz enziminin 16 izoenzimi tespit edilmiştir. Bunlardan 12 tanesinin katalitik olarak aktif olduğu saptanmıştır. Karbonik anhidraz izoenzimleri hücrel dağılımları, kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık göstermektedirler [Beydemir ve ark., 2000]. Bu izoenzimlerden; CA I, II, III, VII ve XIII'ün sitoplazmik, CA VA, VB'nin mitokondriyal, CA VI'nın salgısal, CA IV,

IX, XII ve XIV'ün membrana bağlı, CA VIII, X, XI'in ise nonkatalitik olduğu tespit edilmiştir. CA-XV'in ise katalitik aktivitesinin düşük olduğu ve CA-IV ile benzer özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin ise tümör ilişkili izoenzimler olduğu belirtilmiştir [Tashian ve ark., 1983; Dodgson ve ark., 1991; Supuran, 2010].



Şekil 2.2. CA izoenzimlerinin hücredeki lokalizasyonlarının şematik gösterimi [Leppilampi, 2006]

2.1.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi

CA enzimi çeşitli biyosentetik reaksiyonlar için gerekli olan CO_2 'nin HCO_3^- 'e geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizler. CA'nın katalizlediği CO_2 hidrasyonu dışındaki reaksiyonlar fizyolojik öneme sahip olmadığı için sadece bir reaksiyonunun bu enzimi ilgilendiren fizyolojik öneme sahip olduğu öngörülebilir. CA'ların fizyolojik fonksiyonu son 70 yıldır yoğun bir şekilde araştırılmıştır ancak metaloenzimlerin bu büyük sınıfı hakkında halen bilinmesi gerekenler vardır [Supuran ve Scozzafava, 2007].

CA'ın hayvan, bitki ve bakterilerde iyon değişimi, asit-baz dengesi, elektrolit sekresyonu, üre döngüsü ve glukoneojenez gibi metabolik yollar için öncül maddelerin sentezlenmesi gibi fizyolojik ve metabolik olaylarda önemli görevi olduğu bildirilmiştir [Wilbur ve Saleuddin 1983; Sultemeyer ve ark., 1993; Badger ve Price, 1994; Sly ve Hu, 1995; Smith ve ark., 1999]. CA, hayvan metabolizmasında özellikle eritrositleri olmak üzere birçok dokuda pH düzenleyicisi olarak görev alır [Parui ve ark., 1991]. CA'ın bitkilerde de kloroplastik pH'ların düzenlenmesinde rol aldığı ve değişken

durumlardaki pH değişimlerinden meydana gelebilecek denatürasyonlardan koruduğu belirtilmiştir [Reed ve Graham, 1981].

İnsanda yedi farklı CA izoenzimin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonları akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium gibi doku ve organlara göre farklılıklar gösterdiği belirtilmiş olup CA enzimlerinin etkinlikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırmalar neticesinde ise çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO₂ ve pH dengesinin sağlanması yanı sıra, kemik erimesi, kireçlenme, tümör oluşumu gibi fizyolojik olaylarda da oldukça etkili oldukları belirtilmiştir [Hewett-Emmett, 2000; Sugrue, 2000]. Bu süreçte çoğunlukla izoenzim I, II ve IV rol almaktadırlar. CA II ve CA IV izoenzimleri görme, göz tansiyonu ve glokomaya yol ačan görme bozuklukları ile de ilgilidirler. hCA II ayrıca kemik tümörlerinin bir birinden ayrılması veya kemik tümörlerinde kemik erimesi gibi kemik gelişimi ve kemik fonksiyonları konusunda da rol oynar. CA'lar, kalp-damar formasyonu gibi pek çok doku ve organda, gözün damar tabakası ve göz sinirlerindeki pH'ı düzenleme, bikarbonat sağlama, elektrolit salgılama olaylarını da gerçekleştirir. CA'lar kanal hücrelerinde salgı üretimi, mide cidarında gastrik asit üretimi ve safra üretimi, pankreas özsuyu, bağırsak iyonu, tad ve koku alma duyusu, mide-bağırsak yolunu aşırı pH şartlarından korunması, prostat sıvısının pH ve bikarbonat konsantrasyonu, kas fonksiyonları ve hücre basıncının uyarlanması gibi birçok fonksiyonlara sahiptirler [Smith ve ark., 2000; Supuran ve Scozzafava, 2007].

2.1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi İnhibitörleri

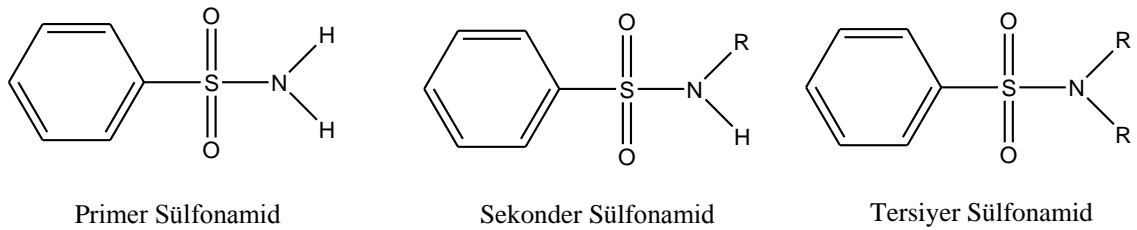
Hastalıkların tedavisinde CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda da CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesi hızlanmıştır. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta Glokom tedavisinde olmak üzere ilaç, anti-tümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MR) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, anti-ülser ve diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak etkin bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu sebeple,

farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel işlevleri, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat sağlamaktadır [Supuran ve Scozzafava, 2001].

Klinik olarak kullanılan insan CA inhibitörlerine örnek olarak; asetazolamit (AZA), metazolamit (MZA), etokzolamit (EZA), dibromofenamit (DCP), dorzolamit (DZA), brinzolamit (BRZ), benzolamit (BZA), topiramet (TPM), zonizamit (ZNS), sülfirit (SLP), indisulam (IND), selekosib (CLX) ve valdekosib (VLX) verilebilir [Supuran ve ark., 2014].

Sık kullanılan sülfonamid bazlı bir ilaç olan AZA çok iyi bir CA inhibitörüdür. Minimal toksisite gösterir ve iyi farmokinetik özellikler sağlamaktadır. Fakat bu ilaç istenmeyen yan etkilere de sahiptir. Üre seviyesinde artış, artmış bir sodyum ve potasyum salınımına neden olarak diüretik etki oluşturması yan etkileri arasındadır. EZA ve MZA'da CA inhibitörleridir. AZA'dan daha uzun yarılanma ömrüne sahiptirler ve böbrek üzerindeki olumsuz etkileri daha azdır. DZA, bir sülfonamid ve topikal CA-II inhibitörüdür. Açık açılı glokom veya oküler hipertansiyonlu hastalarda açığa çıkan intraselüler basıncı azaltmak için kullanılır. TPM, fruktoz ile ilişkili sülfamat ilave edilmiş bir monosakkarittir ve özellikle CA-II ve CA-IV izoenzimleri için zayıf bir inhibitör olarak bilinirler [Splendiani ve ark., 2006].

Yapılan çalışmalar CA'nın en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biri olarak gösterilmektedir. Sülfonamidler esas itibarı ile p-aminobenzensülfonamid (sülfanilamid) maddesinin türevidir. Bu sınıfa asetazolamid, metazolamid, klorozolamid, benzolamid, sülfanilamid ve etoksizolamid girer. Bu bileşikler farklı şekillerde CA'ya etki ederler. Asetazolamid ve azid, CA'nın CO₂ hidrasyon aktivitesini inhibe ederler. Bu iki maddenin bilinen bütün memeli CA'ları inhibe ettiği tespit edilmiştir.

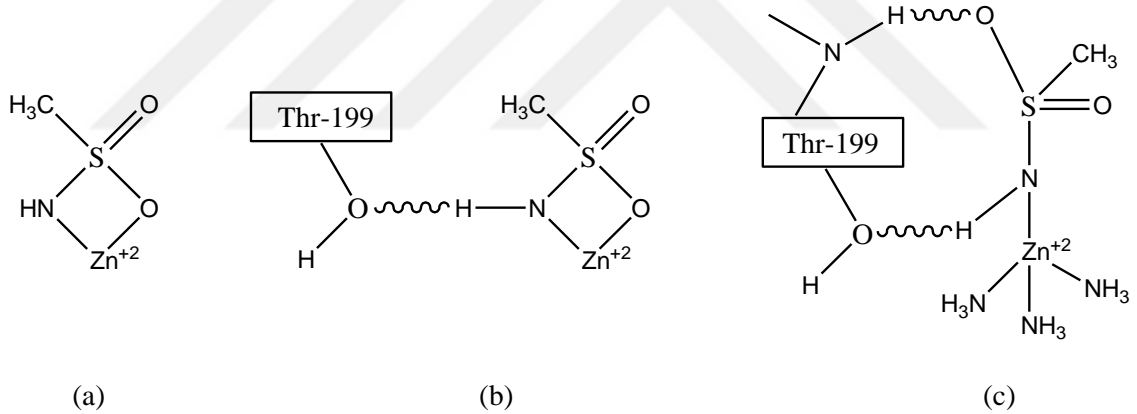


Şekil 2.3. Sülfonamidlerin Genel Yapısı [Sethi ve ark., 2013]

Sülfonamidler, sübstitüe olmamış bir $-SO_2NH_2$ grubu veya bir $-SO_2NH(OH)$ grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde, ($R-SO_2NH^-$ veya $R-SO_2N-OH$) 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].



Sübstitüe 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].

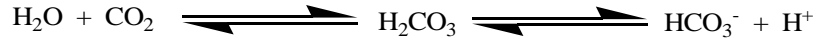


Şekil 2.4. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması [Özensoy, 2002]

2.1.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

2.1.3.1. CO₂-Hidrataz Aktivitesi

CA enziminin aktivitesi; CO₂'nin hidratasyonu, bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir. Aşağıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, koşullara göre CO₂ gazı oluşmakta ya da harcanmaktadır. Aynı zamanda H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Bu yöntemde açığa çıkan veya harcanan CO₂ gazı, metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂'nin suda az miktarda çözünmesi ve fazla zaman alması gibi dezavantajları vardır.



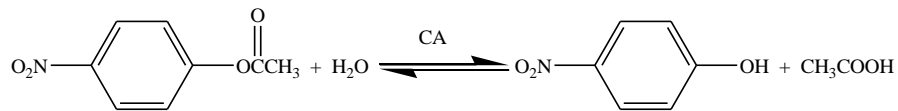
Öte yandan, ortamdaki H^+ konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Ancak bu metodun az zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması CO_2 'nin suda çözünmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz etkileri de vardır. Bu dezavantajları en aza indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metotlar aktivite tayininde kullanılmaktadır [Maren ve Conroy, 1993; Landolfi ve ark., 1998]. Fakat enzimin saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından, Wilbur-Anderson metoduyla yapılmaktadır. Bu yöntemde göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO_2 hidrasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Buna göre;

$$\text{Enzim Aktivitesi} = [(t_0) - (t_c)] / (t_c)$$

formülünden hesaplanabilir [Wilbur ve Anderson, 1948].

2.1.3.2. Esteraz Aktivitesi

Esteraz aktivitesi ise, p-nitrofenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [Verpoorte ve ark., 1967; Landolfi ve ark., 1998]. Reaksiyon denklemi ise şu şekildedir.



Şekil 2.5. p-nitro fenil asetatın hidroliz reaksiyonu

2.1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

CA enzimi HCO_3^- ve H^+ oluşturarak hem CO_2 'nin uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir.

Tablo 2.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

1	$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
2	$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
3	$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH}(\text{OH})_2$
4	$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
5	$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$
6	$\text{ArOPO}_3^{-2} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HPO}_3^{-2} + \text{ArOH}$
7	$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HF} + \text{ArOH}$
8	$\text{PhCH}_2\text{OCOCI} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
9	$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$

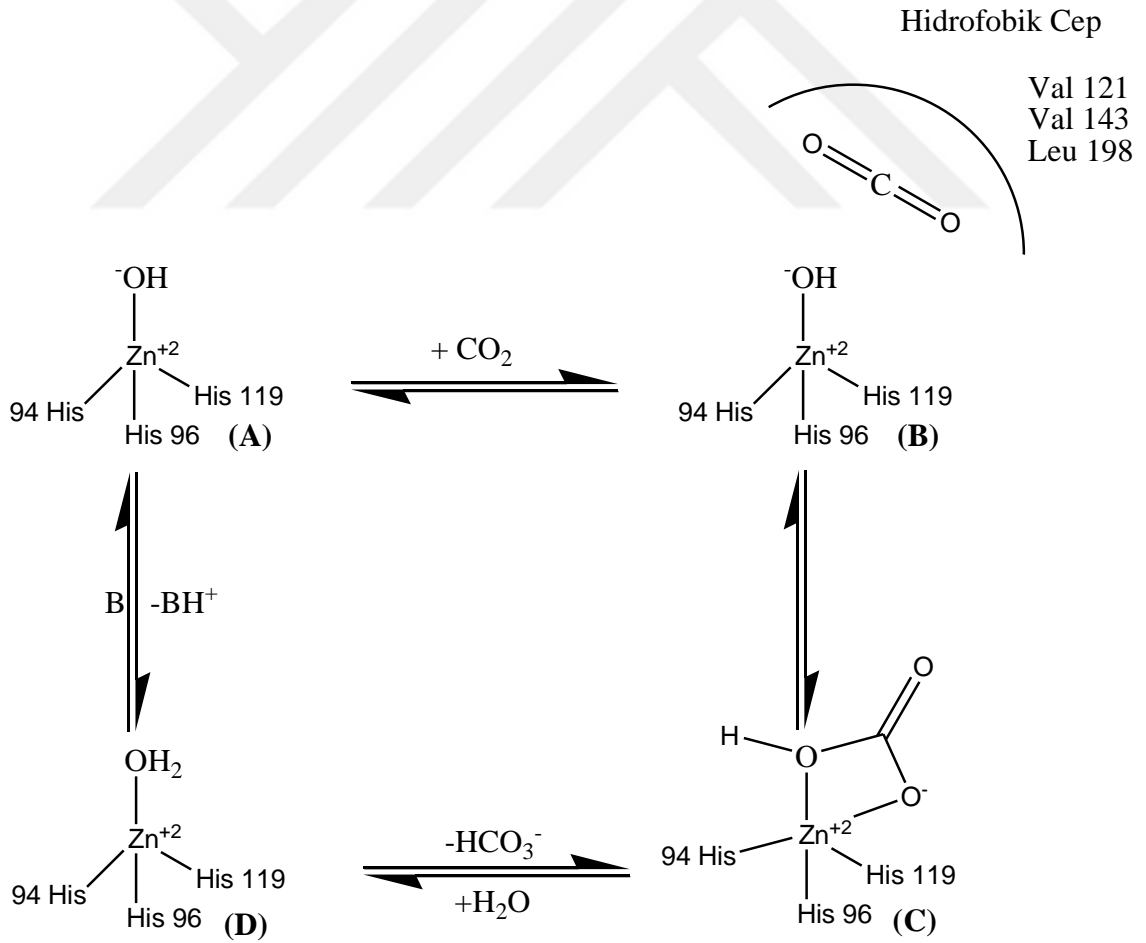
CA enzimi hidrataz aktivitesi dışında aynı zamanda Tablo 2.1'de görüldüğü gibi elektrofilik merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir fonksiyonu olup olmadığı henüz bilinmemektedir [Kaiser ve Lo, 1969; Jabusch ve Deutsch, 1989].

2.1.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmak amacıyla son 40-50 yıldır çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, CA enzimi aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubunun olduğu belirtilmiştir. Aktif bölge yakınındaki amino asitler proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde yerleştiği belirtilmiş olup yapılan X-ray kristalografi verilerine göre, metal iyonunun bir

H₂O veya OH⁻ iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His119) tarafından koordine edilmiş olan, aktif bölgedeki 15 Å⁰ derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Çinko bağlı H₂O, Glu106'nın karboksilat grubuyla ve Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu bağlanmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini yükseltmekle beraber molekülü nükleofilik atak için uygun yerdeki CO₂'e doğru hareket etmesini sağlamaktadır [Lesburg ve Christianson, 1995].

Zn⁺² iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşmaktadır [Şekil 2.5-A]. Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapıyla CO₂ molekülüne saldırır [Şekil 2.5-B]. Bu da, Zn⁺² iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonu meydana getirir [Şekil 2.5-C]. Daha sonra, HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirerek çözeltiliye geçer. Tüm bu olayların neticesinde, Zn⁺² iyonuna su molekülü bağlanır ve bu durum 2.5-D 'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesine olanak sağlar [Lindskog, 1997].



Şekil 2.6. CA enziminin CO₂ hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterimi [Lindskog, 1997]

2.2. Glokom Hastalığı ve Karbonik Anhidraz Enzimi

Gözün şeklini ve optik özelliklerini koruyabilmesi için yeterli ve sürekli bir iç basınca sahip olması gerekir. Bunu da silyer cisimden salgılanan ve ön segment içini dolduran humor aköz olarak denilen sıvı tarafından sağlamaktadır. Humor aköz sürekli salgılandığı için yenilenmekte ve hem gözden çıkışındaki ayarlamaları hem de salınım hızı yoluyla göz içi basıncını düzenleme ve dengeleme görevini üstlenir [Guyton ve Hall, 1996]. Göz içi basıncı gün içerisinde kardiyak ve solunum sistemi faaliyetlerine göre değişebilmekle beraber günlük göz içi basıncı değişimi ortalama 3-5 mmHg olmaktadır. Günlük göz içi basınç değişiminin 10 mmHg üzerinde olduğu kişilerde glokom hastalığı oluşma riski oldukça fazladır [Ziemer, 1996]. Glokom; kronik, bozulmuş, optik sinir başında geri döndürülemez hasara neden olan yüksek göz içi basıncı (GİB) ile karakterize edilen bir göz hastalığı olarak tanımlanmakla beraber bu hastalık görme fonksiyonu kaybına ve ileriki aşamalarda ise körlükle sonuçlanmaktadır [Mincione ve ark., 2007].



Şekil 2.7. Glokom hastalığına yakalanmış ve glokom evrelerini gösteren bir göz örneği

Glokom birden fazla çeşidi olan bir hastalık olmakla birlikte aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir [Morrison ve Pollack, 2003; Tunca, 2012].

Primer Glokom

- Primer Açık Açılı Glokom (PAAG)
- Primer Kapalı Açılı Glokom (PKAG)

· Çocukluk Glokomu

Sekonder Glokom

· Steroid Bağımlı Glokom

· Pigmentel Glokom

· Psödoeksfolyasyon Glokom

· Neovasküler Glokom

· Mercek Bağımlı Glokom

21. yüzyılın başlarında dünya genelinde 70 milyonu aşkın glokomlu hasta olduğu tahmin edilmektedir. Bunların yaklaşık %53'ünü primer açık açılı glokom (PAAG), %36'sı primer kapalı açılı glokom (PKAG) ve geri kalan %11'i ise sekonder glokomlu hastalar oluşturmaktadır. Özellikle tedaviye dirençli olan sekonder glokom tiplerinin varlığı nedeniyle göz hastalıkları içinde %15-20 gibi yüksek bir oranda körlüğe en sık neden olan hastalıklardan biri olarak bilinmektedir [Turaçlı, 2004].

İlaç olarak kullanılan karbonik anhidraz inhibitörlerinin geçmişi 1954 yılında glokom tedavisinde kullanılan asetazolamidin sentezine dayanmaktadır. Araştırmacılar çalışmalarında asetazolamid molekülü üzerinde küçük değişiklikler yaparak farmakolojik ve klinik açıdan daha üstün bir bileşik olan metazolamidi elde etmeyi başarmışlardır. Moleküler düzeyde yapılan bu yeniliğin daha iyi bir emilim, daha az serum proteini bağlama ve daha uzun süre etki gösterme gibi avantajlarının yanında bileşiğin hala birtakım sistemik yan etkilerinin bulunması gibi bir dezavantajı bulunmaktadır. Araştırmacılar göze lokal yoldan uygulanabilen ve böylece diğer dokulardaki karbonik anhidraz enzimlerini inhibe etmeyen, dolayısıyla daha etkili ve yan etkileri daha az olan iki topikal karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamid ve brinzolamid sentezlemeyi başarmışlardır [Netland, 2008].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyaller

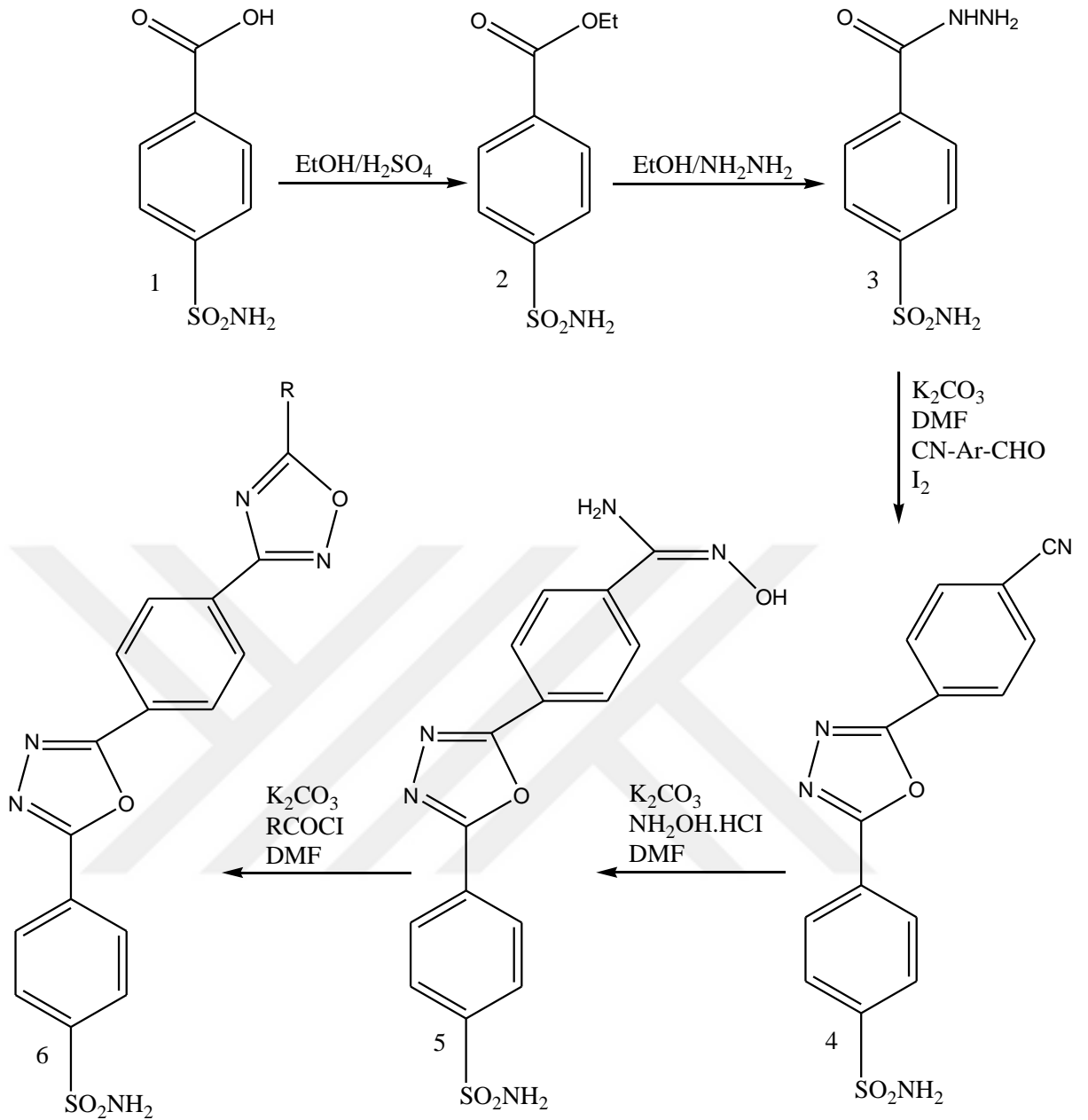
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda, 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 kullanılmıştır.

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 oksadiazol türevleridir. Bileşiklerin kodları ve isimleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Orijinal oksadiazol türevlerinin kodları ve isimleri

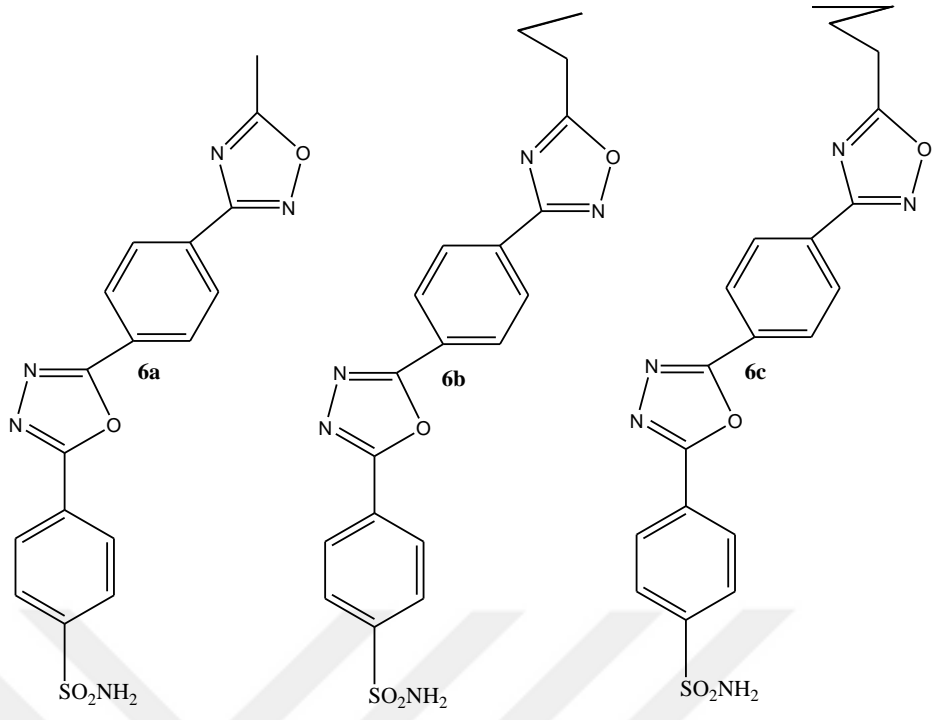
Bileşik Kodu	Bileşiğin Adı
6a	4-(5-(4-(5-Metil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6b	4-(5-(4-(5-propil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6c	4-(5-(4-(5-bütil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6d	4-(5-(4-(5-pentil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6e	4-(5-(4-(5-hekzil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6f	4-(5-(4-(5-heptil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6g	4-(5-(4-(5-oktil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6h	4-(5-(4-(5-nonil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6i	4-(5-(4-(5-pentadesil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6j	4-(5-(4-(5-asetoksimetil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6k	4-(5-(4-(5-etilasetoksil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6l	4-(5-(4-(5-(4-metoksifenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6m	4-(5-(4-(5-p-tolil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6n	4-(5-(4-(5-benzil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6o	4-(5-(4-(5-fenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6p	4-(5-(4-(5-(3-florofenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6r	4-(5-(4-(5-(4-bromofenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6s	4-(5-(4-(5-(2-bromofenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid
6t	4-(5-(4-(5-(4-nitrofenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzenesülfonamid



Şekil 3.1. 4-Sülfonilamid ester (2), 4-Sülfonilamidbenzohidrazid (3), 4-(5-(4-siyanofenil)-1.3.4 oksadiazol-2-yl)-benzenülfonamid (4), (E)-N'-hidroksi-4-(5-(4-sülfamoylfenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzimidamid (5), açıl sübtütye 4-(hidrazin karbonil) benzen sülfonamid türevlerinin (6a-t) genel sentez prosedürü

Tablo 3.2. Bisoksadiazol sübtütye sülfonamid bileşiklerin sentezi

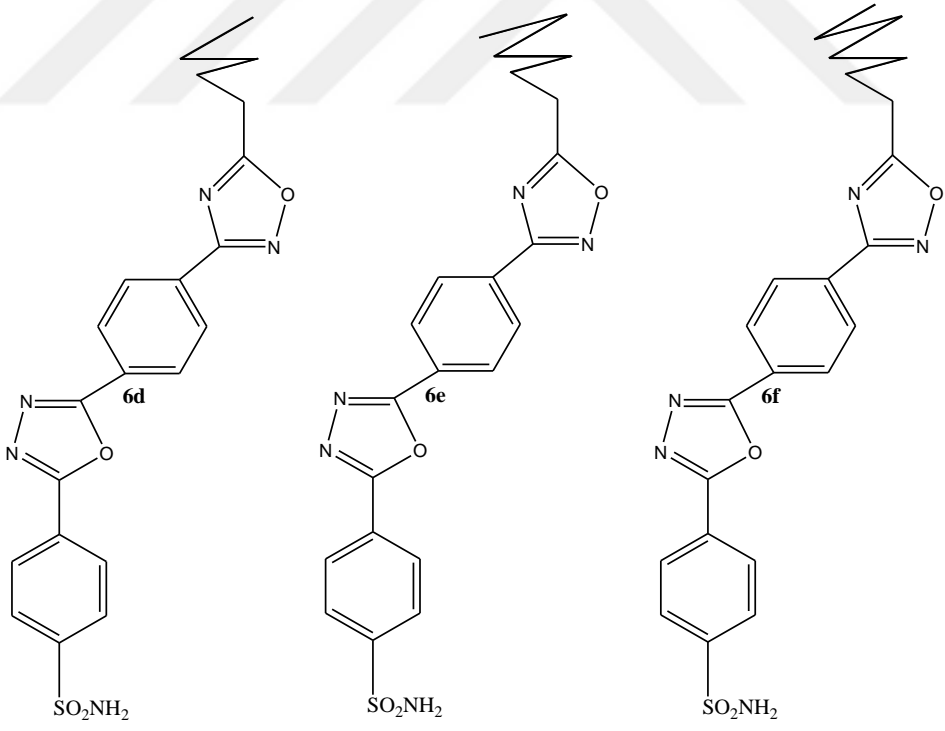
Bileşikler	R	Bileşikler	R	Bileşikler	R
6a	-CH ₃	6h	-C ₉ H ₁₉	6o	-C ₆ H ₅
6b	-CH ₂ -CH ₂ CH ₃	6i	-C ₁₅ H ₃₁	6p	(m)-C ₆ H ₄ -F
6c	-C ₄ H ₉	6j	-CH ₂ -O-CO-CH ₃	6r	(p)-C ₆ H ₄ -Br
6d	-C ₃ H ₁₁	6k	-CH ₂ -CO-O-CH ₂ -CH ₃	6s	(o)-C ₆ H ₄ -Br
6e	-C ₆ H ₁₃	6l	(p)-C ₆ H ₄ -O-CH ₃	6t	(p)-C ₆ H ₄ -NO ₂
6f	-C ₇ H ₁₅	6m	(p)-C ₆ H ₄ -CH ₃		
6g	-C ₈ H ₁₇	6n	-CH ₂ -C ₆ H ₅		



Kimyasal formül: $C_{17}H_{13}N_5O_4S$
Molekül Ağırlığı: 383,38

Kimyasal Formül: $C_{19}H_{17}N_5O_4S$
Molekül Ağırlığı: 411,43

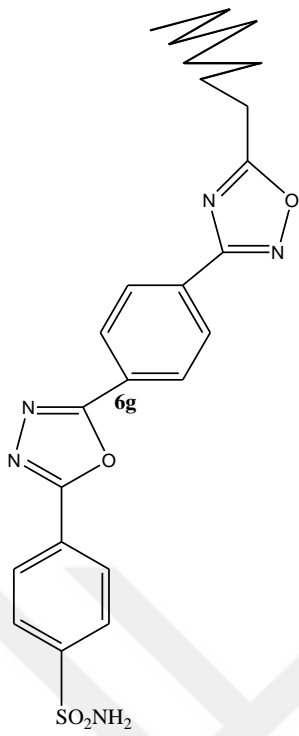
Kimyasal Formül: $C_{20}H_{19}N_5O_4S$
Molekül Ağırlığı: 425,46



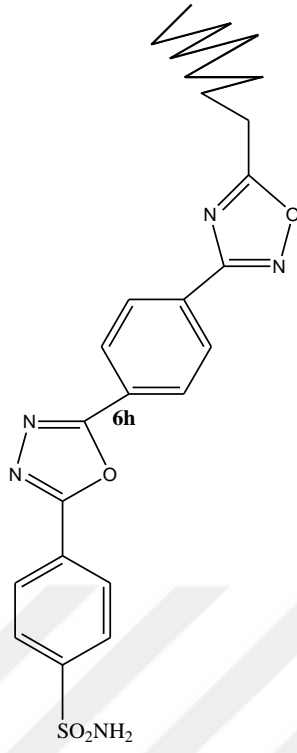
Kimyasal Formül: $C_{21}H_{21}N_5O_4S$
Molekül Ağırlığı: 439,49

Kimyasal Formül: $C_{22}H_{23}N_5O_4S$
Molekül Ağırlığı: 453,51

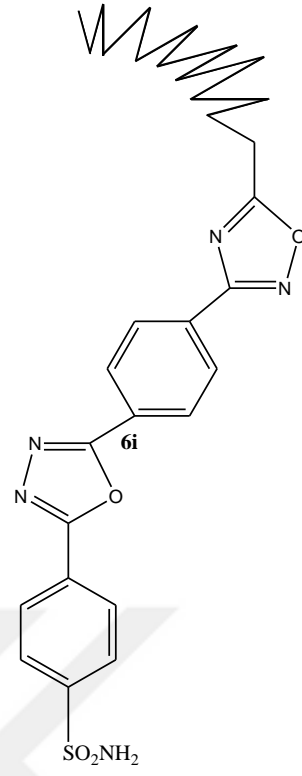
Kimyasal Formül: $C_{23}H_{25}N_5O_4S$
Molekül Ağırlığı: 467,54



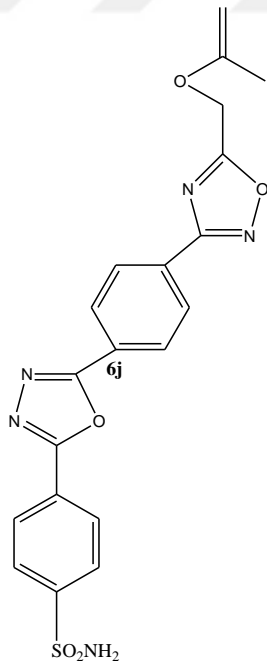
Kimyasal Formül: C₂₄H₂₇N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 481,57



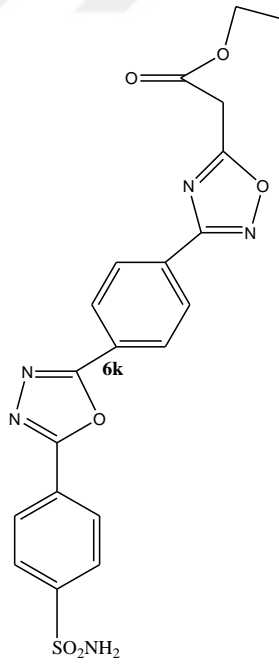
Kimyasal Formülü: C₂₅H₂₉N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 495,59



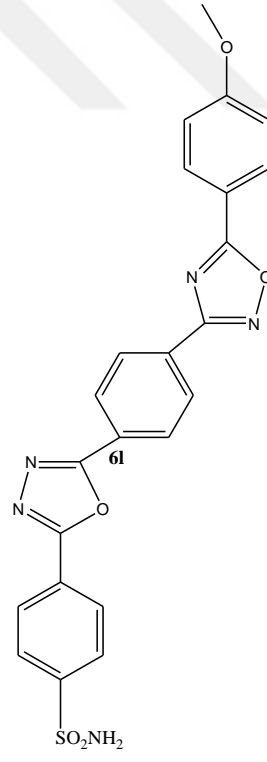
Kimyasal Formül: C₃₁H₄₁N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 579,75



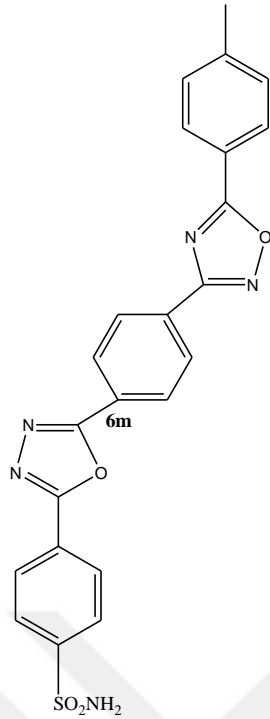
Kimyasal Formül: C₁₉H₁₇N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 411,43



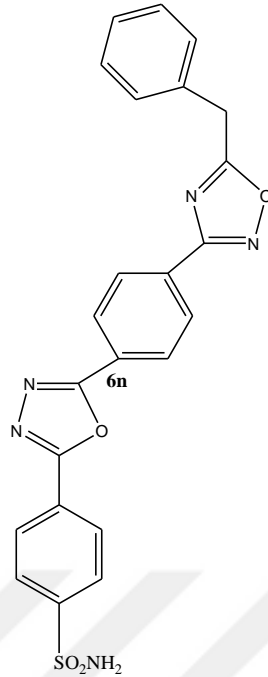
Kimyasal Formül: C₁₉H₁₇N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 411,43



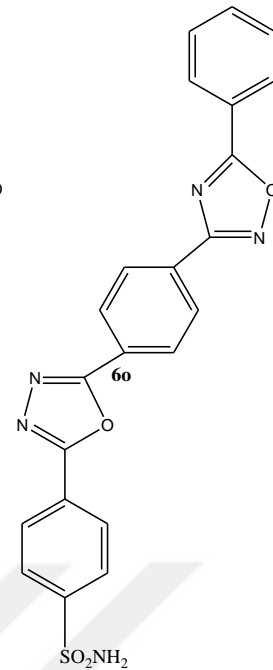
Kimyasal Formül: C₂₃H₁₇N₅O₅S
Molekül Ağırlığı: 475,48



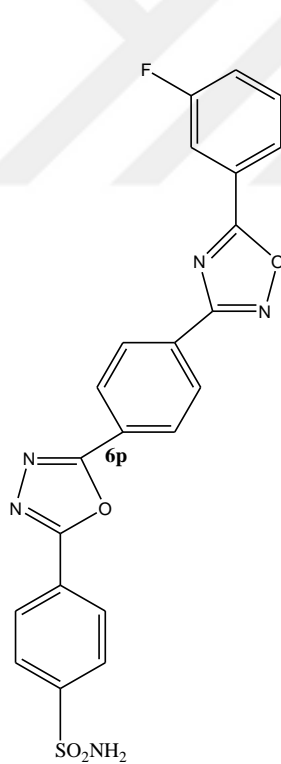
Kimyasal Formül: C₂₃H₁₇N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 459,48



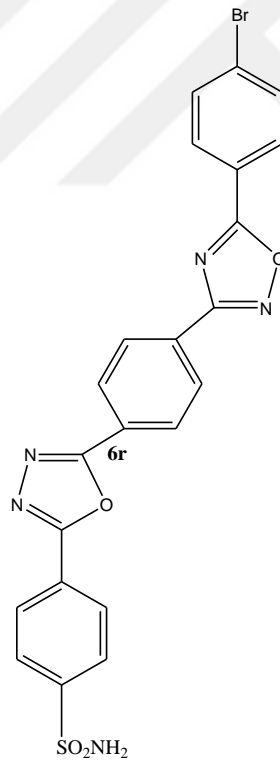
Kimyasal Formül: C₂₃H₁₇N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 459,48



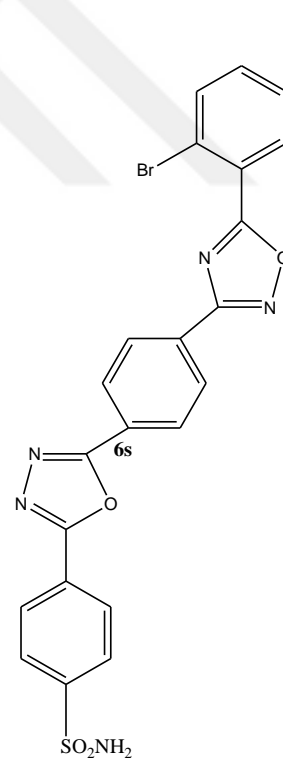
Kimyasal Formül: C₂₂H₁₅N₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 445,45



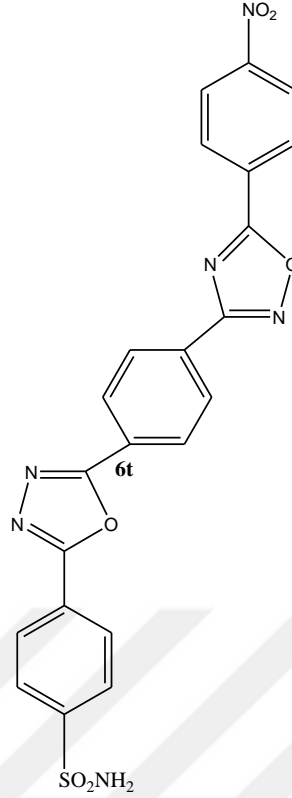
Kimyasal Formül: C₂₂H₁₄FN₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 463,44



Kimyasal Formül: C₂₂H₁₄BrN₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 524,35



Kimyasal Formül: C₂₂H₁₄BrN₅O₄S
Molekül Ağırlığı: 524,35



Kimyasal Formül: $C_{22}H_{14}N_6O_6S$
Molekül Ağırlığı: 490,45

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 NaHCO₃ tamponu (pH: 10.0); 8,401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülüp, 1M NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M NaHCO₃ tamponu (pH: 8.8); 8,401 g (0.1 mol) NaHCO₃ 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-SO₄ tamponu (pH: 7.5); 1,5143 g Tris-base 200 mL distile suda çözülüp, H₂SO₄ 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 Na₂SO₄ ve 3,0275 g Tris-HCl 950 mL distile suda çözülüp 1M 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 1M 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 1M HCl ile 5.6'ya getirildi ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Susbrat çözeltisi; 0,027 g p-nitrofenil asetat 1 mL asetonda 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 1M 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 boya 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 boya giderme 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

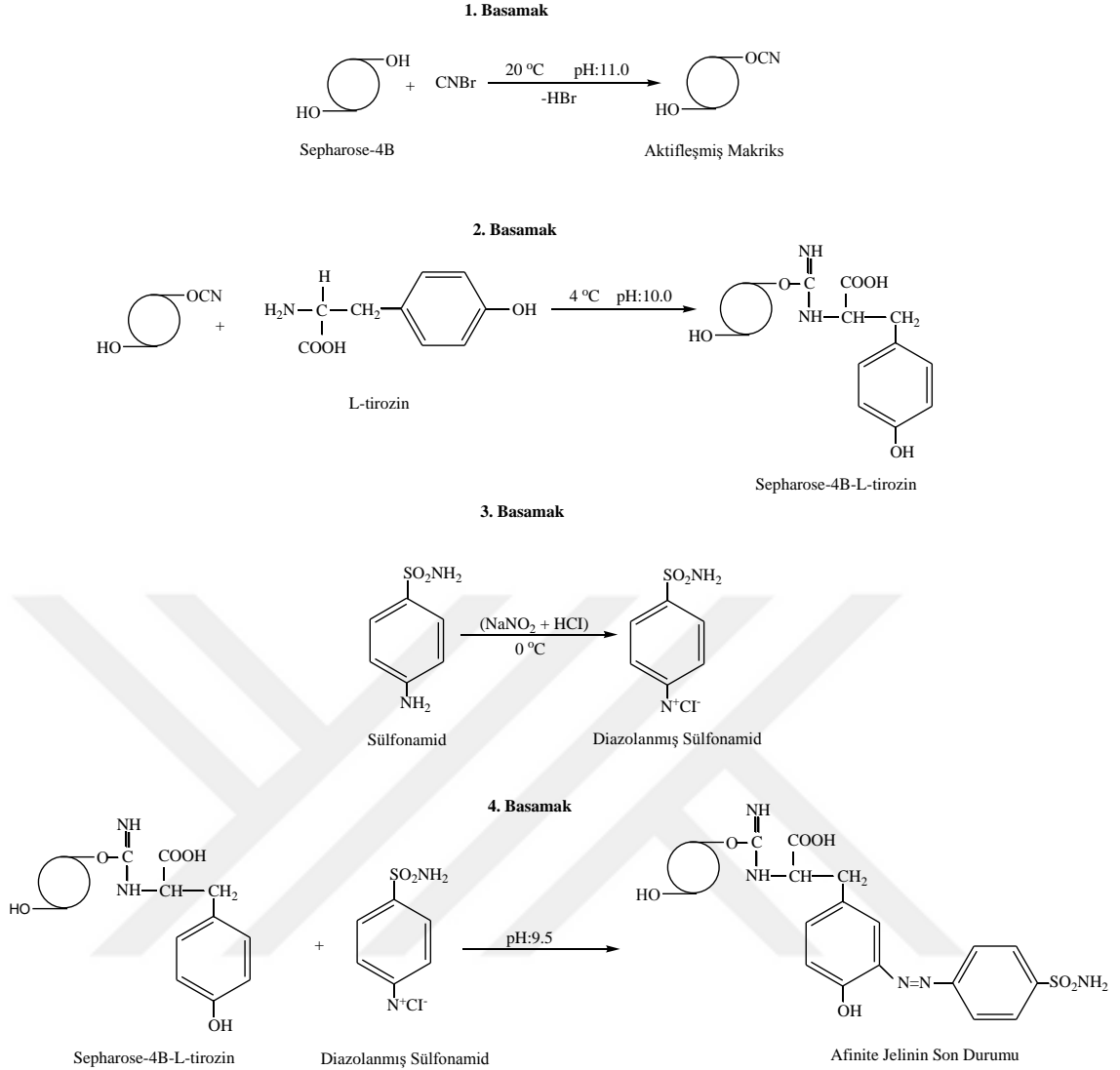
3.2.1. Afinite jelin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan afinite jeli, afinite jelinin sentezi, afinite jelinin sentezinde kullanılan tamponlar, Küfrevioğlu, Ö.İ. danışmanlığında, Oktay Arslan (1994) tarafından hazırlanan tezden yararlanılarak ilgili prosedüre göre hazırlanmıştır [Arslan, 1994]. Bu amaçla, 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'nin tamamı birden katıldı. pH metre yardımıyla süspansiyonun pH'sı 4M NaOH kullanılarak pH: 11'e çıkarıldı ve tepkime bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyon pH değişmeye kadar sürdürüldü (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona eklenerek, karışım bir buchner hunisine aktarıldı. Daha sonra 250 mL soğutulmuş 0,1M NaHCO₃ tamponu (pH: 10.00) ile yıkandı ve behere aktarıldı.

Daha sonra 0,08 g tirozin içeren soğuk 20 mL 0,1M NaHCO₃ tamponunun (pH: 10.00) 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 ortamdan tamamen uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra yıkama işlemine 100 mL'lik soğuk 0,2M NaHCO₃ tamponu (pH: 8.8) ile devam edildi ve elde edilen jel aynı tamponun 40 mL'si içine konuldu.

Daha sonra; 0,025 g sülfonamid 0 °C civarında 10 mL 1M 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 4M NaOH ile pH: 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 0,05M Tris-SO₄ tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemi bittikten sonra 0,05M Tris-SO₄ tamponu içine alınan jel +4 °C de muhafaza edildi.

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



Şekil 3.2. Sepharose-4B jeli reaksiyon mekanizması

3.2.2. Sığır Eritrositlerinden BCA Enziminin Saflaştırılması

Çalışmada kullanılan BCA enzimi, Küfrevioğlu, Ö.İ. danışmanlığında, Arslan, O. (1994) tarafınca hazırlanan tezden yararlanılarak aşağıdaki (Başlık 3.2.2.1. ve 3.2.2.2.) ilgili prosedüre göre saflaştırılmıştır [Arslan, 1994].

3.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizat Eldesi

Deneyler için sığır kanı Siirt ilindeki hayvan kesim noktalarından, ticari et amaçlı kesilen sığırlardan kesim anında alındı. Kanın pıhtılaşmasını önlemek amacıyla daha önceden hazırlanan asit-sitrat dekstroz antikoagulant sıvısından her 100 mL kan için 15 mL eklenerek kanın pıhtılaşması engellendi. Daha sonra +4 °C'de muhafaza edildi ve aynı gün içerisinde kullanıldı.

Eritrositleri ayırmak amacıyla kanlar 30 mL'lik teflon tüplere konuldu ve 5000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra tüplerde üstte kalan serum kısmı dikkatli bir şekilde atılarak altta kalan eritrositler %0,9'luk NaCl çözeltisi kullanılarak yıkandı ve üstteki sıvı kısım atıldı. Daha sonra eldeki eritrositler 1,5 katı soğuk distile su ile hemoliz edildi. Hemoliz edilen tüpler birleştirilerek, hemolizin tam gerçekleşmesi için tüpler bir süre hafif bir şekilde çalkalandı.

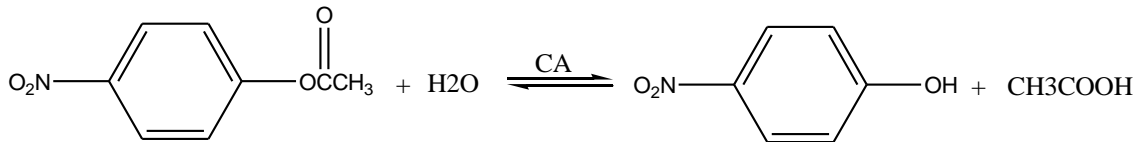
Daha sonra hemolizati hücre zarlarından ayırmak amacıyla +4 °C'de 15000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüj edildi. Hücre zarlarından ayrılan üstteki hemolizat kısmı dikkatli bir şekilde alındı ve tris-base yardımı ile pH: 8.7'ye getirildi.

3.2.2.2. Hemolizattan Enzimin Saflaştırılması

Daha önce hazırlanan ve +4 °C'de muhafaza edilen afinite jeli alınıp kolona paketlenildi ve dengeleme tamponu ile dengelendi. Daha sonra elde edilen hemolizat alınarak kolona tatbik edildi. Kolon, yıkama tamponu ile yıkanarak safsızlıkların ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. Daha sonra BCA, elüsyon tamponu yardımı ile afinite jelinden saflaştırılarak 3 mL'lik tüplere alındı. Aktivite tayini için hazır hale getirildi.

3.2.3. Enzimin Aktivite Tayini

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



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-nitrofenol'ün molar ekstinksiyon katsayısı $\epsilon_{348} = 5,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil

asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve molar ekstinksiyon 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 bölünerek hidrolizlenen p-nitrofenil asetat miktarı mmolar cinsinden bulunur [Mc Intosh, 1970].

Tayin işlemlerinde aşağıdaki prosedür uygulandı:

Kuvartz küvetlere 1,5 ml tamponlanmış enzim çözeltisi ve 1,5 ml substrat (+inhibitör) ilavesinden 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 absorpsiyonu içinde bir düzeltme yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitrofenil asetat substrat çözeltisi günlük olarak hazırlandı. 27 mg ester 1 mL aseton içerisinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL distile 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, 0,5 M Tris-SO₄ (pH: 7.4) çözeltisi ile yapıldı.

3.2.4. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

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

Protein tayini işleminde aşağıdaki yol izlendi;

1 mg/mL sığır alümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 100 mM Tris-HCl tamponu (pH: 8.0) 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 absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL'lik 100 mM Tris-HCl (pH: 8.0) tamponu olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri 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. Vorteksde karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm'de absorbanları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbanına 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 metodu kullanılarak, %12'lik ayırıcı (separating) jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılarak incelendi [Laemmli, 1970]. 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-merkaptolanol) 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 boya çözeltisi içine konuldu. 1.5-2.0 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel boya çözeltisinden çıkartılarak boya çıkarma çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel boya çıkarma çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

Tablo 3.3. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları

	Ayrırma Jeli	Yığılma 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 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 oksadiazol türevlerinin (6a→6t) IC₅₀ değerlerini bulmak için, optimum şartlarda p-nitrofenil asetat substratının 2,98 mM sabit derişiminde çalışıldı. Önce oksadiazol türevlerinin bulunmadığı ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik oksadiazol derişimlerine karşılık gelen absorbanlar 348 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite - [Oksadiazol türevleri] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir oksadiazol türevleri için IC₅₀ değerleri hesaplandı.

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

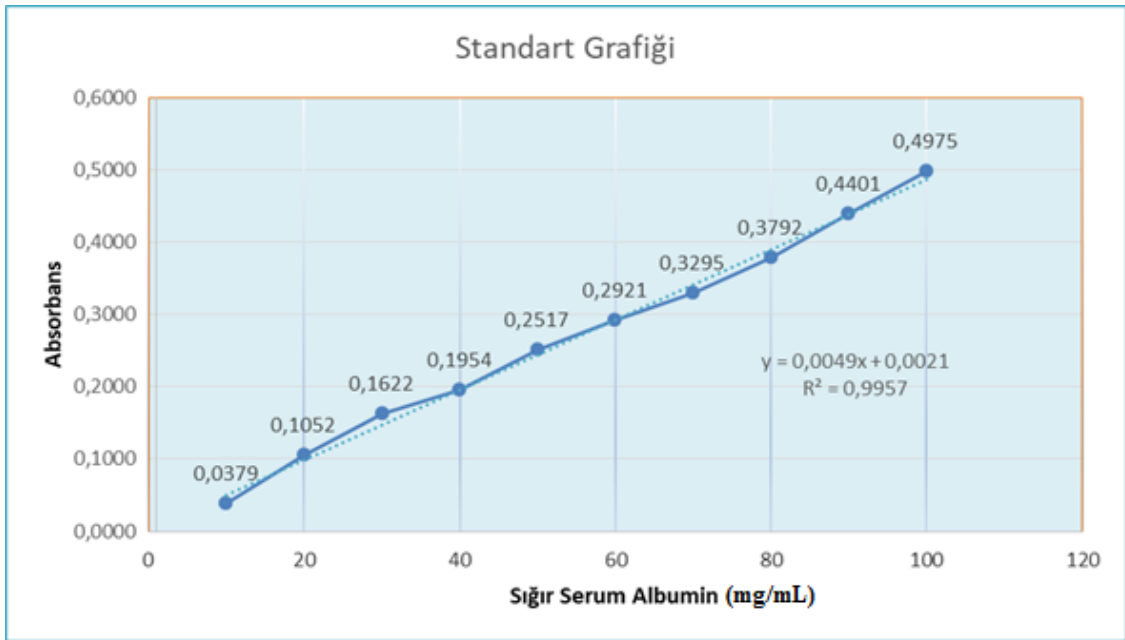
Orijinal sentez oksadiazol türevlerinin (6a→6t) inhibisyon sabitleri (K_i) aşağıdaki Cheng&Prusoff denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır [Cheng ve prusoff, 1973].

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

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein Miktar Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 3.2.4.'de açıklandığı gibi hazırlandı. Safılaştırma 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 ile Tespit Edilen BCA Enzimi Protein Miktarı

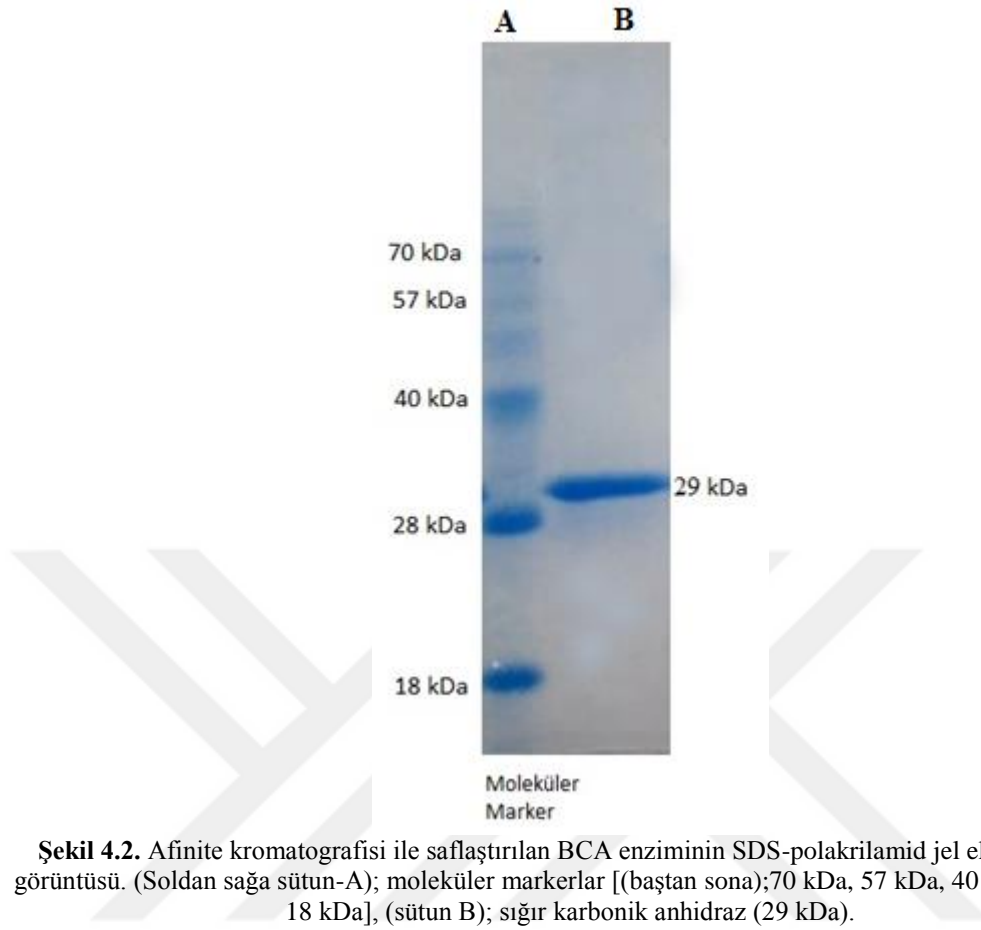
Tablo 4.1. BCA Enzimi Protein Miktarı

	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 Elektrofrezisi ile Safsızlık Kontrolü

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



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

4.4. Enzimin Saflaştırılması

Sığır kanı Siirt ilindeki hayvan kesim noktalarından alınmıştır. Pıhtılaşmasını önlemek amacıyla her 100 mL kan için antikoagulant sıvıdan 15 mL eklenerek kanın pıhtılaşması engellenmiştir ve +4 °C’de muhafaza edilerek aynı gün içerisinde kullanılmıştır.

Eritrositleri ayırmak amacıyla kanlar 30 mL’lik teflon tüplere konulmuştur. 5000 rpm’de 15 dakika santrifüj işleminden sonra serum atılmak suretiyle eritrositlerden uzaklaştırılmıştır. Eritrositler % 0.9’lik 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. Hemolizatu 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 getirilmıştir.

4.4.1. Hemolizatın Afinite Kolonuna Yüklmesi ve Enzimin Elüsyonu

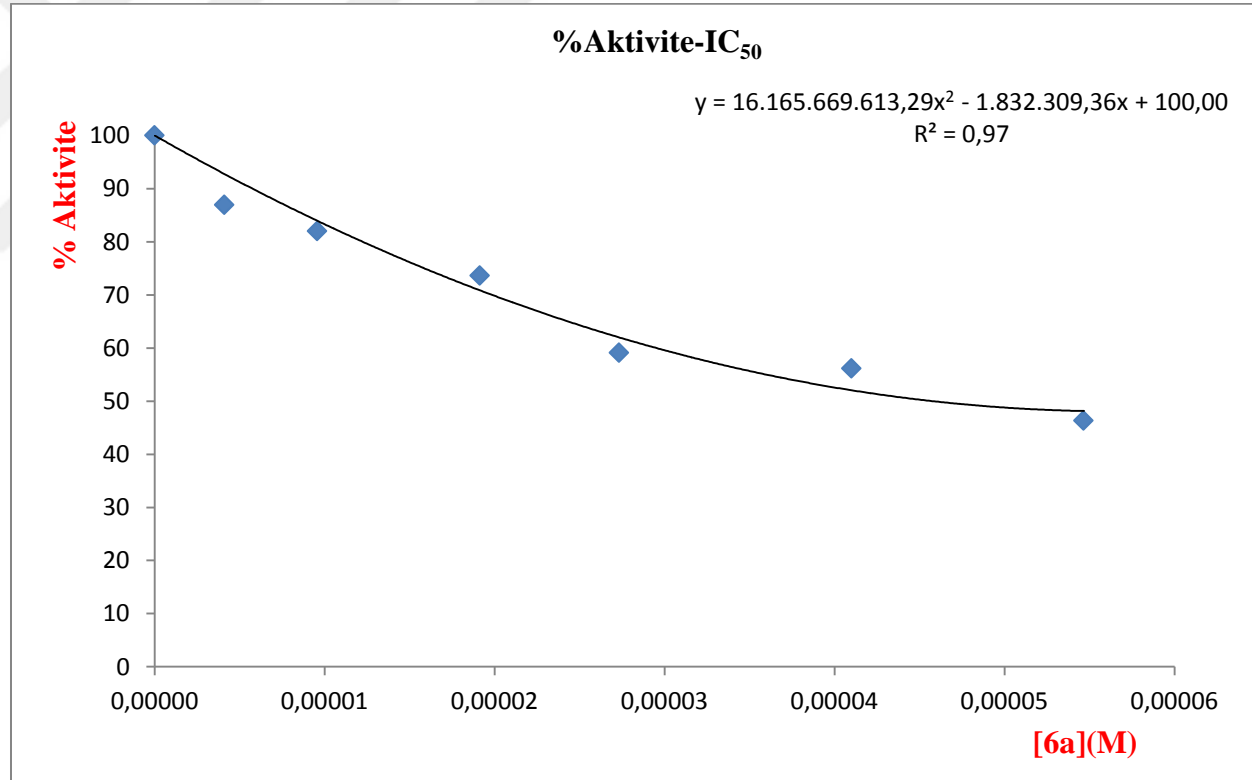
Hemolizat yüklmeden önce +4 °C’de muhafaza edilen afinite jeli dengeleme tamponu ile dengelenmiştir. Ardından hemolizat kolona yüklerek, yıkama tamponu vasıtasıyla safsızlıkların ortandan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Sonrasında, BCA enzimi elüsyon tamponu yardımı ile afinite jelinden saflaştırılarak 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 enzim aktivitesi üzerine 6a bileşiminin etkisi

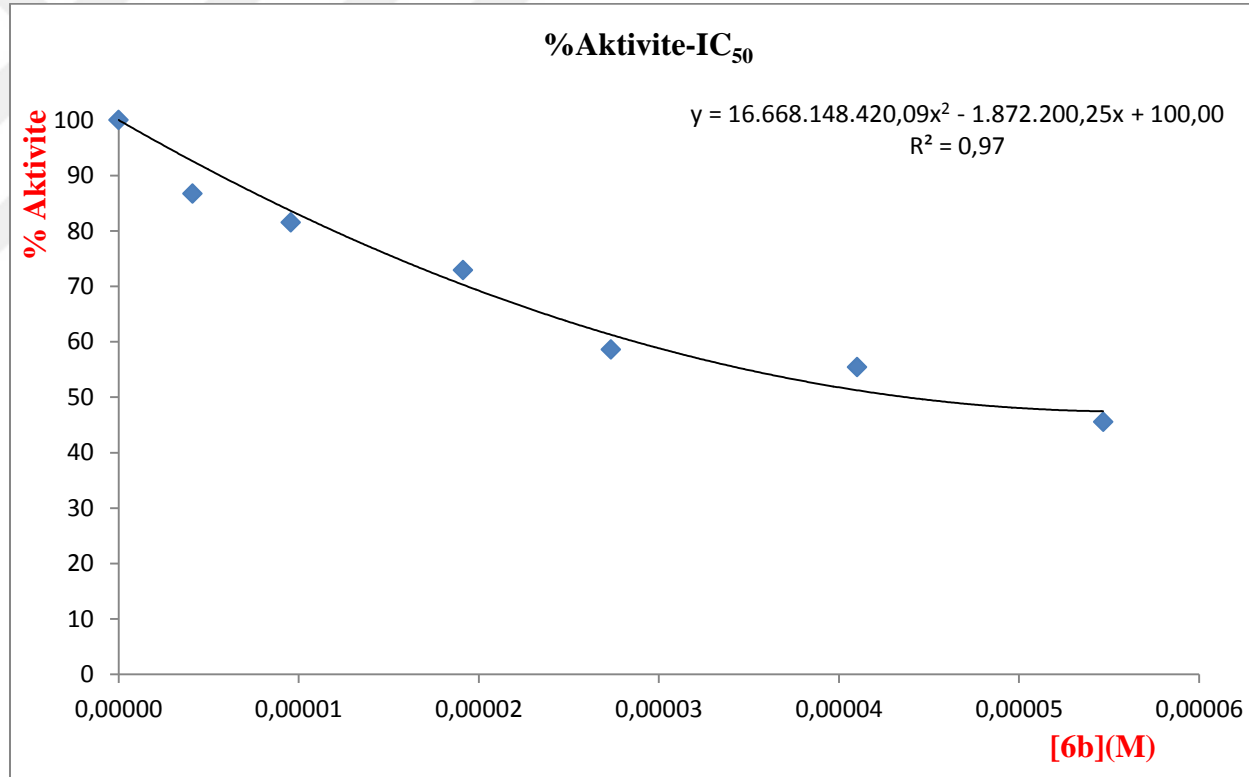
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6a Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki 6a Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLda k)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0353	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0333	0,222	81,919
750			165	70	19,13	0,0299	0,199	73,432
750			135	100	27,33	0,0240	0,160	59,041
750			85	150	41,00	0,0228	0,152	56,089
750			35	200	54,67	0,0188	0,125	46,125



Şekil 4.3. 6a kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6a] grafiği

TABLO 4.3. BCA enzim aktivitesi üzerine 6b bileşiminin etkisi

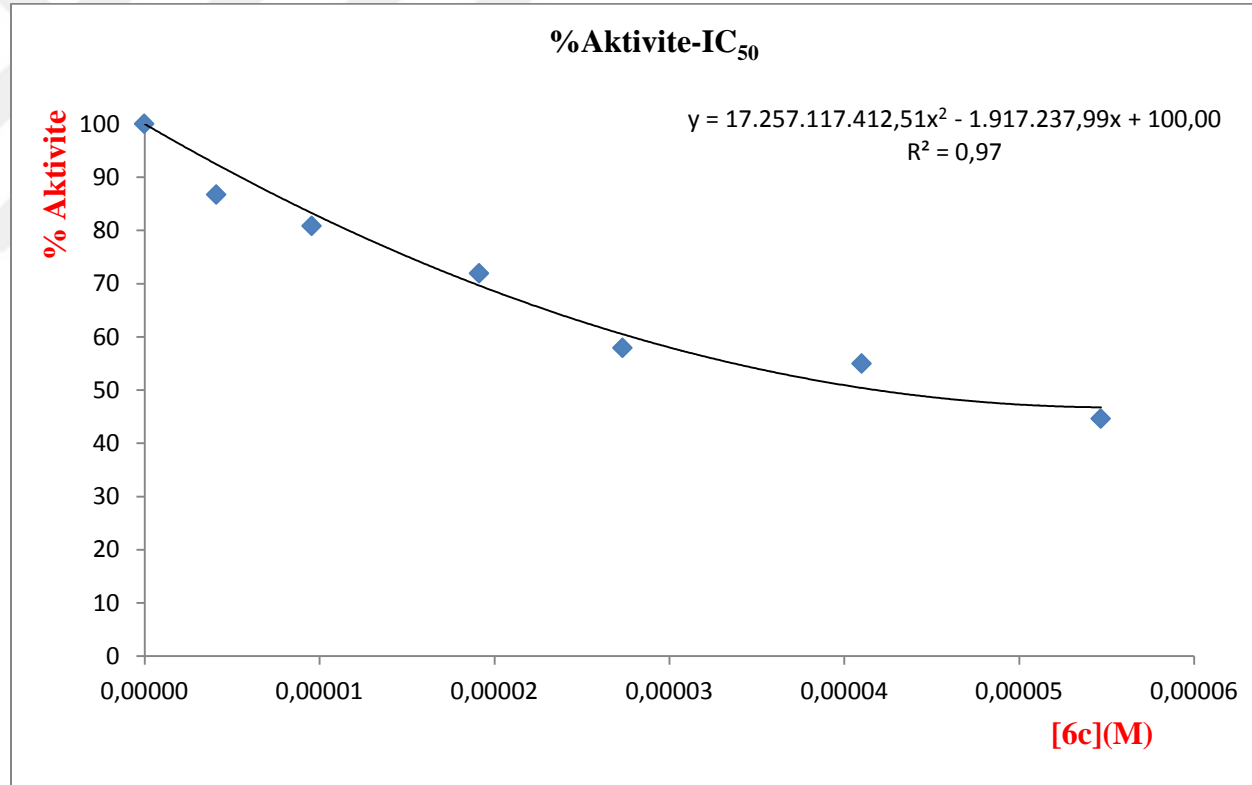
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6b Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6b Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0352	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0331	0,221	81,550
750			165	70	19,13	0,0296	0,197	72,694
750			135	100	27,33	0,0238	0,159	58,672
750			85	150	41,00	0,0225	0,150	55,351
750			35	200	54,67	0,0185	0,123	45,387



Şekil 4.4. 6b kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6b] grafiği

TABLO 4.4. BCA enzim aktivitesi üzerine 6c bileşiminin etkisi

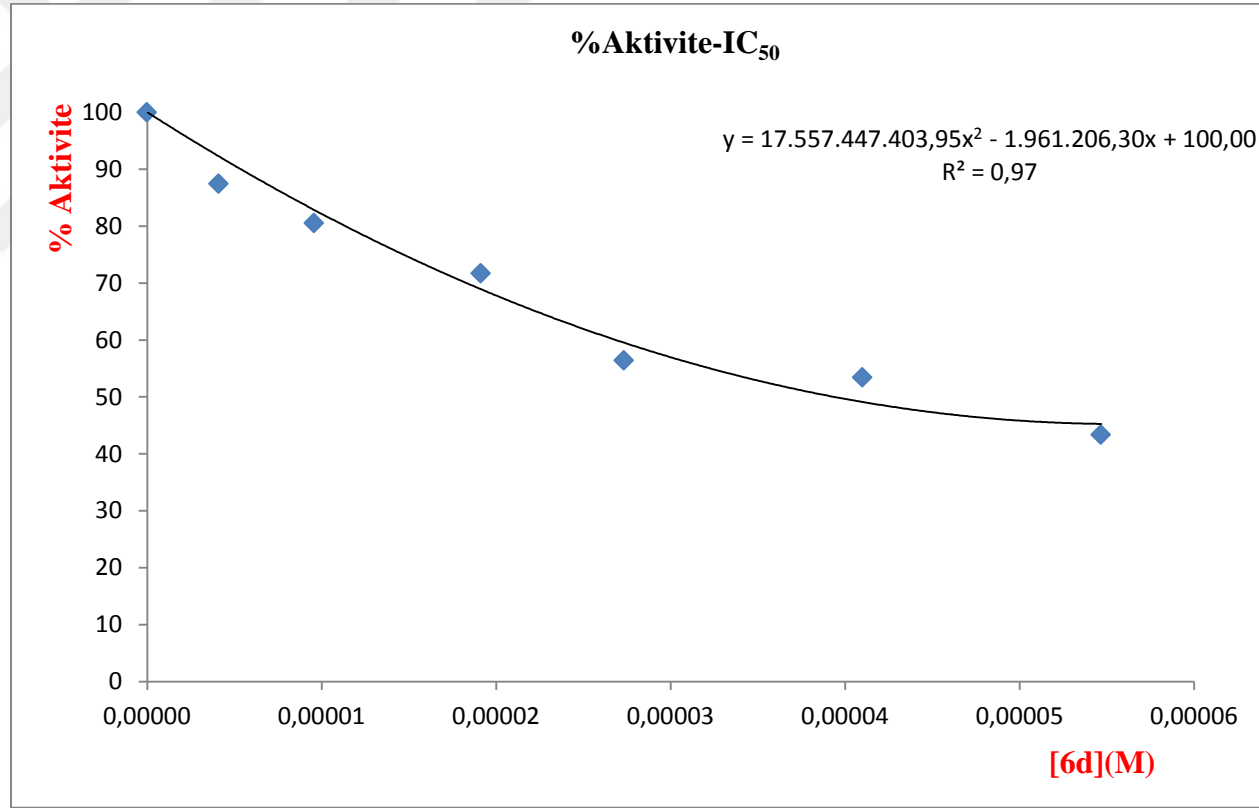
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6c Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6c Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0352	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0329	0,219	80,812
750			165	70	19,13	0,0293	0,195	71,956
750			135	100	27,33	0,0235	0,157	57,934
750			85	150	41,00	0,0224	0,149	54,982
750			35	200	54,67	0,0182	0,121	44,649



Şekil 4.5. 6c kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6c] grafiği

TABLO 4.5. BCA enzim aktivitesi üzerine 6d bileşiminin etkisi

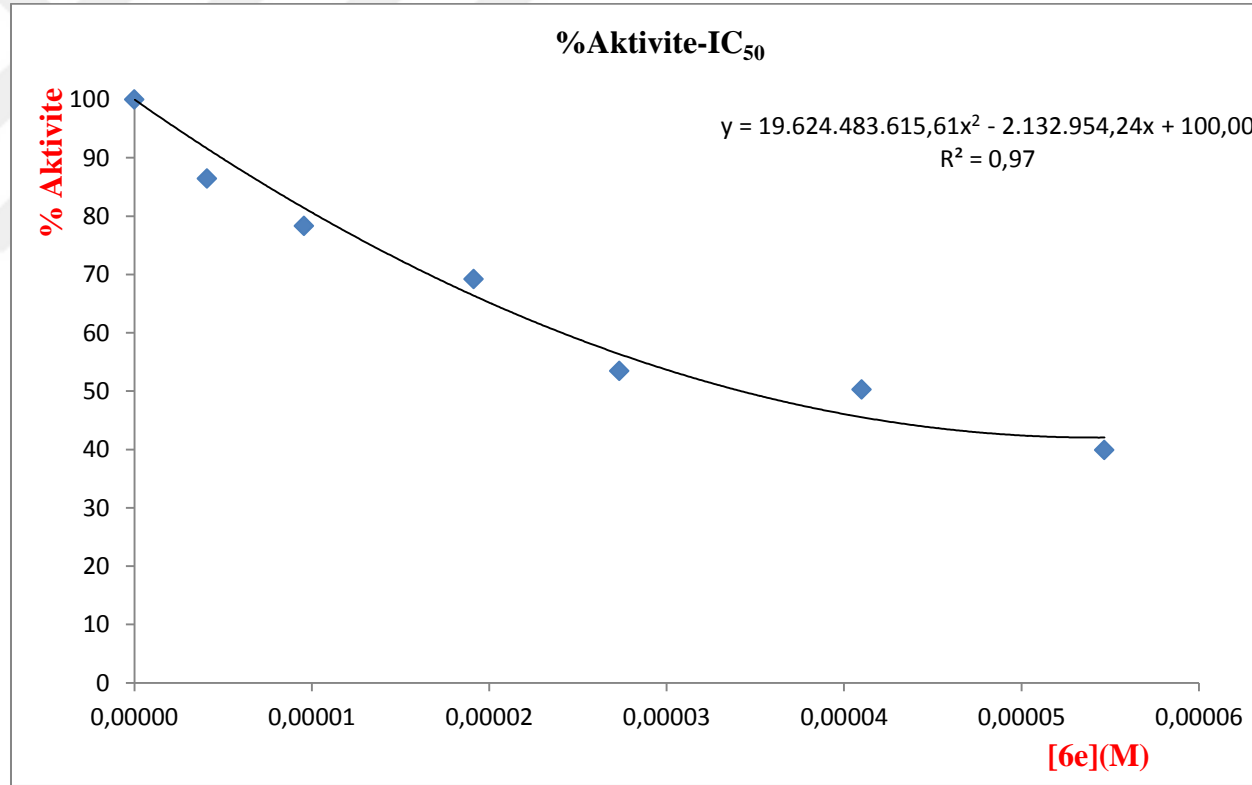
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6d Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6d Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0355	0,237	87,454
750			200	35	9,57	0,0327	0,218	80,443
750			165	70	19,13	0,0291	0,194	71,587
750			135	100	27,33	0,0229	0,153	56,458
750			85	150	41,00	0,0217	0,145	53,506
750			35	200	54,67	0,0176	0,117	43,173



Şekil 4.6. 6d kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6d] grafiği

TABLO 4.6. BCA enzim aktivitesi üzerine 6e bileşiminin etkisi

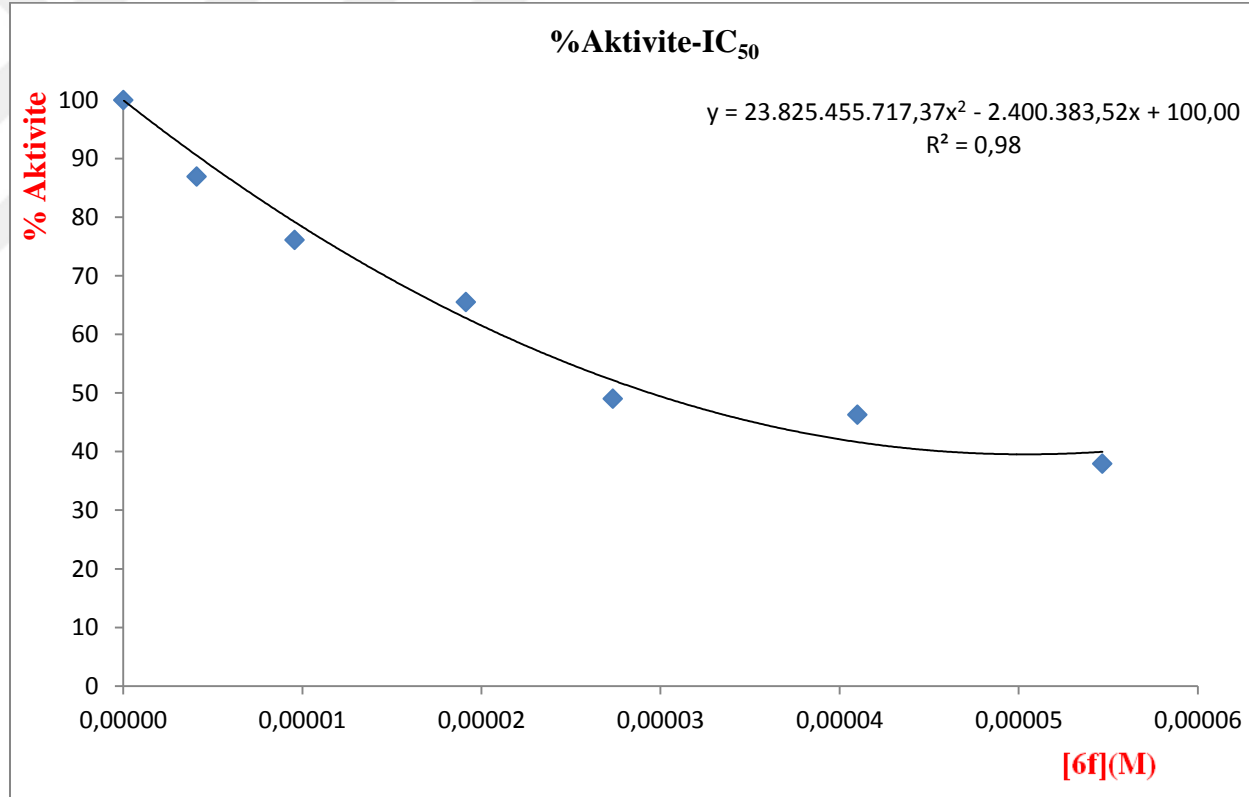
50 mM Tris-SO₄ tamponu (μL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (μL)	Saf Su Hacmi (μL)	6e Bileşimin Hacmi (μL)	Küvetteki 6e Bileşiminin Kons. (μg/μL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0351	0,234	86,347
750			200	35	9,57	0,0318	0,212	78,229
750			165	70	19,13	0,0281	0,187	69,004
750			135	100	27,33	0,0217	0,145	53,506
750			85	150	41,00	0,0204	0,136	50,185
750			35	200	54,67	0,0162	0,108	39,852



Şekil 4.7. 6e kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6e] grafiği

TABLO 4.7. BCA enzim aktivitesi üzerine 6f bileşiminin etkisi

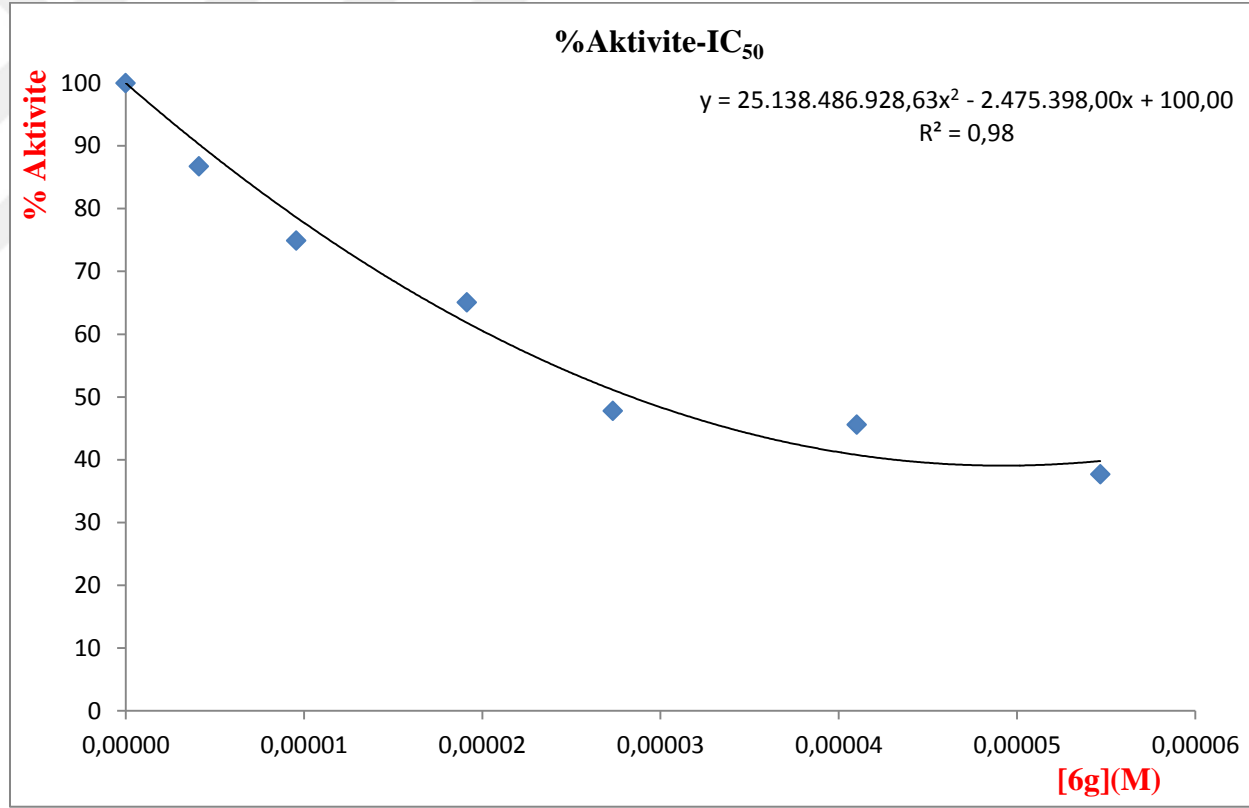
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6f Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki 6f Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0353	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0309	0,206	76,015
750			165	70	19,13	0,0266	0,177	65,314
750			135	100	27,33	0,0199	0,133	49,077
750			85	150	41,00	0,0188	0,125	46,125
750			35	200	54,67	0,0154	0,103	38,007



Şekil 4.8. 6f kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6f] grafiği

TABLO 4.8. BCA enzim aktivitesi üzerine 6g bileşiminin etkisi

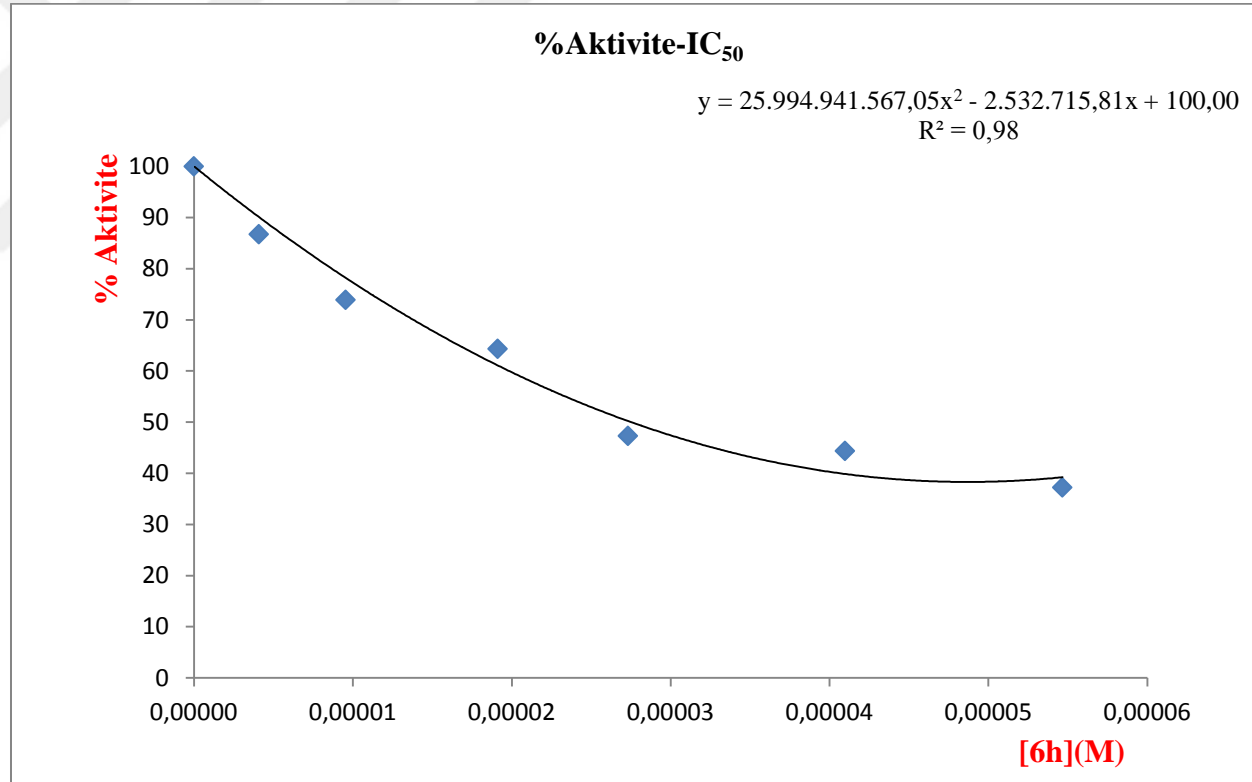
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6g Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6g Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0352	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0304	0,203	74,908
750			165	70	19,13	0,0264	0,176	64,945
750			135	100	27,33	0,0194	0,129	47,601
750			85	150	41,00	0,0185	0,123	45,387
750			35	200	54,67	0,0153	0,102	37,638



Şekil 4.9. 6g kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6g] grafiği

TABLO 4.9. BCA enzim aktivitesi üzerine 6h bileşiminin etkisi

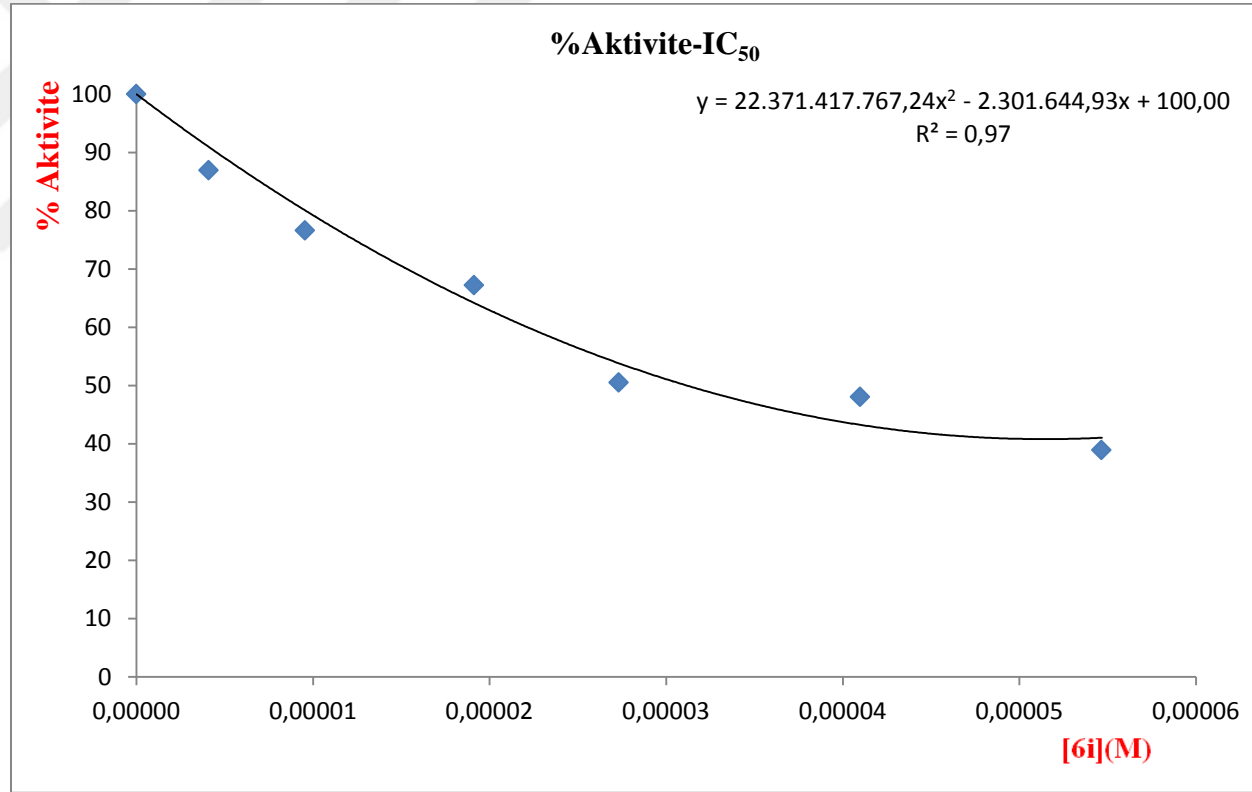
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6h Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6h Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0352	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0300	0,200	73,801
750			165	70	19,13	0,0261	0,174	64,207
750			135	100	27,33	0,0192	0,128	47,232
750			85	150	41,00	0,018	0,120	44,280
750			35	200	54,67	0,0151	0,101	37,269



Şekil 4.10. 6h kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6h] grafiği

TABLO 4.10. BCA enzim aktivitesi üzerine 6i bileşiminin etkisi

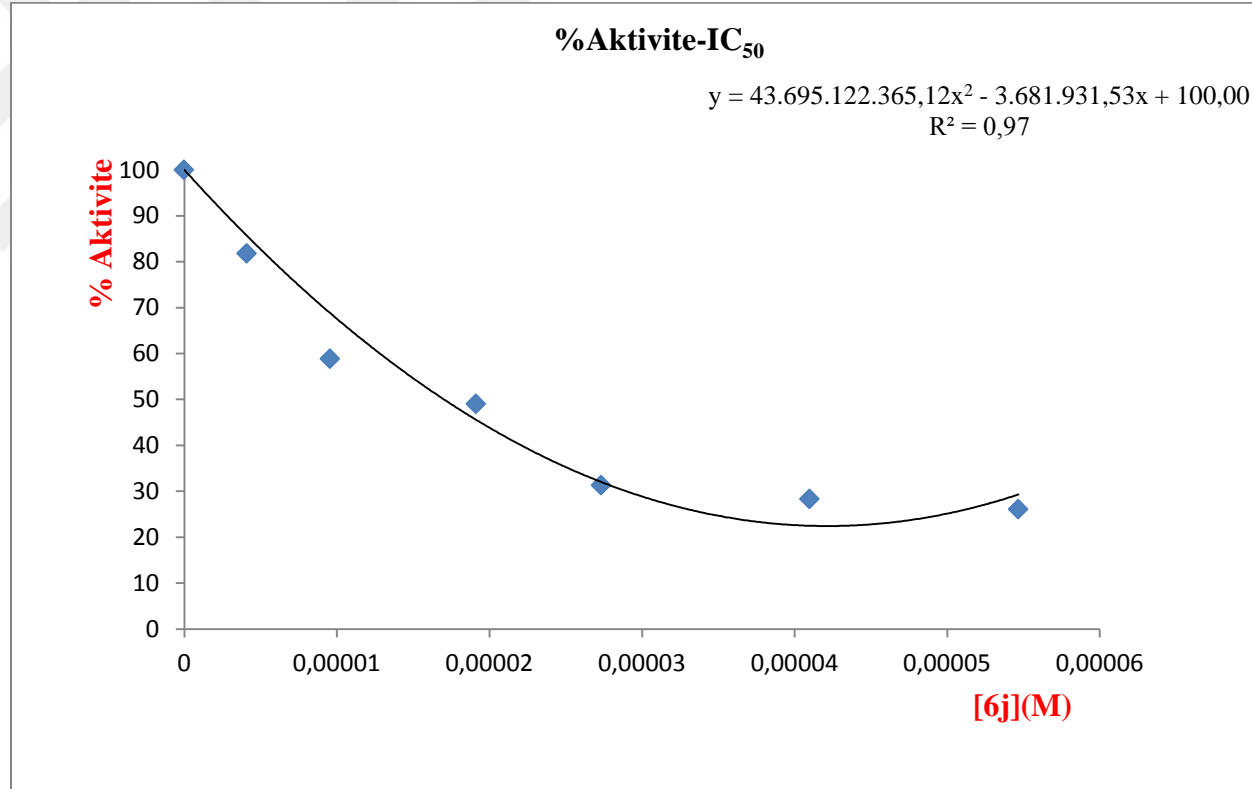
50 mM Tris-SO₄ tamponu (μL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (μL)	Saf Su Hacmi (μL)	6i Bileşimin Hacmi (μL)	Küvetteki 6i Bileşiminin Kons. (μg/μL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0353	0,235	86,716
750			200	35	9,57	0,0311	0,207	76,384
750			165	70	19,13	0,0273	0,182	67,159
750			135	100	27,33	0,0205	0,137	50,554
750			85	150	41,00	0,0195	0,130	47,970
750			35	200	54,67	0,0158	0,105	38,745



Şekil 4.11. 6i kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6i] grafiği

TABLO 4.11. BCA enzim aktivitesi üzerine 6j bileşiminin etkisi

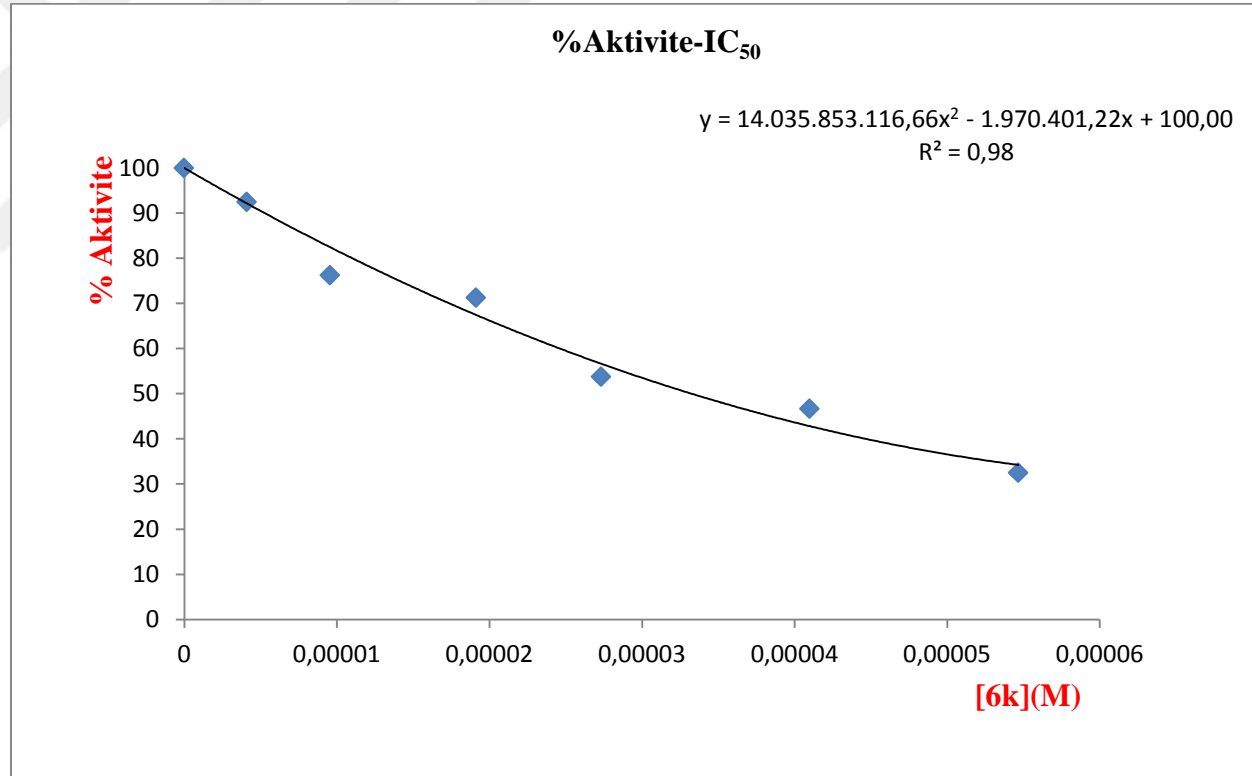
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6j Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6j Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0332	0,221	81,550
750			200	35	9,57	0,0239	0,159	58,672
750			165	70	19,13	0,0199	0,133	49,077
750			135	100	27,33	0,0127	0,085	31,365
750			85	150	41,00	0,0115	0,077	28,413
750			35	200	54,67	0,0106	0,071	26,199



Şekil 4.12. 6j kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6j] grafiği

TABLO 4.12. BCA enzim aktivitesi üzerine 6k bileşiminin etkisi

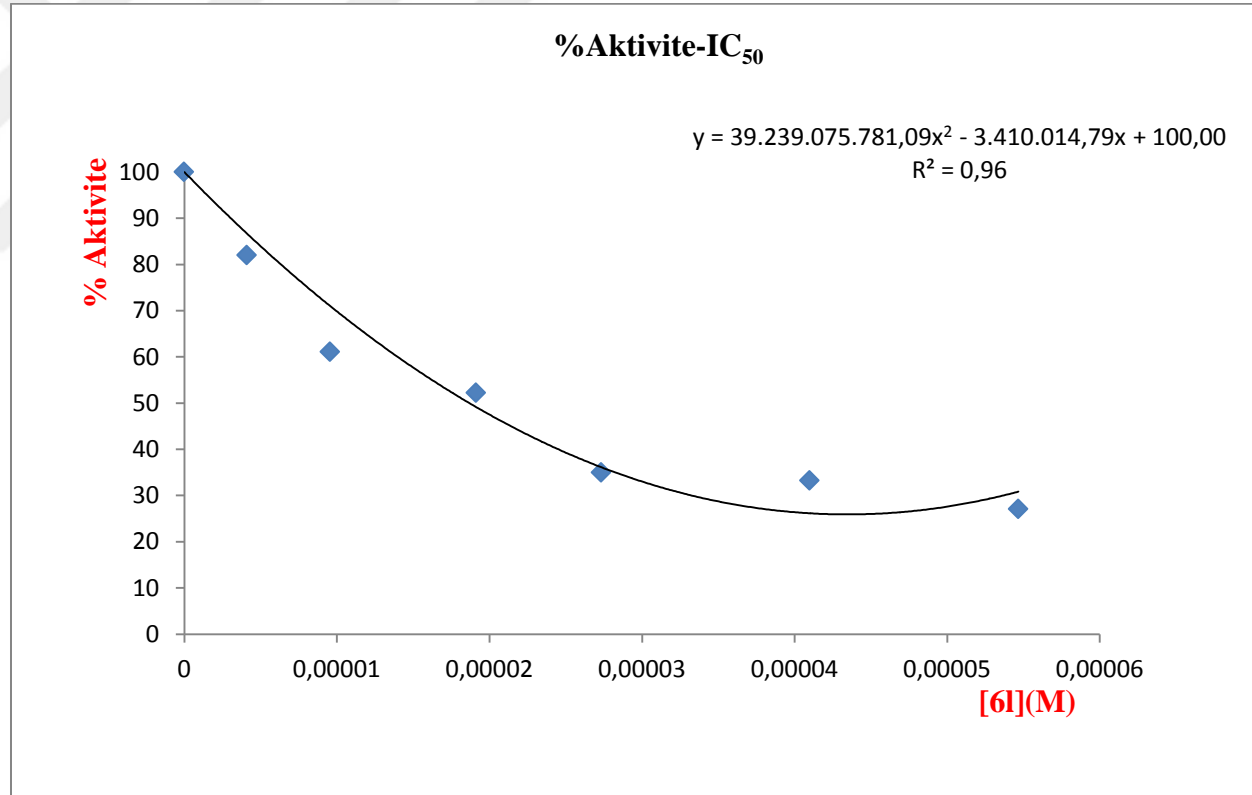
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6k Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6k Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,160	100,000
750			220	15	4,10	0,0336	0,148	92,500
750			200	35	9,57	0,0262	0,122	76,250
750			165	70	19,13	0,0224	0,114	71,250
750			135	100	27,33	0,0160	0,086	53,750
750			85	150	41,00	0,0148	0,075	46,875
750			35	200	54,67	0,0120	0,052	32,500



Şekil 4.13. 6k kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6k] grafiği

TABLO 4.13. BCA enzim aktivitesi üzerine 6l bileşiminin etkisi

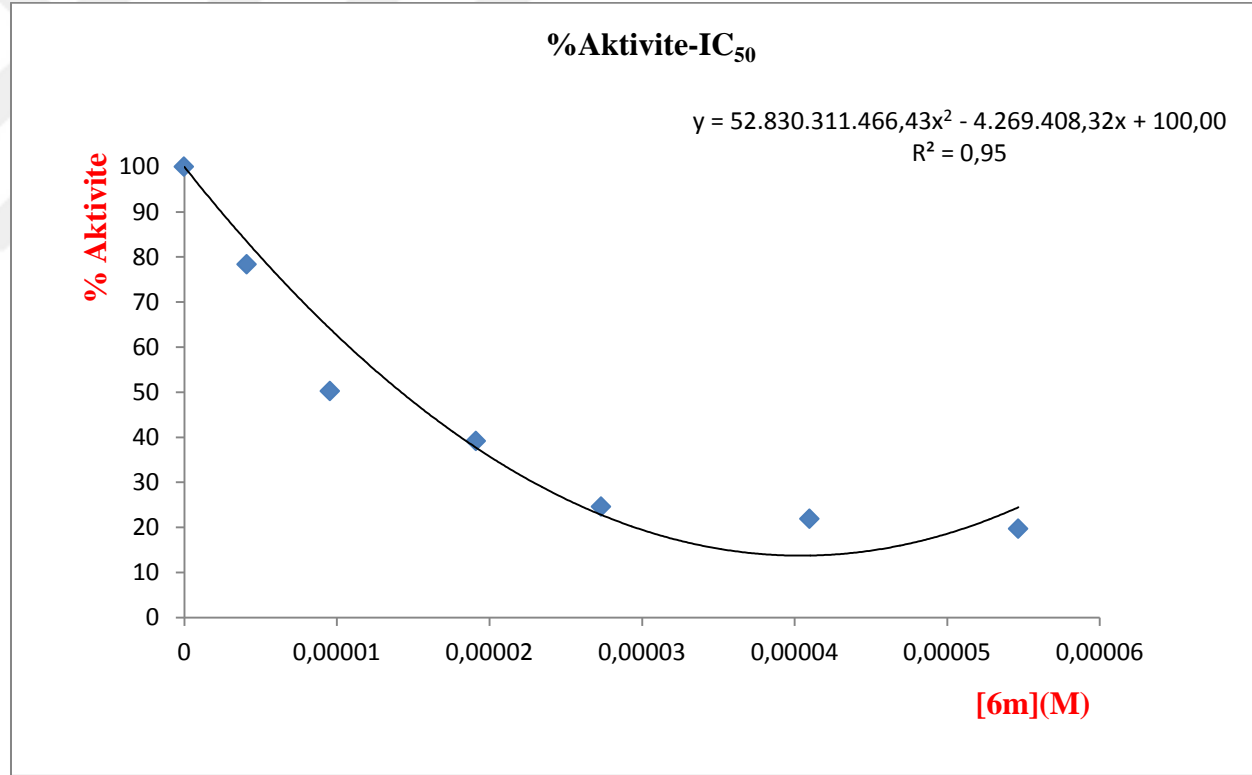
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6l Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6l Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0333	0,222	81,919
750			200	35	9,57	0,0248	0,165	60,886
750			165	70	19,13	0,0212	0,141	52,030
750			135	100	27,33	0,0142	0,095	35,055
750			85	150	41,00	0,0135	0,090	33,210
750			35	200	54,67	0,0110	0,073	26,937



Şekil 4.14. 6l kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6l] grafiği

TABLO 4.14. BCA enzim aktivitesi üzerine 6m bileşiminin etkisi

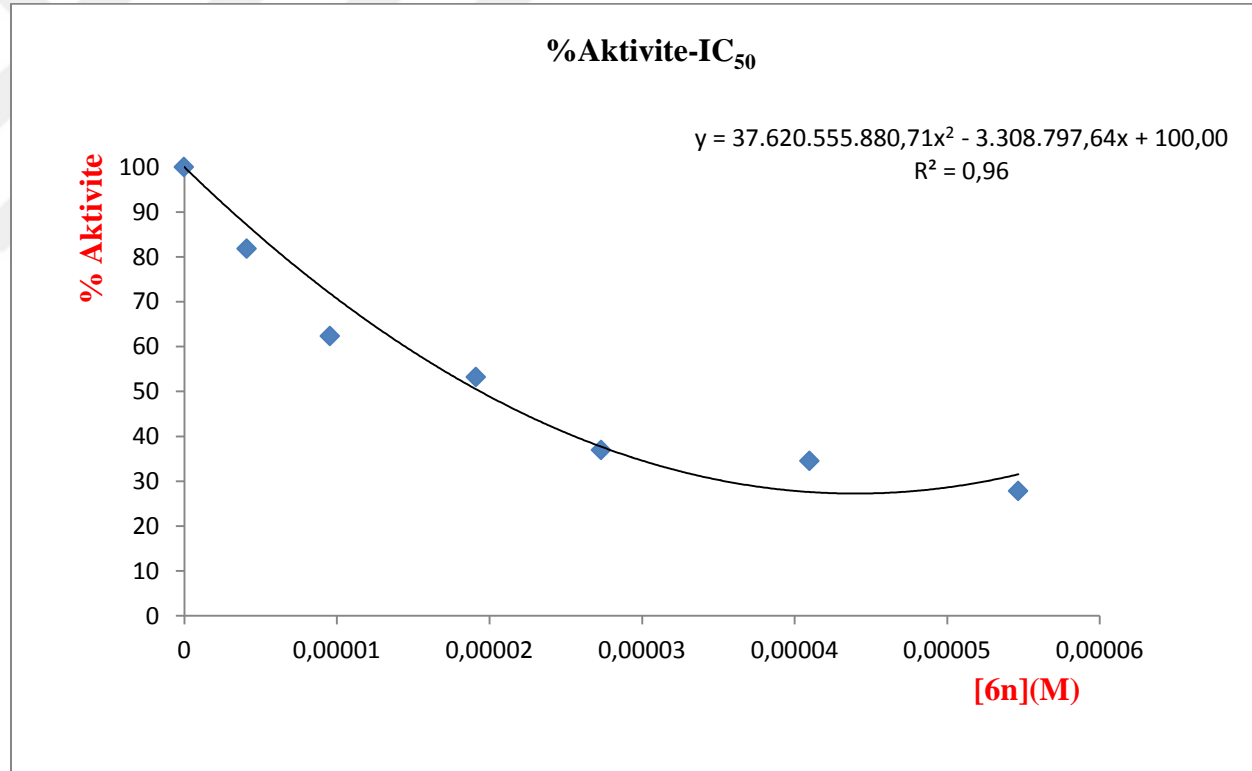
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6m Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6m Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0318	0,212	78,229
750			200	35	9,57	0,0204	0,136	50,185
750			165	70	19,13	0,0159	0,106	39,114
750			135	100	27,33	0,0100	0,067	24,723
750			85	150	41,00	0,0089	0,059	21,771
750			35	200	54,67	0,0080	0,053	19,557



Şekil 4.15. 6m kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6m] grafiği

TABLO 4.15. BCA enzim aktivitesi üzerine 6n bileşiminin etkisi

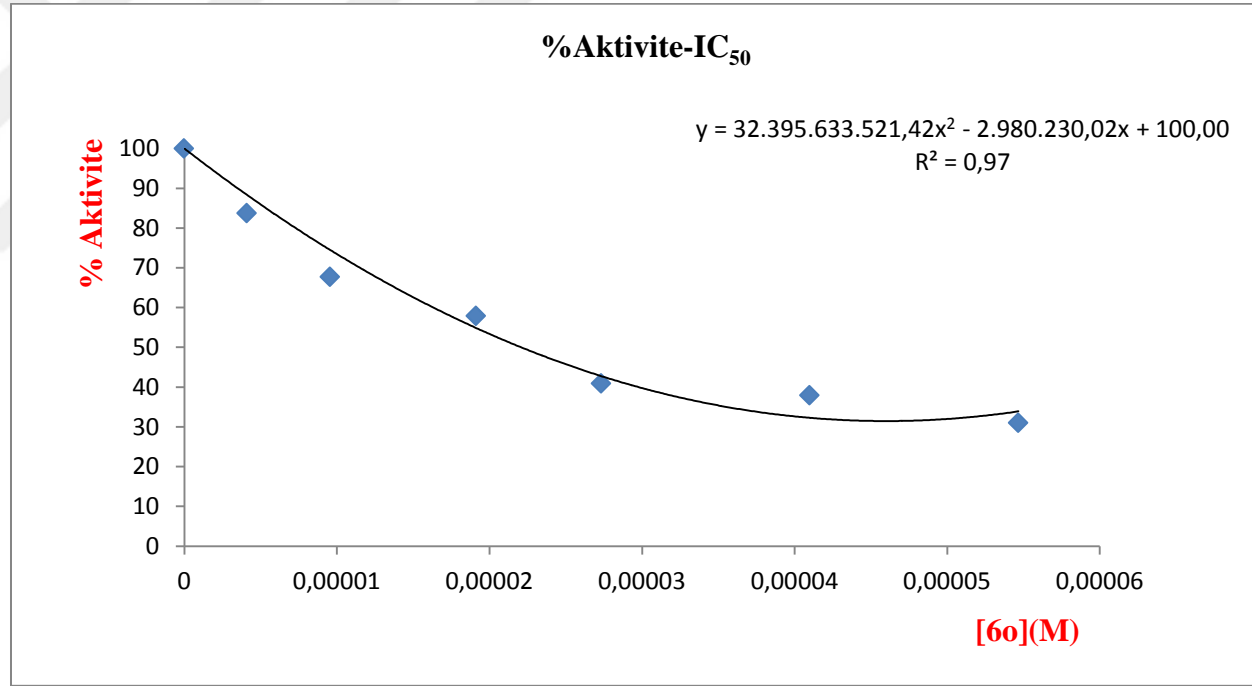
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6n Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki 6n Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0332	0,221	81,550
750			200	35	9,57	0,0253	0,169	62,362
750			165	70	19,13	0,0216	0,144	53,137
750			135	100	27,33	0,015	0,100	36,900
750			85	150	41,00	0,014	0,093	34,317
750			35	200	54,67	0,0113	0,075	27,675



Şekil 4.16. 6n kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6n] grafiği

TABLO 4.16. BCA enzim aktivitesi üzerine 6o bileşiminin etkisi

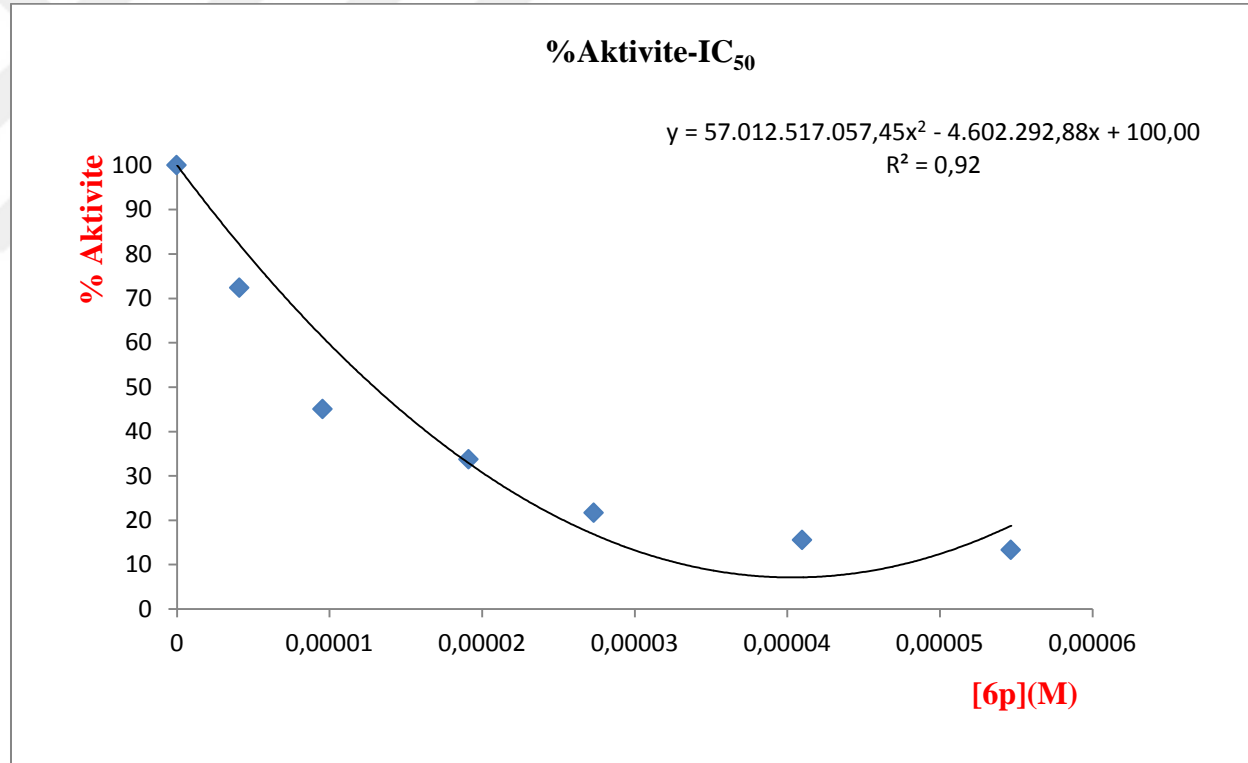
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6o Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6o Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,034	0,227	83,764
750			200	35	9,57	0,0275	0,183	67,528
750			165	70	19,13	0,0235	0,157	57,934
750			135	100	27,33	0,0166	0,111	40,959
750			85	150	41,00	0,0154	0,103	38,007
750			35	200	54,67	0,0126	0,084	30,996



Şekil 4.17. 6o kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6o] grafiği

TABLO 4.17. BCA enzim aktivitesi üzerine 6p bileşiminin etkisi

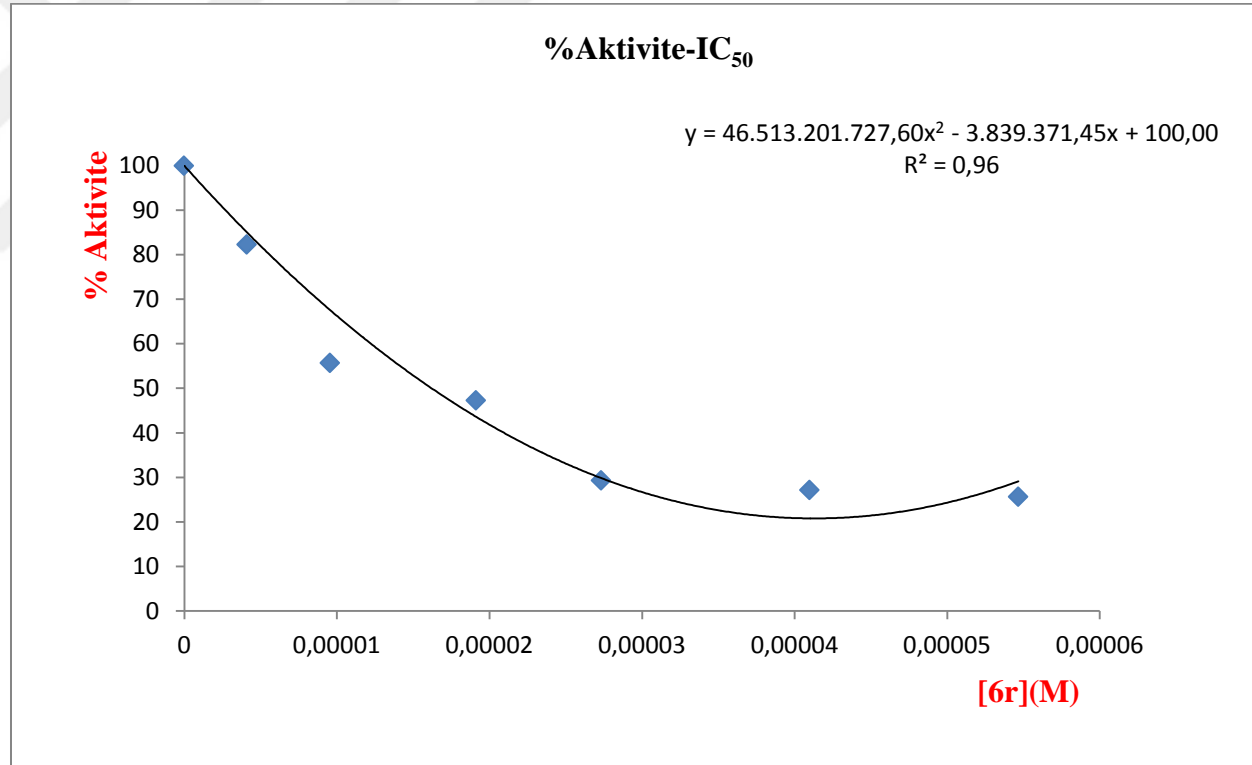
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltilisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6p Bileşiminin Hacmi (µL)	Küvetteki 6p Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0294	0,196	72,325
750			200	35	9,57	0,0183	0,122	45,018
750			165	70	19,13	0,0137	0,091	33,579
750			135	100	27,33	0,0088	0,059	21,771
750			85	150	41,00	0,0063	0,042	15,498
750			35	200	54,67	0,0054	0,036	13,284



Şekil 4.18. 6p kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6p] grafiği

TABLO 4.18. BCA enzim aktivitesi üzerine 6r bileşiminin etkisi

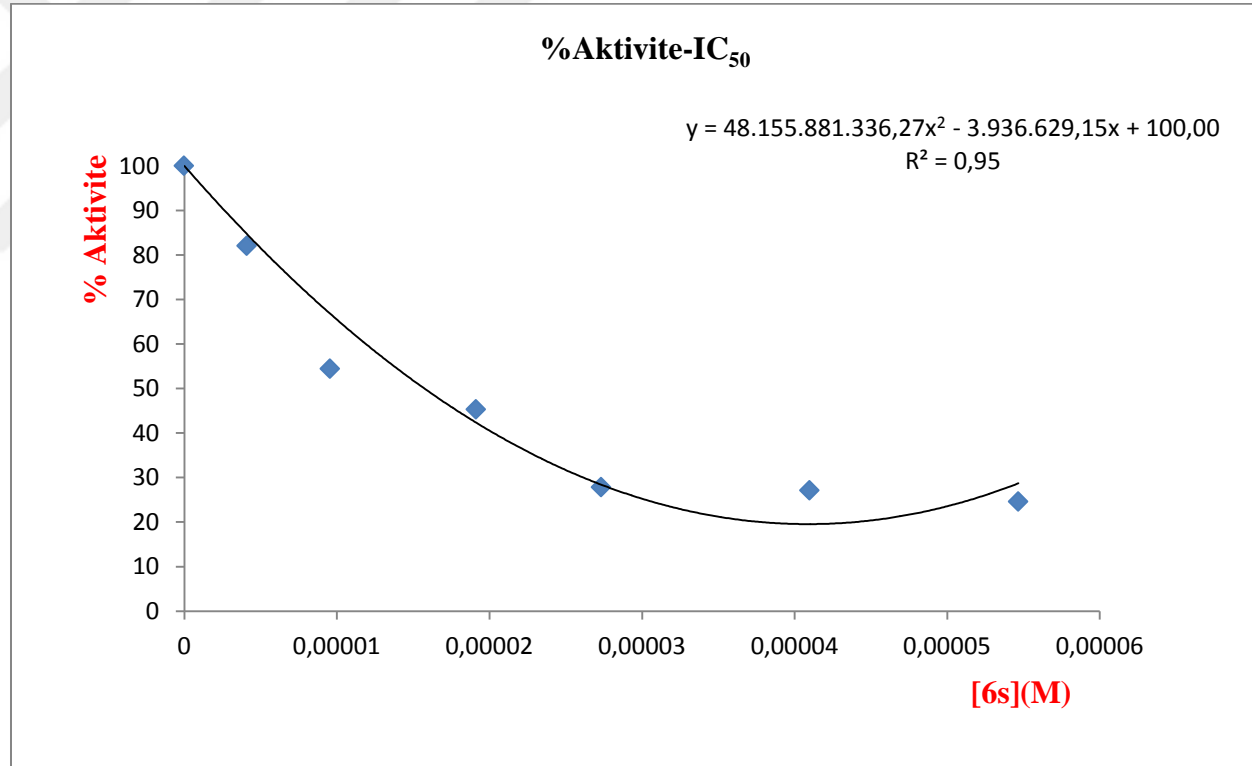
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6r Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6r Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0334	0,223	82,288
750			200	35	9,57	0,0226	0,151	55,720
750			165	70	19,13	0,0192	0,128	47,232
750			135	100	27,33	0,0119	0,079	29,151
750			85	150	41,00	0,011	0,073	26,937
750			35	200	54,67	0,0104	0,069	25,461



Şekil 4.19. 6r kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6r] grafiği

TABLO 4.19. BCA enzim aktivitesi üzerine 6s bileşiminin etkisi

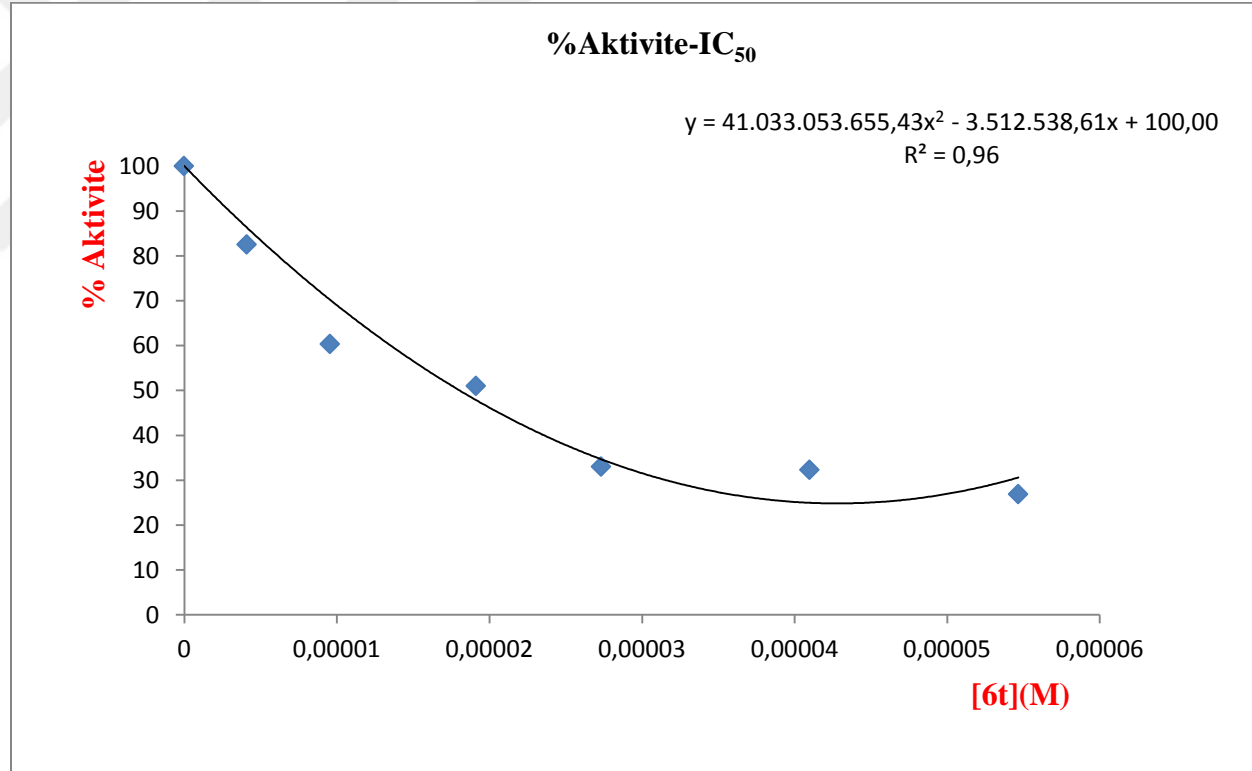
50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6s Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6s Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0333	0,222	81,919
750			200	35	9,57	0,0221	0,147	54,244
750			165	70	19,13	0,0184	0,123	45,387
750			135	100	27,33	0,0113	0,075	27,675
750			85	150	41,00	0,011	0,073	26,937
750			35	200	54,67	0,01	0,067	24,723



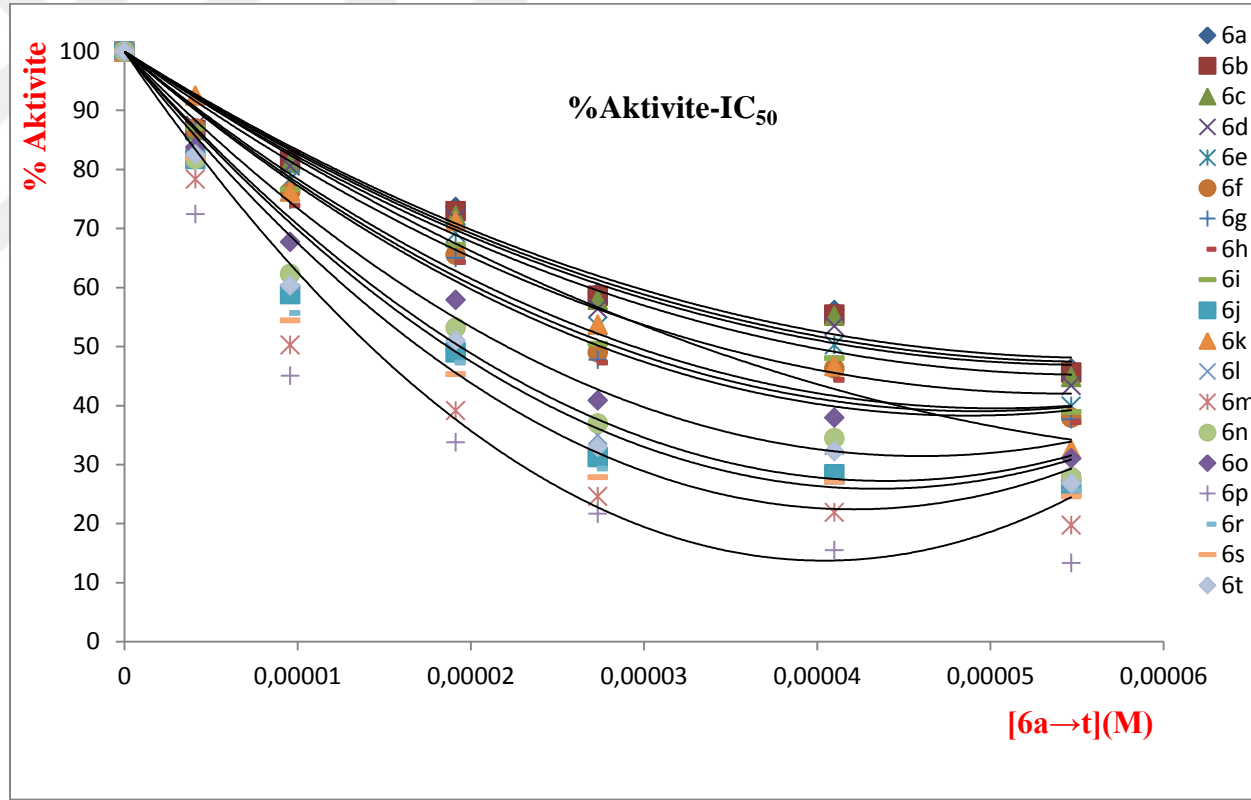
Şekil 4.20. 6s kodlu bileşiğe ait %Aktivite-[6s] grafiği

TABLO 4.20. 6t kodlu bileşimin BCA enzim aktivitesi üzerine etkisi

50 mM Tris-SO₄ tamponu (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	Saf Su Hacmi (µL)	6t Bileşimin Hacmi (µL)	Küvetteki 6t Bileşiminin Kons. (µg/µL)	ΔA (348 nm)	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
750	15	500	235	0	0	0,0406	0,271	100,000
750			220	15	4,10	0,0335	0,223	82,288
750			200	35	9,57	0,0245	0,163	60,148
750			165	70	19,13	0,0207	0,138	50,923
750			135	100	27,33	0,0134	0,089	32,841
750			85	150	41,00	0,0131	0,087	32,103
750			35	200	54,67	0,0109	0,073	26,937



Şekil 4.21. 6t kodlu bileşiğe ait % Aktivite-[6t] grafiği



Şekil 4.22. 6a→t kodlu bileşiklere ait % Aktivite-[6a→t] grafiği

Tablo 4.21. BCA enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren orijinal sentez oksadiazol türevlerinin IC₅₀ değerleri ve Cheng&Prosoff denkleminde hesaplanmış K_i değerleri

Madde kodu	IC₅₀ değeri (μM)	K_i (μM)
6a	45,77	8,74
6b	43,73	8,35
6c	42,18	8,05
6d	39,37	7,52
6e	34,20	6,53
6f	29,42	5,62
6g	28,37	5,42
6h	27,50	5,25
6i	31,16	5,95
6j	17,01	3,25
6k	22,07	4,21
6l	18,67	3,56
6m	14,20	2,71
6n	19,38	3,70
6o	22,10	4,22
6p	12,93	2,47
6r	16,20	3,09
6s	15,72	3,00
6t	18,03	3,44

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

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

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan BCA enzimi, Küfrevioğlu, Ö.İ. danışmanlığında, Arslan, O. Tarafından 1994’te 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 makriks seçiminde farklı makrikslerin 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 literatürde 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 bağına hidroliz etme yeteneğine dayanan bu yöntem Armstrong ve arkadaşlarınınca geliştirilmiştir [Armstrong ve ark. 1966]. p-Nitrofenil asetatın karbonik anhidraz enzimi vasıtasıyla p-nitrofenole hidroliz edilmesi ve p-nitrofenolün 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 tarafından çoğu kez araştırmalara konu olmuş ve halen araştırmalar devam etmektedir. [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 hastalıklarla 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 çalışmanın 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, bu sentezlenen bileşiklerin tümü 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 CA inhibitörlerinden oksadiazollerin yüksek hidrolitik ve metabolik kararlı yapıda olmaları, farmakokinetik davranışları ve gözlemlenen *in vivo* etkileri bu bileşiklerin ilaç endüstrisi yönünden önemli bir yere taşınmalarını sağlamıştır. Bu bağlamda çalışmamızda da kullanılan kimyasal yapılar orijinal sentez oksadiazollerden 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} ve Cheng&Prosoff denklemi ile K_i değerleri BCA enzimi için tespit edilmiştir.

Orijinal sentez bileşiklerin BCA enzimi için inhibisyon etkisi incelendiğinde 6p kodlu ve 4-(5-(4-(5-(3-florofenil-1,2,4-oksadiazol-3-yl)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-yl)benzensülfonamid isimli yapının $12,93 \mu M$ IC_{50} ve $2,47 \mu M$ K_i değerleri ile en iyi inhibitör olduğu saptanmıştır. Çalışmada kullanılan oksadiazol türevli diğer tüm bileşiklerin BCA enzimini farklı düzeylerde inhibe ettiği görülmüştür.

Aromatik ve heteroaromatik inhibitörlerin BCA enzimi için yapılan inhibisyon çalışmalarında enzimi inhibe ettiği açıkça görülmüştür. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatın enzimin aktif bölgesine çok yakın olan histidin amino asidinin imidazol halkasına bağlandığı literatürce bilinmektedir. Ayrıca sülfonamid inhibitörlerinin karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ye bağlı OH^- grubuna bağlandığı bilinmektedir. Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesine yakın amino asitlerle hidrojen bağı yapabilen sülfonamid türevli inhibitörler ve p-nitrofenil asetat, karbonik anhidraz enzime farklı bölgelerden bağlandıkları için aralarında bağlanma hususunda herhangi bir yarıştan bahsedilemez. Dolayısıyla karbonik anhidraz enziminin inhibisyon çalışmasında p-nitrofenil asetat substrat olarak kullanıldığında sülfonamid türevleri karbonik anhidraz enzimini nankompetitif olarak inhibe eder.

Sonuç olarak; 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 oksadiazol türevlerinin sığır eritrositlerinde oldukça fazla bulunan BCA enzimi üzerine inhibisyon etkileri araştırılmış olup bu bileşiklerin söz konusu enzime afinitelerinin farklı düzeylerde olsa da her birinin inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Alyar, S., Şen, C., Alyar, H., Adem, Ş., Kalkancı, A., Ozdemir, U.O., 2018. Synthesis, characterization, antimicrobial activity, carbonic anhydrase enzyme inhibitör 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.
- Anjos, J.V., Filho, R.A.V.N., Nascimento, S.C., Srivastava, R.M., Melo, S.J., Sinou, D. 2009. Synthesis and cytotoxic profile of glycosyl-triazole linked to 1,2,4-oxadiazole moiety at C-5 through a straight-chain carbon and oxygen atoms. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 3571-3176.
- Armstrong, J. Mc D., Myers, D.V., Verpoorte, J.A. and Edsall, J.T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 241(21), 5137-5149.
- Arslan, O., 1994. Glaucoma Hastalığı Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 16-28.
- Arslan, O., 2001. Inhibition of bovine carbonic anhydrase by new sulfonamide compounds, *Biochemistry*, 66, 1206-1208.
- Arslantaş, G., 2013. Bazı 3,5-Disubstitue -1,2,4-oksadiazol Bileşiklerinin Sentezi ve Sitotoksik Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Bursa, 4-6.
- Badger, M.R., Price, G.D., 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis, *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 369-392.
- Başaran, E., 2011. Sübstitüe Aminoasit Hidrazitinden Türeyen 1,2,4-triazol, 1,3,4-tiyadiazol ve 1,3,4-oksadiazol Türevlerinin Sentezi ve Yapı Karakterizasyonları, Yüksek Lisans Tezi, *Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gaziantep, 52-58.
- Beydemir S., Ciftci M., Ozmen I., Buyukokuroglu M. E., Ozdemir H., Kufrevioglu O. I., 2000. Effects of some medical drugs on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, *Pharmacology Research.*, 42, 187-191.
- Beydemir, S., Ciftci, M., Kufrevioglu O. I., Buyukokuroglu M. E., 2002. Effects of gentamisin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Bezerra, N.M.M., Oliveira, S.P., Srivastava, R.M., Da Silva, J.R. 2005. Synthesis of 3-aryl-5 decapentyl-1,2,4-oxadiazoles possessing antiinflammatory and antitumor properties. *II Farmaco*, 60: 955-960.
- Boström, J., Hogner, A., Llinàs, A., Wellner, E., Plowright, A.T. 2011. Oxadiazoles in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 55: 1817–1830.

- Bozkurt, E., 2012. *Nigella Sativa* (Çörek Otu)'nın Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Üzerinde Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kütahya, 5-6.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997. *Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri*, Adana, 438 s.
- 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 (IC_{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 anhydraseinhibitors. 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.
- 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.
- De Freitas, J.J.R., de Freitas, J.C.R, da Silva, L.P., de Freitas, F.J.R., Kimura, G.Y.V., Srivastava, R.M. 2007. Microwave-induced one-pot synthesis of 4-[3-(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-butan-2-ones under solvent free conditions. *Tetrahedron Letters*, 48: 6195-6198.
- Dodgson, S. J., Tashian, R. E., Gros, G., Carter, N. D., 1991. The Carbonic Anhydrases, Cellular Physiology and Molecular Genetics. *Plenum Press*, New York, pp.297-306.
- Dohle, W., Jourdan, F.L., Menchon, G., Protta, A.E., Foster, P.A., Mannion, P., Hamel, E., Thomas, M.P., Kasprzyk, P.G., Ferrandis, E. and 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.

- Dolman, S.J., Gosselin, F., O'Shea, P.D., Davies, I.W. 2006. Superior reactivity of thiosemicarbazides in the synthesis of 2-amino-1,3,4-oxadiazoles. *The Journal of Organic Chemistry*, 71, 9548-9551.
- Dökmeçi, İ., 1992. Farmakoloji. *Saray Kitabevleri*, İstanbul. 925s.
- Eldehna, W.M., Nocentini, A., Al-Rashood, S.T., Hassan, G.S., Alkahtani, H.M., Almezizia, 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. Diazabenzo [a] phenoxazone sulphonamides: synthesis, in-silico and in-vitro antimicrobial studies. *Medicinal Chemistry Research*, 27(11-12), 2482-2493.
- Feldstein J. B., Silverman D. N., 1984. Purification and characterization of carbonicanhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Foroughifar, N., Mobinkhaledi, A., Ebrahimi, S. 2010. A simple and efficient procedure for synthesis of optically active 1,3,4-oxadiazole derivatives containing Lamino acid moieties. *Turkish Journal of Chemistry*, 34, 603-611.
- Gallardo, H., Cristiano, R., Vieira, A.A., Neves Filho, R.A.W., Srivastava, R.M., Bechtold, I.H. 2008. *Liquid Crystals*, 35: 857.
- 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.
- Guyton, A.C. and Hall, J.E., 1996. Eye. In: *Textbook of medical physiology*. Sanders W.B., Philadelphia, 632-633.
- Hewett-Emmett, D., 2000. In *The Carbonic Anhydrase - New Horizons*. Birkhauser Verlag, Basel, 29-78.
- İnan, Y. ve Gül, M., 2001. Biyokimya, *Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.*, Adana, 447 s.
- Jabusch, J.R., ve Deutsch, H.F., 1989. Lacolization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238, 170s.
- Jakopin, Z., Roskar, R., Dolenc, M.S. 2007. Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. *Tetrahedron Letters*, 48: 1465-1468.
- Kaim, L.E., ve Menestrel, I.L., orgentin, R. 1998. Trichloroacetic acid hydrazones I. New formation of 1,3,4-oxadiazoles from aldehydes. *Tetrahedron Letters*, 39, 6885-6888.
- Kaiser, E.T., ve Lo, K.W., 1969. The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2 hydroxy-5- nitrotoluen sulfonic sultane, *Journal of the Amemrikcan Chemical Society*, 91, 4912 s.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, B., Nizamlıoğlu, M., Baspınar, N. ve Tiftik, M.A., 2006. Biyokimya, *Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara, 654 s.
- Katritzky, R, A., Mohapatra, P.P., Huang, L. 2008. 1,3,4-Oxadiazoles from functionalized N-acylbenzotriazoles and acyl hydrazides. *Arkivoc*, (ix), 62-68.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004. Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, Erzurum. 642 s.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.Ğ., 2009. Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, Erzurum. 637-345 s.
- Kemnitzer, W., Kuemmerle, J., Zhang, H., Kasibhatla, S., Tseng, B., Drewe, J., Cai, S.X. 2009. Discovery of 3-aryl-5-aryl-1,2,4-oxadiazoles as a new series of apoptosis inducers. 2. Identification of more aqueous soluble analogs as

- potential anticancer agents, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19: 4410–4415.
- Khan, K.M., Ulah, Z., Rani, M., Perveen, S., Haider, S. M., Choudhary, M.I., Rahman, A.U., Voelter, W. 2004. Microwave-assisted Synthesis of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles. *Letters in Organic Chemistry*, 1, 50-52.
- Kocabalkanli, A., Ateş, Ö., Ötük, G. 2001. Synthesis and evaluation of antibacterial activity of some 2-[[α -(4-substituted benzoyloxy)- α -phenylacetyl or methylacetyl]amino]-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazoles. *II Farmaco*, 56, 975-979.
- Koyuncu, I., Gonel, A., Durgun, M., Kocyigit, A., Yuksekdog, 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.
- Krungkrai S. R., Suraveratum N., Rochanakij S., Krungkrai J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in Plasmodium falciparum. *International Journal for Parasitology*, 31, 661-668.
- Kulkarni, V.S., M.D., Lele, Gavitre, B.B., Patil, M.D., Bobe, K.R., Gaikwad, D.T.(2010). Oxadiazole: A new profile of biological activities. *International Journal of Drug Formulation & Research*, 1, 134-166.
- Kumar, D., Patel, G., Johnson, E.O., Shah, K. 2009. Synthesis and anticancer activities of novel 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19: 2739-2741.
- Kumar, S. 2010. Anodic synthesis, spectral characterization and antimicrobial activity of novel 2-amino-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55, 126-129.
- Kuzucu M., 2011. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerine bazı ilaçların in vitro etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Erzincan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzincan.
- Laemmli, D. K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 p.
- 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, 169-172p.
- Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., 2005. Principles of Biochemistry, 3. Baskıdan çeviri (Çeviri editörü: Kılıç N.), *Palme Yayıncılık*, Ankara.
- Leite, A. C. L., Vieira, R. F., de Faria, A. R., Wanderley, A. G., Afiatpour, P., Ximenes, E.C., Srivastava, R. M., de Oliveira, C. F., Medeiros, M.V., Antunes, E., Brondani, D. J. 2000. Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activities of new 1,2,4-oxadiazoles peptidomimetics. *II Farmaco*, 55: 719–724.
- Leppilampi, M., 2006. Functional and Immunohistological Studies on Cancer Associated Carbonic Anhydrase IX, Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry, Department of Pathology, University of Oulu.
- Lesburg, C. A. ve Christianson, D. W., 1995. X-ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein-zinc binding site. *Journal of the American Chemical Society*, 117 6368-6844 s.
- Lindskog, S., 1997. Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase, *Pharmacology and Therapeutics*, 74, (1), 1-20.

- Maren, T.H., Jankowska, L., Sanyal, G., Edelhauser, H.F., 1983. The Transcorneal permeability of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion, *Experimental Eye Research*, 36, 457- 480.
- 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 p.
- 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.
- Mc Intosh, J. E. A., 1970. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit, *Journal Biochemistry*, 120,299.
- 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.
- 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.
- 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.
- Morrison, J.C. and Pollack, P.I., 2003. Glaucoma science and practice, *Thieme*, New York, 530 p.
- 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.
- Netland, P.A., 2008. Glaucoma medical therapy, *Oxford University Press Inc.*, 290 s.
- Oyston, S., Wang, C., Hughes, G., Batsanov, A.S., Perepichka, I.F., Bryce, M.R., Ahn, J.H., Pearson, C., Petty, M.C. 2005. New 2,5-diaryl-1,3,4-oxadiazole-fluorene hybrids as elektron transporting materials for blenden-layer organic light emitting diyotes. *Journal of Material Chemistry*, 15: 194-203.
- 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.
- Özensoy, Ö., Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Safılaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Balıkesir, 2002.
- Palaska, E., Şahin, G., Kelicen, P., Durlu, N.T. ve Altınok, G. 2002. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *II Farmaco*, 57, 101-107.
- Para, M., Hidalgo, P., Carrasco, E., Barbera, J., Silvino, L. 2006. New 1,2,4- and 1,3,4-oxadiazole materials: synthesis, and mesomorphic and luminescence properties. *Liquid Crystals*, 33(8): 875-882.

- Parui, R., Gambir, K.K., Mehrotra, P.P., 1991. Changes in carbonic anhydrase may be the initial step of altered metabolism in hypertension, *Biochemistry International*, 23, 779-789.
- Polshettiwar, V. and Varma, R.S. 2008. Greener and rapid access to bio-active heterocycles: one-pot solvent-free synthesis of 1,3,4-oxadiazoles and 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron Letters*, 49, 879-883.
- Rajak, H., Kharya, M. D. ve Mishra, P. 2011. Biologically active 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles. *Cheminform*, 42, 21-58.
- Reed, M.L., Graham, D., 1981. Carbonic anhydrase in plants: distribution, properties and possible physiological roles. In: Reinhold L, Harborne JB, Swain T (eds) *Progress in phytochemistry*, Pergamon Press, Oxford, 47-94.
- 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.
- Rostom, S.A.F., Shalaby, M.A. El-Demellway, M.A. 2003. Polysubstituted pyrazoles, part 5. Synthesis of new 1-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1H-pyrazole-3-carboxylic acid hydrazide analogs and some derived ring systems. A novel class of potential antitumor and anti-HCV agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 959-974.
- Segel, H.I., 1976. *Biochemical Calculations*, John Wiley and Sons, USA, 441 p.
- Sethi K.K., Verma SM, Tanç M, Carta F, Supuran CT. 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II and VII with benzene sulfonamides incorporating 4,5,6,7-tetrachlorophthalimide moiety, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(17):5168-74.
- Shailaja, M., Anitha, M., Manjula, A. Rao, V. 2010. Synthesis and biological activity of novel 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles. *Indian Journal of Chemistry*, 49B, 1088-1097.
- Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies, *Annual Review of Biochemistry*, 67, 375-401.
- Smith, K.S., Jakubzuck, C., Whittman, T.S., Ferry, L.G., 1999. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme wide spread in prokaryotes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 15185–15189.
- Smith, K.S., and Ferry J.G., 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases, *FEMS Microbiology Reviews*, 24,335-366.
- Smith, K. S., Cosper, N.J., Stalhandske, C., Scott, R.A., Ferry, J.G., 2000. Structural and Kinetic Characterization of an Archaeal B-Class Carbonic Anhydrase, *Journal of Bacteriology*, 182, (23), 6605.
- Splendiani, G. and Condò S. 2006. Diuretic therapy in heart failure. *Giornale Italiano di Nefrologia*, 34: S74-6.
- Sugrue, M.F., 2000. *Progresses in Retinal and Eye Research*, 19, 87.
- Sultemeyer, D., Schmidt, C., Fock, H., 1993. Carbonic anhydrase in higher plants and aquatic microorganisms, *Plant Physiology*, 88, 179-190.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors –Part 94.1,3,4Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 9, 867-874.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Current Medicinal Chemistry*, 1, 61-97.

- Supuran, C.T. and Scozzafava, A. 2007. Carbonic anhydrase as targets for medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4336-4350.
- Supuran, C.T., 2010. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms, *Molecular Diversity*, 15, 305-316.
- Supuran, C.T. and Capasso, C. 2014. The η -class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Target*, 12: 1-13.
- Sureshbabu, V.V., Hemantha, H.P., Naik, S.A. 2008. Synthesis of 1,2,4-oxadiazole-linked orthogonally urethane-protected dipeptide mimetics. *Tetrahedron Letters*, 49: 5133-5136.
- Şahin, G., Palaska, E., Ekizoğlu, M. Özalp, M. 2002. Synthesis and antimicrobial activity of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. *II Farmaco*, 57, 539-542.
- Şahin, A., 2008. Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinitive Jelinin Sentezi ve Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, 10-11.
- Tashian, R.E., Hewett-emmett, D., Goodman, M. 1983. On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III, Isozymes. *Current Topics in Biological and Medical Research*, 7, 79-100.
- Tunca, E., 2012. Yeni Akridin Türevlerinin Antiglokom Etkisinin *iv vitro* Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kütahya, 19-25.
- Turaçlı, M.E., 2004. Açık açılı glokomların epidemiyolojisi ve risk faktörleri. *Türkiye Klinikleri Oftalmoloji Dergisi*. 13;1, 1-6.
- 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. And Edsall, J. T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221 p.
- 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.
- Yazıcıoğlu, M., 2013. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun, 3-5.
- Ziemer, R.C., 1996. Circadian variations in intraocular pressure. Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T., *The Glaucomas*. Volume 1, Mosby, st. Louis, 429-445.
- Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., 1948. Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase, *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147.
- Wilbur, K.M., Saleuddin, A.S.M., 1983. Shell formation. In: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca*, volume 4. *Academic Press*, New York, 235-287.
- Url-1< <http://www.parkgozmerkezi.com/pages/hizmetlerimiz/glokom-goz-tansiyonu>>, [Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2018].

EKLER

EK-1

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

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

Araştırmanın Adı: Bazı Oksadiazol Sübstitüye Türevli Bileşiklerin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine In Vitro Etkilerinin Araştırılması

Title of the Research: The Effects of Oxadiazole Substituent-Derived 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):* Abdülbaki EYBEK

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:* 25.04.2017
Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / *Proposed Research Completion Date:* 25.01.2018
Dosya no / *File no:* 2017/19

Karar:
Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmektedir. Tarih: 19/04/2017; Karar no: 2017/04/05

Decision:
The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 19/04/2017; Decision number 2017/04/05

BAŞKAN
Prof. Dr. Nihat ŞİNDAK

ÜYE
Doç. Dr. Ayhan YILMAZ

ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Behçet İNAL

ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Nasip ÖZALTAŞ

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

RAPORTÖR
Araş. Gör. Ali GÜLAYDIN
ÜYE (Sivil)

Ahmet ASLAN

Ayşegül KESİCİ

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Abdalbaki EYBEK
Doğum Yeri ve Tarihi : ERUH – 03.01.1992
Telefon : 05415891855
E-posta : eybek73@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Şırnak Lisesi-Merkez-Şırnak	2009
Üniversite	: Siirt Üniversitesi-Merkez-Siirt	2014
Yüksek Lisans	:	
Doktora	:	

Yıl	Kurum	Görevi
2018-	Özel Neo Lisesi	Öğretmen

İŞ DENEYİMLERİ

UZMANLIK ALANI : Kimya (Biyokimya), C Sınıfı İSG Uzmanı

YABANCI DİLLER : İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR