



**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I-II) ÜZERİNE
4-METİLBENZENSÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN İNHİBİSYON
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Asiye EFE

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

AĞRI-2017

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA BİLİM DALI

Asiye EFE

**İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I-II)
ÜZERİNE 4-METİL BENZENSÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN
İNİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

AĞRI-2017

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA I-II) Üzerine 4-Metilbensülfonamid Türevlerinin İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

Tezimin 3 yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

24.07.2017

Asiye EFE



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I-II) ÜZERİNE 4-METİLBENZENSÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU danışmanlığında, Asiye EFE tarafından hazırlanan bu çalışma, 24/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak *oybirliği* ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve .../.../... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

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

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü 04100 Ağrı Telefon: +90 (472) 215 50 82

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (hCA I-II) ÜZERİNE 4-METİLBENZENSÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

2017, 70+xiii Sayfa

Jüri: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Karbonik anhidrazlar (CA'lar), karbondioksit ve su arasındaki reaksiyonu katalize eden metaloenzimlerdir. Bu çalışmada, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve 4-metilbenzen-sülfonamid türevlerinin, enzimlerin esteraz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla öncelikle hCA I ve hCA II izoenzimleri insan taze kanından Sefaroz-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. hCA I ve hCA II izoenzimleri sırasıyla 97,05 ve 468,90 kat saflaştırıldı ve %67,82, %49,27 verimle elde edildi. Daha sonra, IC₅₀ değerlerini bulmak için esteraz aktivitesi kullanılarak sülfonamid türevlerinin insan karbonik anhidraz izoenzimi I ve II üzerine inhibisyon etkileri araştırıldı ve (%) Aktivite-[Sülfonamid] grafikleri çizildi. Elde edilen grafiklerden yararlanılarak **1-9** numaralı sülfonamid türevlerinin hCA I ve hCA II için IC₅₀ değerleri bulundu. hCA I-II için IC₅₀ değerleri sırasıyla 0,770-5,196 nM ve 18,887-56,862 nM aralığındadır.

Anahtar kelimeler: Enzim, hCA I-II, IC₅₀, inhibisyon, karbonik anhidraz, sülfonamid.

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECT OF 4-METHYLBENZENE SULFONAMIDE DERIVATIVES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (hCA I-II)

Advisor: Assist. Prof. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

2017, Page: 70+xiii

Juries: Assoc. Prof. Murat ŞENTÜRK

Assist. Prof. Dr. Emir Alper TÜRKOĞLU

Assist. Prof. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ

Carbonic anhydrases (CAs) are metalloenzymes that catalyze the reaction between carbon dioxide and water. In this study, it was aimed to investigate the purification of hCA I and hCA II isoenzymes from human erythrocytes and the effects of certain 4-methylbenzenesulfonamide derivatives on the esterase activity of enzymes. For this purpose, firstly, hCA I and hCA II isoenzymes were purified from human fresh blood by Sepharose-4B-L-tyrosine sulfanilamide affinity column chromatography. The hCA I and hCA II isoenzymes were purified 97,05 and 468,90 fold and obtained with %67,82, %49,27 yield, respectively. Subsequently, the inhibitory effects of sulfonamide derivatives on human carbonic anhydrase isoenzymes I and II were investigated using esterase activity and plotted (%) Activity-[Sulfonamide] graphs to find IC_{50} values. Utilizing the obtained graphs, IC_{50} values for hCA I and hCA II of the **1-9** numbered sulfonamide derivatives were found. The IC_{50} values for hCA I-II are in the range of 0,770-5,196 nM and 18,887-56,862 nM, respectively.

Key words: Carbonic anhydrase, enzyme, hCA I-II, IC_{50} , inhibition, sulfonamide.

ÖNSÖZ

İlk belirtisi 1920'lerin sonunda görülen ve daha sonraki yıllarda enzim olduğu keşfedilen karbonik anhidraz enzimi, Lindskog tarafından 1960'da ilk kez sığır eritrositlerinden saflaştırılmıştır. Metabolik bir enzim olan CA, karbondioksitin bikarbonata dönüşen hidrasyonunu katalizleyen ve biyomineralizasyon sürecinde yer alan metaloenzimdir. Ayrıca birçok biyosentetik, fizyolojik ve patolojik süreçte de rol oynar.

Çalışmamızda 4-metilbensülfonamid türevlerinin saflaştırılan insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I-II) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla çalışmanın giriş bölümünde enzimlerle ilgili genel bilgi verildikten sonra karbonik anhidraz enzimi tanıtılmıştır. Materyal ve metod bölümünde, kullanılan materyaller ve çalışma yöntemi hakkında bilgi verilmiştir. Son bölüm olan sonuç ve önerilerde ise elde edilen sonuçlar üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmanın tamamlanmasında ve yüksek lisans öğrenimim süresince bana yol gösteren, tecrübelerinden faydalandığım ve her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın **Yrd. Doç. Dr. Emir Alper TÜRKÖĞLU**'na teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında yardımını esirgemeyen hocam Sayın **Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK**'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde benden desteğini esirgemeyen aileme, **Şerife BAVLI**'ye sevgilerimi sunarım.

Tezimi, merhum babam **İbrahim EFE**'ye ithaf ediyorum.

24 / 07 / 2017

Asiye EFE

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.1.1. Enzimlerin özellikleri	1
1.1.2. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler	2
1.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması	3
1.1.4. Enzim aktivitesinin inhibisyonu	4
1.1.5. Enzim reaksiyon kinetiği	4
1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi	5
1.2.1. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları ve dağılımı	6
1.2.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	10
1.2.3. Karbonik anhidraz enziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri	11
1.2.4. Karbonik anhidraz enziminin üç boyutlu yapısı	12
1.2.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik, inhibisyon ve aktivasyon mekanizması	13
1.3. Sülfonamidler	19
1.4. Çalışmanın Amacı	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL VE METOD	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	27
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	27
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanması	28
3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini	29
3.2. Metodlar	29
3.2.1. Protein tayini	29
3.2.2. Enzim aktivitesi tayini	30
3.2.3. Enzim saflaştırma çalışmaları	31
3.2.4. hCA enzimi için IC ₅₀ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar	33
3.3. Sülfonamid Türevlerinin Sentezi.....	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik	34

4.2. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine Sülfonamid Türevlerinin Etkilerinin Belirlenmesi için Yapılan Çalışmaların Sonuçları ..	34
4.2.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevleri ile ilgili sonuçlar	34
4.2.2. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevleri ile ilgili sonuçlar	39
4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevlerinin IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar.....	44
4.2.4. İnsan eritrosit CA I-II enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları	46
4.3. Sentezlenen Bileşiklerin ¹ H- ¹³ C NMR'ları	47
4.3.1. Kimya	47
4.3.2. Sülfonamid türevlerinin sentezleri için genel metod.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMS	Akut dağ hastalığı
ATP	Adenozin trifosfat
AZA	Asetazolamid
bCA	Sığır karbonik anhidraz
BRZ	Brinzolamid
°C	Santigrat derece
CA	Karbonik anhidraz enzimi
CAA	Karbonik anhidraz aktivatörü
CAI	Karbonik anhidraz inhibitörü
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
CAT	Katalaz
CM	Karboksimetil
cm	Santimetre
DCP	Diklorofenamid
DEAE	Dietilaminoetil
DZA	Dorzolamid
E	Enzim
E-A	Enzim-Aktivator
EC	Enzim kod numarası
EP	Enzim-ürün kompleksi
ES	Enzim-substrat kompleksi
EZA	Etokzolamid
G	Gram
g	Yer çekimi ivmesi
GİB	Göz iç basıncı
GST	Glutasyon S-transferaz
GTP	Guanozin trifosfat
hCA	İnsan karbonik anhidraz enzimi
I	İnhibitör

IC ₅₀	Enzim inhibisyonunu yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
IND	Indisulam
kDA	Kilo dalton
K _m	Michaelis Menten sabiti
k ₁ ,k ₂ ,k ₃	Hız sabitleri
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
Mhz	Megahertz
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MZA	Metazolamid
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
P	Reaksiyon ürünü
pK _a	Asitlik sabiti K _a 'nın eksi logaritması
ppm	Milyonda birlik birim
S	Substrat
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TEMED	Tetrametiletillen diamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan
V _{max}	Maksimum hız
V ₀	İlk hız
ZBG	Çinko bağlama grubu
ε	Epsilon
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 1.1. Enzim katalizli kimyasal reaksiyon	1
Şekil 1.2. Karbondioksitin (CO ₂) hidrasyonu ve dehidrasyonu.....	11
Şekil 1.3. Karbonik anhidrazlarda metal iyon koordinasyonu.....	13
Şekil 1.4. α-CA'ların katalitik (fizyolojik reaksiyon için), inhibisyon (çinko bağlayıcılarla) ve aktivasyon mekanizması (hCA I'in aktif bölgesindeki çinko ile etkileşen amino asitlerin numaralandırması).....	14
Şekil 1.5. İnhibitör bağlanma modelleri	17
Şekil 1.6. Sülfonamidlerin genel yapısı	20
Şekil 1.7. Klinikte kullanılan birincil sülfonamid ilaçları - CA inhibitörleri.....	21
Şekil 3.1. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması	30
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.....	34
Şekil 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1 numaralı madde] grafiği.	35
Şekil 4.3. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2 numaralı madde] grafiği.	35
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3 numaralı madde] grafiği.	36
Şekil 4.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 4 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[4 numaralı madde] grafiği.	36
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 5 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5 numaralı madde] grafiği.	37

Şekil 4.7. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 6 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[6 numaralı madde] grafiği.	37
Şekil 4.8. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 7 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[7 numaralı madde] grafiği.	38
Şekil 4.9. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 8 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[8 numaralı madde] grafiği.	38
Şekil 4.10. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 9 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[9 numaralı madde] grafiği.	39
Şekil 4.11. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1 numaralı madde] grafiği.	40
Şekil 4.12. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2 numaralı madde] grafiği.	40
Şekil 4.13. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3 numaralı madde] grafiği.	41
Şekil 4.14. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 4 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[4 numaralı madde] grafiği.	41
Şekil 4.15. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 5 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5 numaralı madde] grafiği.	42
Şekil 4.16. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 6 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[6 numaralı madde] grafiği.	42

Şekil 4.17. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 7 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[7 numaralı madde] grafiği.	43
Şekil 4.18. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 8 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[8 numaralı madde] grafiği.	43
Şekil 4.19. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 9 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[9 numaralı madde] grafiği.	44
Şekil 5.1. Sülfonamidler ve anyonik inhibitörler tarafından inhibe edilen CA enziminin inhibisyon mekanizması.	52
Şekil 5.2. Sistemik antiglokoma ilaçları.	53
Şekil 5.3. Antitümör sülfonamid türevlerinin yapısı.	53
Şekil 5.4. 4-metilbenzensülfonamid türevlerinin yapısı – CA inhibitörleri.	55
Çizelge 1.1. Afinite jelleri kullanılarak karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1) izoenzimlerinin izolasyonu (Guler et al. 2016).	6
Çizelge 1.2. İnsan karbonik anhidraz enzimlerinin başlıca fonksiyonları ve eksprese edildiği yerler (Hassan <i>et al.</i> 2013).	7
Çizelge 1.3. α-CA'lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar.	10
Çizelge 4.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbenzensülfonamid türevlerinin %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları (IC ₅₀ değerleri).	45
Çizelge 4.2. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbenzensülfonamid türevlerinin %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları (IC ₅₀ değerleri).	46
Çizelge 4.3. İnsan eritrositlerinden hCA I-II izoenzimlerinin Sefaroz-4B-Ltirozin sülfonilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması basamakları.	47

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Biyokatalizör olarak enzim kavramı ilk 1833 yılında nişastanın diastaz ile katalize edilen şekerlere dönüştürülmesi ile keşfedilmiştir. Enzimler, optimum koşullar altında karmaşık kimyasal süreçleri kolaylaştıran biyolojik makromoleküllerdir. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar gibi canlılarda işlev gören enzimler yaşamın temelini oluşturmaktadır. Enzim katalizi olmadan çoğu reaksiyon yavaş gerçekleşir ancak doğadaki tüm reaksiyonlar kataliz gerektirmez (Nannipieri *et al.* 2002; Cuesta *et al.* 2015; Haertle' 2016; Gong *et al.* 2017). En basit düzeyde enzim katalizli bir reaksiyon için klasik örnek aşağıdaki şema gösterilebilir (Şekil 1.1). Burada E, S, ES ve P sırasıyla enzim, substrat, enzim-substrat kompleksi ve reaksiyon ürünlerini belirtir; k_1 , k_2 ve k_3 ise hız sabitleridir.



Şekil 1.1. Enzim katalizli kimyasal reaksiyon (Bergaya *et al.* 2006)

Bir enzimin genel yapısı nispeten küçük üç boyutlu bir oyuktan, katalizde doğrudan yer alan amino asit kalıntıları ve katalitik bölgeden oluşur (Engelking 2015). Enzimler en az bir polipeptit zincirinden oluşur ve yapıları amino asitlerin sekansından türemiştir. Enzimler, aktivitelerini tanımlayan terime '-az' son eki eklenerek isimlendirilir (Perales *et al.* 2016). Üreaz örneğinde olduğu gibi substratın adına '-az' son eki eklenerek isimlendirilmiştir (McDonald *and* Tipton 2014).

1.1.1. Enzimlerin özellikleri

Enzim moleküllerinde bulunan özel bir oyuk veya yuvaya verilen isim olan aktif bölge, amino asit yan zincirleri içerir ve substratı bağlayarak bir enzim-substrat (ES) kompleksi oluşturur. ES, daha sonra enzime ve ürüne parçalanarak enzim-ürün kompleksine (EP) dönüşür. Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^3 ila 10^8 kat daha hızlıdır. Hemen her enzim molekülü saniyede 100 ila 1000 substrat molekülünü ürüne çevirebilir. Enzim başına düşen ürüne çevrilmiş substrat molekülü sayısına 'turnover sayısı' denir. Bir ya da

birkaç belirli substrat ile etkileşerek yalnızca tek tip kimyasal reaksiyonu katalizleyen enzimler bu özelliklerinden dolayı özgüdürler.

Bazı enzimlerin aktivitelerinin meydana gelmesi için substrata ek protein yapısında olmayan moleküllere ihtiyaç duyarlar. Holoenzim, 'non-protein' yapıdaki bileşenle birlikte aktif enzimin tamamını ifade ederken; apoenzim protein yapıda olan inaktif kısımdır. Protein olmayan bölge, Fe^{+2} veya Zn^{+2} gibi bir metal iyonu ise kofaktör; küçük bir organik molekül ise koenzim adını alır.

Enzimler hücre ihtiyacını karşılayacak şekilde inhibe ve aktive edilerek düzenlenebilir. Birçok enzim hücre içerisinde özgül organlarda bulunur. Böyle bir yerleşim reaksiyonlar için uygun ortam ve enzim organizasyonu sağlar (Engelking 2015; Ergen 2015).

1.1.2. Enzim aktivitesini etkileyen faktörler

Enzim aktivitesi üzerinde etkili bazı fiziksel ve kimyasal parametreler mevcuttur.

Sıcaklık: Çoğu kimyasal reaksiyonda olduğu gibi enzim katalizli reaksiyonlarda da sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı artar. Bunun nedeni sistemin enerjisinin artmasıyla reaksiyondaki moleküllerin hızlanması ve kimyasal bileşenler arasındaki etkileşim imkanının artmasıdır. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum bir sıcaklık vardır. İnsan enzimleri yaklaşık $37^{\circ}C$ 'lik sıcaklıkta çalışır. Yüksek sıcaklık ise enzimlerin moleküler yapısını bir arada tutan etkileşim ağını bozar.

pH: Enzim aktivitesi için bir diğer kritik parametre pH'dır. Sıcaklıkta olduğu gibi enzimlerin optimum düzeyde çalıştığı bir pH ve aktif olduğu bir pH çalışma aralığı vardır. pH, çalışma aralığı dışında artar veya azalırsa enzimin yapısı geri dönüşümsüz olarak etkilenebilir.

Kimyasal bileşikler: Bazı kimyasal bileşikler enzim aktivitesini etkileyebilir. Bu bileşikler enzim aktivitesini azaltarak veya ortadan kaldırarak protein yapısındaki kritik bölgelere ters veya geri dönüşümsüz bağlanabilir (Caballero *et al.* 2016).

Aktivatörler, inhibitörler, substrat olarak metal-nükleotit kompleksleri, iyonik kuvvet, tamponlar, organik çözücüler ve basınç enzim aktivitesini etkileyen faktörler arasındadır (Purich 2010).

1.1.3. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzimler altı ana sınıfa ayrılır. Bunlar; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır (Keller *et al.* 2015).

Oksidoredüktazlar

Oksidoredüktazlar, iki substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Alkol, aldehit, keton, aminler, difenol ve iminler gibi substratlar üzerine etki eder.

Transferazlar

Transferazlar, iki substrat arasında hidrojen haricindeki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

Hidrolazlar

Hidrolitik enzimler, kovalent bağları parçalar ve ester, eter, peptid, glikozid, anhidrid, C-halojenür veya P-N bağlarının su molekülü katılmasıyla hidrolizini katalizler.

Liyazlar

Liyazlar, hidrolizden farklı bir mekanizmayla substratlardan grupların uzaklaştırılıp çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

İzomerazlar

İzomerazlar optik, geometrik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

Ligazlar

Ligazlar, bazı yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden (ATP ve GTP gibi) fosfat bağının kopması sonucunda ortaya çıkan enerji ile iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Aszalos *et al.* 1978; Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Enzim çalışmaları yirminci yüzyılın ikinci yarısında genetik mühendisliği tekniklerinin başlangıcı ile ilerleme kaydetti. Bu gelişmenin bir sonucu olarak

günümüzde herhangi bir organizmadan hemen her enzimi büyük miktarda ve saf formda elde etmek mümkündür (Haertle' 2016).

Enzim izolasyonu, bütün hücelere ihtiyaç duymadan doğrudan biyolojik transformasyona izin verir. Biyokatalizör olarak hüceler yerine izole edilmiş enzimlerle biyotransformasyon birçok avantajı sağlar (Clarke 2013).

1.1.4. Enzim aktivitesinin inhibisyonu

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızını azaltan maddelere 'inhibitör' denir (Keha ve Küfrevioğlu 2008).

Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır. Dönüşümlü inhibisyon ise; yarışmalı (competitive), yarışmasız (noncompetitive), karma tip (mixed type) ve sınırlı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyon şeklinde gruplara ayrılır.

Dönüşümsüz (irreversible) inhibisyonda enzim, başlangıçtaki aktivitesini kaybeder ve ilk etkisi asla elde edilemez. Yarışmalı (competitive) inhibisyonda substrat ve inhibitör, enzimin aktif bölgesinde bir rekabet içindedir. Yarışmasız (noncompetitive) inhibisyonda inhibitör, enzimin aktif olmayan bölgesine bağlanır. İnhibitörün enzime bağlanması sonucunda enzimin aktif yan bileşimi değişir ve bu nedenle substrat enzime bağlanamaz. Karma tip (mixed type) inhibisyonda inhibitör hem enzimin kendisine hem de enzim-substrat kompleksine bağlanabilir. Sınırlı yarışmalı (uncompetitive) inhibisyonda ise inhibitör, enzim-substrat kompleksine bağlanır ve sonuçta ürün oluşmaz. İnhibisyon türlerinin hepsinde reaksiyon hızında düşüş gözlemlenebilir (Kurbanoglu *et al.* 2016).

1.1.5. Enzim reaksiyon kinetiği

Enzim kinetiği, enzim katalizli reaksiyonların hızını etkileyen faktörleri ele alan enzimolojinin dalıdır. En önemli faktörler; enzim konsantrasyonu, ligand konsantrasyonu, pH, iyon kuvveti ve sıcaklık şeklinde sıralanabilir (Segel 1975).

Enzim inhibisyonu (dönüşümlü), inhibisyon türünün ve inhibisyon sabitinin belirlenmesi için grafiksel çizimler gerektirir. Dolayısıyla bugüne kadar; Lineweaver-Burk, Dixon ve Cornish-Bowden gibi grafikler önerilmiştir (Amine *et al.* 2014).

Michaelis ve Menten, substratın (S) ‘enzim-substrat (ES)’ kompleksini oluşturmak için enzime (E) bağlanan grupları gösteren bir mekanizma önermiştir. Sonuçta enzimatik reaksiyona bağlı olarak bir reaksiyon ürünü (P) meydana gelir. Oluşturulan denklem ise aşağıda gösterilmiştir:

$$V_0 = V_{\max} [S] / K_m + [S]$$

Burada V_0 ilk hız, V_{\max} maksimum hız, S substrat konsantrasyonu ve K_m $V_{\max} / 2$ konsantrasyonudur. K_m ve afinite ters orantılıdır. Diğer bir deyişle küçük K_m 'ye sahip bir enzim, substratına karşı yüksek afinite gösterir.

Enzim reaksiyon kinetiği açısından enzimin maksimum hızı (V_{\max}), yarışmalı inhibisyonda değişmezken; Michaelis Menten sabiti (K_m) artar. Yüksek substrat konsantrasyonunda bu inhibisyon oluşmaz. Yarışmasız inhibisyonda substrat ve inhibitör rekabet halinde değildir, V_{\max} azalırken; K_m sabit kalır. Yarışmalı inhibisyonun aksine yarışmasız inhibisyon, yüksek substrat konsantrasyonunda oluşabilir. Sınırlı yarışmalı inhibisyonda ise inhibitör sadece enzim-substrat kompleksine bağlanır. Bu inhibisyonda K_m azalır ve V_{\max} 'ta düşüş gözlenir (Kurbanoglu *et al.* 2016).

1.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA) enzimi faaliyetinin ilk belirtisi, 1920'lerin sonunda görülmüştür. Hemoliz kanıyla yapılan deneyler, kandan çıkan karbon dioksit oranının beklenenden yüksek olduğunu ve kanın bu reaksiyon için bir katalizör ihtiva edebileceğini göstermiştir. Birkaç yıl aradan sonra katalizörün bir enzim olduğu keşfedildi ve adı ‘CA’ oldu. Daha sonra, ilk kez kısmen izole edildi ve saflaştırıldığında katalizörün molekül başına bir çinko iyonu içerdiği ve yaklaşık 30 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu görüldü. Sığır eritrositlerinde bir litre kanda 2 g enzim bulunması, CA'yı kandaki en çok bulunan proteinlerden biri haline getirdi.

Lindskog, 1960'da ilk kez sığır eritrositlerinden CA'yı saflaştırdı. 1961 yılında ise Nyman, CA'yı insan eritrositlerinden saflaştırdı. Enzim, Lindskog tarafından kullanılan kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırıldı. İnsan

eritrositlerinde etanol-kloroform ekstraksiyonunu içeren yöntemle iki CA izoformu tespit edildi. Bu izoformlara insan karbonik anhidraz I (hCA I) ve insan karbonik anhidraz II (hCA II) adı verildi.

Çizelge 1.1. Afinite jelleri kullanılarak karbonik anhidraz (EC 4.2.1.1) izoenzimlerinin izolasyonu (Guler *et al.* 2016)

Afinite ligandları	Katı destekler veya immobilize afinite ligandları
Sülfanilamid	Sefadeks G-150
(P-Aminometilbenzen sülfonamid)	Sefaroz-4B
2-Amino-1,3,4-tiadiazol-5 sülfonamid	NH ₂ (CH ₂) ₁₀ COOH ile sefaroz
P - [(2,4-Diaminofenil) azo] benzen-sülfonamid (Prontosil)	CM-Sefadeks

Geçmişte yapılan çalışmalardan farklı olarak Guler ve arkadaşları, bazı modifikasyonlarla α -CA'ların saflaştırılması için yeni bir afinite jeli hazırladı. Kromatografik yatak materyali olarak EUPERGIT C-250L kullanıldı. Matriks ve ligand arasındaki sterik engellemeyi önlemek için etilendiamin ara levha-kolları EUPERGIT C-250L'ye bağlandı. Bu strateji, CA'nın aromatik sülfonamid türünün spesifik bir ligandına etkili bir şekilde bağlanmasını geliştirdi (Guler *et al.* 2016). CA saflaştırması için kullanılan afinite jellerine / ligandlarına genel bir bakış Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

1.2.1. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları ve dağılımı

Karbonik anhidraz enzimi, hem taşıma hem de metabolik süreçler için hücresel düzeyde merkezi bir enzimdir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. İnsan karbonik anhidraz enzimlerinin başlıca fonksiyonları ve eksprese edildiği yerler (Hassan *et al.* 2013)

İzoenzimler	Numara	Amino asitler	Fonksiyonlar	Eksprese edildiği yerler
CA I	P00915	261 (260)	Antireflü savunması, gaz alışverişi ve iyon taşınımı	Eritrositler ve gastrointestinal sistem (GI)
CA II	P00918	260 (259)	Antireflü savunması, kemik rezorpsiyonu, sulu humor üretimi, sperm motilitesi, idrar asidifikasyonu, koloni uyarıcı faktör (CSF) sekresyonu, gaz alışverişi ve CO ₂ 'ye nazal kemosenitivite (kemoterapi)	Neredeyse tüm hücreler
CA III	P07451	260 (259)	Antireflü savunması, yağ asidi metabolizması, oküler sıvı taşınımı ve homeostaz	İnsan embriyosunda notokord ve iskelet kası, miyotomlar ve ekstremitte tomurcuklarının ön kas kitleleri ve tip I kasında çözünür proteinin %8'i
CA IV	P22748	312 (266)	CO ₂ 'ye nazal kemosenitivite, antireflü savunması, HCO ₃ ⁻ geri emilimi, NH ₄ ⁺ çıkışı, pH regülasyonu, oküler sıvı üretimi, gaz alışverişi ve serebral kan akışı	Gastrointestinal sistem (GI), böbrek, endotel, pankreas, tükrük bezleri, kalp kası, göz ve kalın bağırsağın kolon bölümü
CA VA	P35218	305 (267)	Adipositlerdeki piruvat karboksilaz ve biyosentetik reaksiyonlar için bikarbonat sağlayan mitokondriyal enzim	Karaciğer, böbrek, pankreas adacıkları ve beta hücreleri
CA VB	Q9Y2D0	317 (284)	Biyosentetik reaksiyonlar ve amonyak detoksifikasyonu (toksinsizleştirme)	Pankreas, böbrek, tükrük bezi ve omurilikte fakat karaciğerde görülmez. Kalp ve iskelet kası ve gastrointestinal mukoza

Çizelge 1.2. (Devam) İnsan karbonik anhidraz enzimlerinin başlıca fonksiyonları ve eksprese edildiği yerler (Hassan *et al.* 2013)

CA VI	P23280	308 (291)	pH regülasyonu, antireflü savunması, kanserojenlerden korunma ve tat fonksiyonu	Tükürük salgısı, gözyaşı ve süt, nazolakrimal, <i>von Ebner's</i> ve meme bezleri
CA VII	P43166	264	Beyin omurilik sıvısı üretimi	Merkezi sinir sistemi
CA VIII ile ilgili protein	P35219	290 (289)	İşlevsiz	Serebellar purkinje hücreleri
CA IX	Q16790	459 (422)	pH regülasyonu, hücre adhezyonu, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu, iyon taşınımı, testis sıvısının konsantrasyonu ve asidifikasyonu	Normal gastrointestinal sistem (GI), birkaç kanser türü ve erkek akıntı kanalı
CA X	Q9NS85	328	İşlevsiz	Beyindeki güçlü ekspresyonlar ve merkezi sinir sistemi, miyelin kılıfı, kolorektal neoplazma ve yüzey mikrovilisi
CA XI ile ilgili protein	O75493	328	İşlevsiz	Spinal korttaki orta derece ekspresyonları olan fonksiyonsuz beyin. Beyindeki güçlü ekspresyonlar ve merkezi sinir sistemi
CA XII	O43570	354 (330)	pH regülasyonu, sulu humus üretimi, HCO_3^- Emilimi, H^+ sekresyonu ve testis sıvılarının konsantrasyonu ve asidifikasyonu	Kolon, böbrek, prostat, bağırsak ve aktive olmuş lenfositler, belirli kanser türleri, göğüs, akciğer, göz, erkek akıntı kanalları ve üreme epiteli
CA XIII	Q8N1Q1	262	Böbrek, mide-bağırsak ve üreme bölgelerindeki asit-baz dengesinin korunması ve pH regülasyonu	Timüs, ince bağırsak, dalak, prostat, yumurtalık, kalın bağırsağın kolon bölümü ve testis
CA XIV	Q9ULX7	337 (322)	HCO_3^- Emilimi ve nöronal iletimin modülasyonu	Merkezi sinir sisteminin parçaları ve erişkin karaciğer, kalp, ince bağırsak, kalın bağırsağın kolon bölümü, böbrek, mesane, iskelet kası ve beyin

CA I, kırmızı kan hücrelerinde en çok miktarda bulunan hemoglobin proteini olmasına rağmen eksikliğinde herhangi bir anormallik görülmez. Sitozolik CA I, eritrositlerde CA II'den 5-6 kat fazla bulunur ancak CA II kadar yaygın değildir. hCA II, en yaygın şekilde izole edilen izoformudur. Ayrıca kemik rezorpsiyonundan solunuma ve pH düzenlemesine kadar değişen süreçlere katılır. Sitozolik CA II aktivitesi, üriner asidifikasyonu artırır. hCA III yağ dokuları, hepatositler ve iskelet kası lifleri gibi yüksek oksidasyon oranlarına sahip hücrelerde antioksidan bir role sahiptir. CA IV (membrana bağlı) aktivitesi, üriner asidifikasyonu artırır ve CO₂ taşınmasında rol oynar.

hCA V, mitokondriyal matraste VA ve VB şeklinde bulunur. hCA VA, glikoneogenez için bikarbonat; pirimidin baz sentezi için ise yağ asitleri sağlar ve kalp, akciğer, böbrek, dalak ve bağırsak mitokondrilerinde bulunur. hCA VB, metabolizmada orta derecede rol oynayan pankreas, böbrek ve tükürük bezlerinin mitokondrilerinde eksprese edilmiştir. CA VI, tükürük bezlerinden salgılanır. Antireflü savunmasında pH'ı düzenler ve mide ile yemek borusunda koruyucu bir etkiye sahiptir ancak tat fonksiyonuna sahip olması eşsiz bir özelliktir (Lindskog 1997; Aggarwal *et al.* 2013; Hassan *et al.* 2013).

CA ile ilgili proteinler (CA VIII, X ve XI) daha çok merkezi sinir sistemi, beyin ve akciğerde eksprese edilir. CA IX, hipoksik tümörler için bir belirteçtir ve meme kanseri hastalarında kötü prognoz ile korelasyon gösterir. CA IX ekspresyonunun ve aktivitesinin tümör hücrelerinde metabolik işlev bozukluğu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Hassan *et al.* 2013).

hCA XII, gastrointestinal mukozada eksprese edilir. Bununla birlikte; akciğerler, böbrekler, prostat ve göğüs tümörleri de dahil olmak üzere epitelyal tümörlerde aşırı derecede eksprese edilmiştir. hCA XIV, beyinde ve retinalde bulunur. Ayrıca sinir retinasından CO₂'nin uzaklaştırılmasını sağladığı ve fotoreseptör işlevini modüle etmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Aggarwal *et al.* 2013).

İnsan vücudunda sadece α -CA'lar bulunmuştur. İnsanda bulunan 15 CA izoformundan 12'si katalitik olarak aktiftir ve bunların; alt hücre lokalizasyonu, organ ve dokulardaki dağılımı, ekspresyon seviyeleri, kinetik özellikleri ve inhibitör bağlanma afiniteleri farklılık gösterir (Smirnovienė *et al.* 2017).

1.2.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

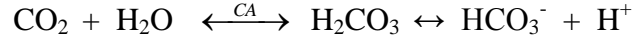
Fizyolojik reaksiyonların yanı sıra karbonik anhidrazlar çeşitli reaksiyonları da katalizler: Örneğin CO₂'nin bikarbonata hidrasyonu (reaksiyon 1, Çizelge 1.3); siyanatın karbamik aside ve siyanamidin üreye hidrasyonu (reaksiyon 2 ve 3); gem-diollere aldehid hidrasyonu (reaksiyon 4); karboksilik veya sülfonik asit hidrolizi (reaksiyon 5, 6) ve daha az incelenen hidrolitik işlemler (reaksiyon 7-9)'dir.

Çizelge 1.3. α-CA'lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar (Supuran *et al.* 2003)

Reaksiyon no	Reaksiyonlar
1	$O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
2	$O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
3	$HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$
4	$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$
5	$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$
6	$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
7	$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$ (Ar=2,4-Dinitrofenil)
8	$PhCH_2OCOCI + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9	$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$ (Re=Me; Ph)

1.2.3. Karbonik anhidraz enziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri

Karbonik anhidrazlar (EC 4.2.1.1), karbondioksitin bikarbonata ve protonlara dönüşebilen hidrasyonunu katalizleyen ve çoğunlukla çinko bulunduran metaloenzimlerdir (Smirnovienè *et al.* 2017, Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Karbondioksitin (CO₂) hidrasyonu ve dehidrasyonu (Topal *et al.* 2017)

Karbonik anhidraz 1932’de keşfinden bu yana en iyi karakterize edilen enzimlerden biri haline gelmiştir ve eritrositlerin temel protein bileşenini temsil eder (Rıcklı *et al.* 1964; Register *et al.* 1978).

İlk tanınan metaloenzim olan karbonik anhidraz, Meldrum ve Roughton tarafından eritrositlerden izole edilmiştir. CA I, CA II ve CA III’ün her biri engellenmiş bir N-terminal grubuna sahip ve aktivitesi için gerekli olan çinkoyu içerir. Bu izoenzimler belirgin olarak ayrı genler tarafından kodlanır ve amino asit dizileri büyük bir homoloji gösterir. Karbonik anhidrazlar, CO₂’nin hidrasyonunun geri dönüşümlü katalizine ilaveten çeşitli aldehytlerin ve pirüvik asitin hidrasyonunda ve oldukça farklı bileşiklerin bir dizi hidrolizinde katalizörlük görevi yapar (Deutsch 1987). Gaz değişimi, asit-baz dengesi, salgılama, fotosentez gibi süreçlerin potansiyel bir düzenleyicisi olan enzim; biyosentetik süreçler, kemik erimesi, kalsifikasyon ve tümöre özdeşliğinin yanısıra diğer pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte de rol oynar (Ferroni *et al.* 2017; Prete *et al.* 2017a).

Karbonik anhidrazlar omurgalılarda, omurgasızlarda, yüksek bitkilerde (yosunlarda) ve bazı bakterilerde bulunur. Bugüne kadar 16 CA izoenzimi memelilerde keşfedilmiştir ve en fazla ilgi insan CA I-II ve sığır CA III (bCA)’e odaklanmıştır. Bunlar yaklaşık 29 kDa moleküler kütleli monomerlerdir. Kristal yapıları 0,2 nm veya daha yüksek çözünürlükte çözülmüştür. Ayrıca polipeptit zincirinin katlanması her üç izoenzim için de benzerdir (Johansson *and* Forsman 1993; Şentürk *et al.* 2009). CA’nın çekirdek yapısında 259 amino asit ve 10 β-tabaka bulunur (Khameneh *et al.* 2017). Bazı CA izoformları, turnover sayısı > 10⁸ s⁻¹ ile doğada bilinen en etkili katalizörler arasındadır (Heravi *et al.* 2017). İzoenzimler,

immünokimyasal ve genetik olarak birbirinden farklıdır. Ayrıca izoenzimlerin her birinin birçok elektroforetik varyantı vardır (Register *et al.* 1978).

CA keşfinden bu yana, memeli kırmızı kan hücrelerinde bol miktarda bulunurken; doku ve salgı organlarının farklı türlerinde daha az bulunur (Krungrai *et al.* 2001). CA I (düşük aktivite, sülfonamide duyarlı form), çoğunlukla kırmızı hücrelerde bulunurken; körbağırsak, kalın bağırsak mukozası, hipofiz bezi, siliyer cisim gibi dokularda da mevcuttur. CA II (yüksek aktivite ve sülfonamide duyarlı form) kırmızı kan hücrelerinde ve diğer dokuların çoğunda bulunur. CA III (düşük aktivite ve sülfonamide dirençli form) ise kırmızı iskelet kasında oldukça fazla bulunur. Her üç izoenzim, CO₂'nin geri dönüşümlü hidrasyonunu katalize etse de bazı ester bağlantılarını da hidrolize eder ve asetazolamid (AZA) gibi heterosiklik sülfonamidler tarafından seçici olarak inhibe edilir. Bunların göreceli aktiviteleri ve sülfonamid inhibisyon dereceleri önemli ölçüde değişebilir. Örneğin CA II izoenzimleri en yüksek CO₂ hidrataz, esteraz aktivitelerine ve sülfonamidler için en yüksek afiniteye sahiptir. Bunu, CA I izoenzimleri takip eder ve son olarak CA III izoenzimleri, CO₂ hidrataz ve esteraz aktivitelerini belirgin derecede düşük gösterirler ve sülfonamidler tarafından zayıf şekilde inhibe edilirler (Carter *et al.* 1981).

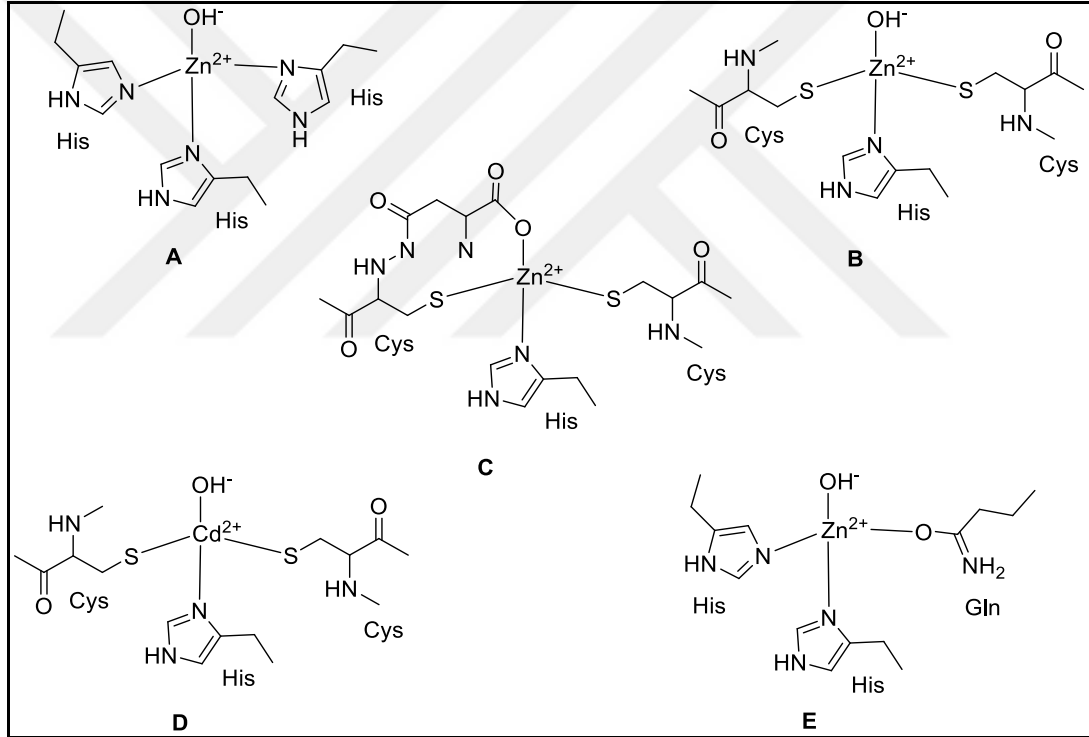
Memelilerde bir litre kanda (kırmızı hücreler) yaklaşık 1-2 g karbonik anhidraz bulunur, nispeten kararlıdır ve suda çözünürler. pH 6-10 aralığında aktiviteyi korurlar, maksimum etkiyi pH 8 de gösterirler ve izoelektrik noktaları enzim türüne bağlı olarak yaklaşık 5,5 ila 7,5 arasında değişir (Maren 1967).

1.2.4. Karbonik anhidraz enziminin üç boyutlu yapısı

Karbonik anhidrazlar, karbondioksitin bikarbonata dönüşen hidrasyonunu katalizleyen ve biyomineralizasyon sürecinde yer alan metaloenzimlerin bir ailesidir (Çoban *et al.* 2007; Ferry 2010).

CA'lar yedi gen ailesi tarafından eksprese edilir, bunlar; α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η - ve θ -CA'lardır (Prete *et al.* 2017a). Bu enzimler, benzer bir yapıya ve hidrataz aktivitesine sahipken; genetik açıdan daha düşük bir sekansa sahip olarak gruplandırılmıştır (Prete *et al.* 2017b).

Zn (II), CA altı gen ailesinin (α , β , γ , δ , ζ , η) tümünde bulunabilen bir metal iyonuyken; Cd (II) ζ -CA'da, Fe (II) γ -CA'da ve Co (II) α -CA'de bulunur (Şekil 1.3, Supuran 2016). Güçlü bir Lewis asidi olan Zn^{+2} kationunun işlevi, substratı bağlamak ve etkinleştirmektir (Iqbal *et al.* 2017). Bazı CA'ların (α -, β -, γ -, δ -, ζ -CA'lar) üç boyutlu yapısı, oligometrik durumundan dolayı birbirinden çok farklıdır. α -CA'lar genelde monomerdir ve nadiren dimerdir; β -CA'lar dimer, tetramer veya oktamerdir; γ -CA'lar trimerken; δ - ve ζ -CA'lar muhtemelen monomerdir. Bu enzim sınıflarının birçoğu, (δ -CA'lar hariç) kristalleştirilmiş ve karakterize edilmiştir (Supuran 2010). η -CA'lar için kısmi homoloji modelleri mevcuttur ve bugüne kadar hiçbir örneği kristalleştirilmemiştir.

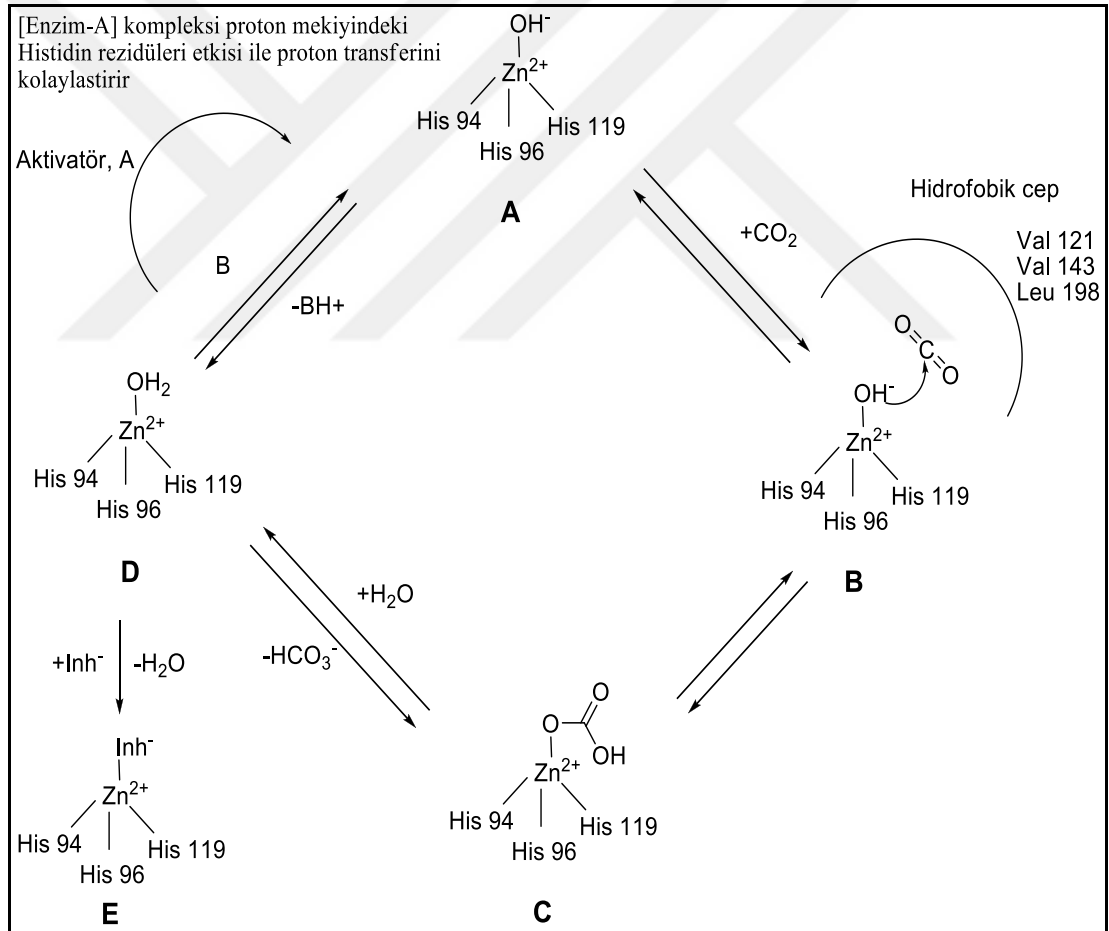


Şekil 1.3. Karbonik anhidrazlarda metal iyon koordinasyonu (Supuran 2016)

1.2.5. Karbonik anhidraz enziminin katalitik, inhibisyon ve aktivasyon mekanizması

Metal koordineli su molekülünden üretilen bir divalent metal (Zn, Cd, Fe veya Co) hidroksit türü, tüm karbonik anhidrazların katalitik olarak aktif türüdür (Şekil 1.4 A, Supuran 2016). Karbonik anhidraz gen ailesinin genel katalitik

mekanizması, çinkoya bağlı hidroksit iyonunun etrafında döner. Kısacası bir substrat molekülü (CO_2), CA'nın aktif alan boşluğuna getirilir burada çinkoya bağlı hidroksit tarafından nükleofilik bir saldırıya geçirilir (Esbaugh *et al.* 2006). CO_2 substratı Val¹²¹, Val¹⁴³ ve Leu¹⁹⁸ kalıntıları tarafından tanımlanan Zn (II) iyonu yakınındaki bir hidrofobik cebe bağlanmıştır. Enzimin çinko hidroksit türünün nükleofilik hamlesi için CO_2 , Zn (II) iyonu ile koordineli bikarbonata dönüştürülür (Şekil 1.4 C). Bikarbonatın çinkoya bağlanması oldukça kararsız olduğu için bu ara madde, gelen bir su molekülü ile kolayca reaksiyona girer ve bikarbonat çözeltiliye serbest bırakılır. Anyonlar muhtemelen aktif bölgenin hidrofobik yarısını kullanarak aktif bölgeden çıkarlar (Şekil 1.4 D).



Şekil 1.4. α -CA'ların katalitik (fizyolojik reaksiyon için), inhibisyon (çinko bağlayıcılarla) ve aktivasyon mekanizması (hCA I'in aktif bölgesindeki çinko ile etkileşen amino asitlerin numaralandırması) (Supuran 2016).

Enzimlerin nükleofil olarak aktif türlerinin üretilmesi, çinko koordine edilmiş sudan tampona bir proton transfer reaksiyonu ile sağlanır ve tüm işlemin hız belirleme aşamasındadır. Birçok CA izoformunda bu sürece, proton transfer süreçlerine katılabilen aktif bir kalıntı destek olur, örneğin bir histidin kalıntısı aktif bölgenin ortasına yerleştirilir. hCA II ve birkaç insan izoformu için bu kalıntı; His⁴, His³, His¹⁰ ve His¹⁵ kalıntıları dahil olmak üzere His⁶⁴ tür (Supuran 2016).

Katalitik işlev için önemli olan CA moleküler yapısının dört ana bileşeni vardır. Bunlar; çinko bağlama bölgesi, substrat birleştirme cebi, treonin¹⁹⁹ döngüsü ve proton mekik mekanizmasıdır (Esbaugh *et al.* 2006). Bazı CA izoformlarının katalitik hızı $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ 'i aşmaktadır (Wieczorek *and* Jelonek 2017).

CA aktivatörleri (CAA'lar), katalitik döngünün hız belirleme aşamasını destekleyerek katalitik süreci hızlandırır. Proton transfer reaksiyonunun molekül içi olmayan hale dönüştüğü enzim aktivatör (E-A) kompleksleri oluşturur. Böylece doğrudan kompleksle etkileşmeden aynı reaksiyonun daha hızlı ilerlemesini sağlar (Şekil 1.4). Nitekim CAA'ların çoğu moleküllerinde pK_a değerleri 6,5 ila 8 olan ve proton transfer süreçlerine katılabilen parçaları içermektedir.

Uzun süreden beri bilinen tek CA inhibisyon mekanizması, inhibitörlerin metal iyonunun tetrahedral geometrisinde metal iyonuna bağlandığı ya da metal koordinasyon küresine eklenecek trigonal bipiramidal geometrilerin üretilmesiydi (Şekil 1.4 E, Supuran 2016).

Karbonik anhidraz inhibitörleri (CAI'ler), 1954'de oftalmolojide kullanıldı ve bu tarihten itibaren yaygın olarak kullanılmıştır (Kass 1989). CA inhibitörleri, CA aktivitesini baskılayan bir kimyasal madde veya farmasötik sınıftır (Bayrak *et al.* 2017). CAI'ler, metallerle kompleks yapmış anyonlar ve proteinsiz çinko ligandı tarafından süstitüe edilerek enzimin Zn (II) iyonuna bağlanmış olan veya genellikle trigonal-bipiramidal yapıda olup metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörler olmak üzere iki gruba ayrılır (Supuran *and* Scozzafava 2001).

CAI'ler dört ana sınıfa aittir:

1. Metal iyonunun tetrahedral veya trigonal bipiramidal geometrilerinde enzim aktif bölgesinden Zn (II) iyonu ile koordine olan sülfonamidler (ve sülfamadlar, sülfamidler ve benzeri türevler gibi izosterleri) ve metal kompleks anyonları (Şekil 1.5 A ve B).

2. İki hidrojen bağ ağı vasıtasıyla aktif bölgeden çinko ile koordineli su molekülü / hidroksit iyonuna bağlanan fenoller (basit fenol C_6H_5OH gibi, Şekil 1.5 C).

3. Fenollere oldukça benzer fakat özdeş olmayan, yani Zn (II)'ye koordine edilen su molekülü / hidroksit iyonuna bağlanan 'spermin, spermidin ve konjenerler' gibi poliaminler (Şekil 1.5 D).

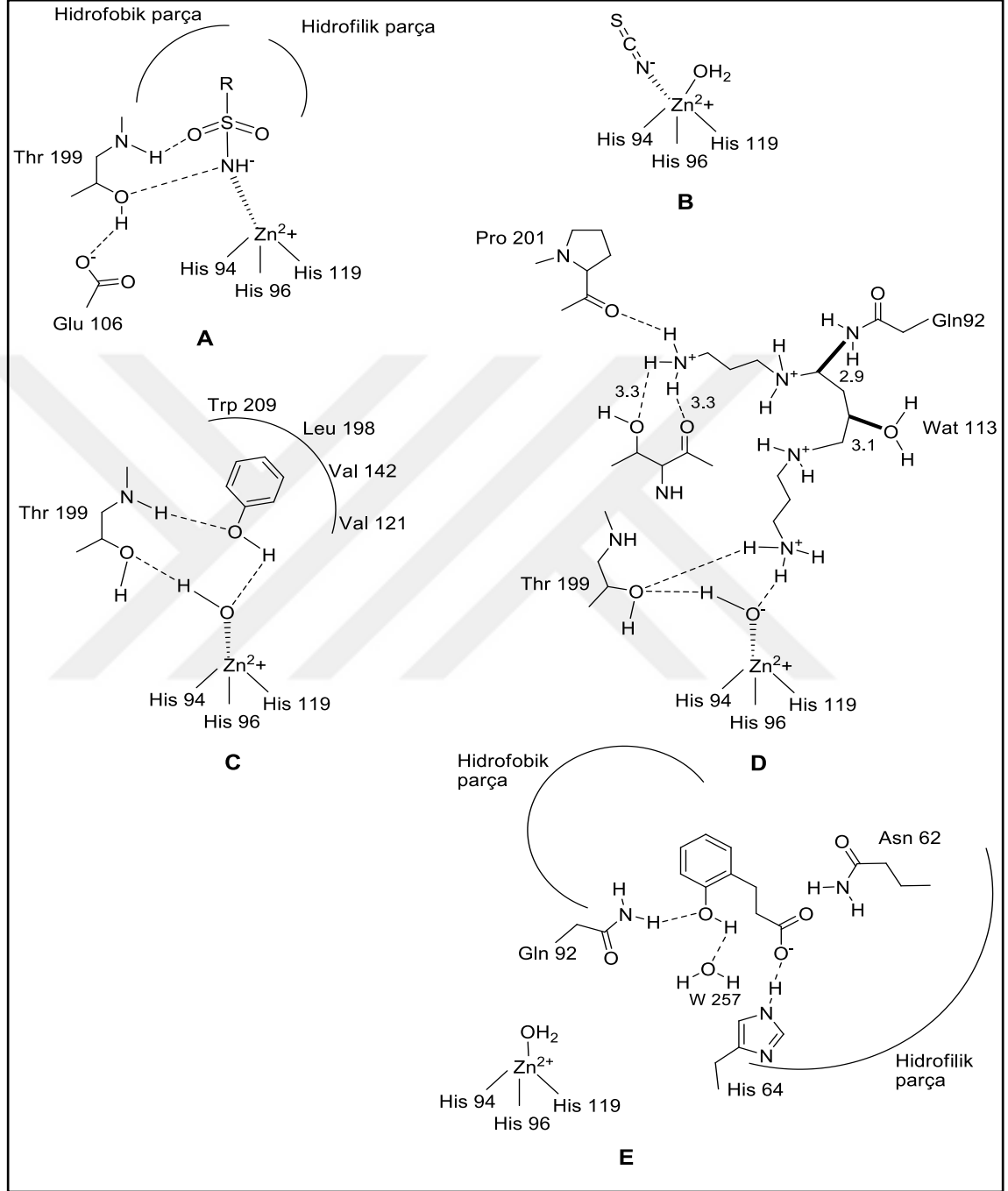
4. Son zamanlarda bildirilen etkin CAI sınıfı olan kumarinler ve dikumarinler. Zn (II)'ye bağlı olmayan ve aktivatörleri ile aynı aktif bölgede bağlanan (hidrolize edilmiş biçimde) bir inhibisyon mekanizmasına sahip olup, aktif bölgenin girişini tıkamaktadır (Şekil 1.5 E, Durdagi *et al.* 2011).

CAI'ler birçok hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde yaygın olarak kullanılan terapötik etmenlerdir (Supuran *et al.* 2003). CAI'lerin önemli sınıflarından birini temsil eden organik ve inorganik anyonlar, hastalıkların tedavisi için klinik uygulamalar yapabilecek yeni inhibitör tiplerinin tasarlanması için önemlidir (De Simone *and* Supuran 2012).

CA, gözde aköz mizoz üretiminde anahtar bir enzimdir. Dolayısıyla siliyer proseslerdeki aktivitesinin inhibisyonu, azalmış aköz humoral sekresyona neden olur ve bu sekresyon göz iç basıncını (GİB) azaltır (Hollò 2015). 1995 yılında Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi, artmış göz içi basıncının tedavisinde topikal etkili karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamidi onaylamıştır (Pfeiffer 1997). CAI'ler, kedi ve köpeklerde neredeyse tüm glokom tiplerini tedavi etmek için kullanılabilir (Mas'anka 2015). CA inhibitörlerinden biri olan asetazolamid, akut dağ hastalığını (AMS) önlemek ve iyileştirmek için etkin bir ilaç olarak kabul edilmiştir (Xiao *et al.* 2011). Anemik, enfeksiyon veya zayıf pıhtılaşma gibi belirtilerde karbonik anhidraz inhibitörleri üzerine hastaların gözlemlenmesi ve sorgulanması tedavi süresince tercih edilir (Mogk *and* Cyrlın 1988). CAI'ler, idiyopatik intrakranyal hipertansiyon gibi bazı nörolojik bozuklukların tedavisinde de kullanılmaktadır (Topal *et al.* 2017). Ayrıca son zamanlarda yapılan araştırmalar yeni bir etki mekanizması ile anti-enfektif faktörlerin tasarımı için CA'ların önemini vurgulamıştır (Altıntop *et al.* 2017).

Birçok hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde CAI'lerin kullanılmasının nedeni, CA'nın birçok hücre, doku ve organlarda geniş dağılımına ve önemli

fizyolojik fonksiyonlara sahip olmasıdır. Ancak mevcut farmakolojik inhibitörler yeterli değildir ve istenmeyen birçok yan etkileri vardır.



Şekil 1.5. İnhibitor bağlanma modelleri (Durdagi *et al.* 2011)

A: Sülfanilamidlerin bağlanması; **B:** İnorganik anyonların bağlanması; **C:** Fenolün bağlanması; **D:** Spermin bağlanması; **E:** Kumarin ve trans-2-hidroksisüsnik asit bağlanması.

Bu nedenle sülfonamid inhibitörlerinin gelişimi, hem önemli yan etkileri olmayan yeni ilaç türlerinin elde edilmesinde hem de spesifik önleyicilerin bulunduğu özgül fizyolojik çalışmalar için oldukça faydalı olacaktır (Supuran *et al.* 2003).

1.2.6. Karbonik anhidraz enziminin biyoteknolojik uygulamaları

Karbonik anhidraz ile ilişkili sistemlerin biyoteknolojik yönleri bu enzimin faydasını vurgular. Birçok alanlardaki gelişmeler, CA'ların yeni biyomedikal uygulamalarına da imkan sağlamaktadır.

Birleşik Devletler'de mevcut sağlık sorunlarından biri olan solunum yetmezliği tedavisi için mekanik ventilatörler kullanılmaktadır. Ancak bu ventilatörler aşırı basınç altındaki veya aşırı şişmiş akciğer dokusu nedeniyle akciğer etkinliğinin azaltılması da dahil olmak üzere hastalar için birçok sorun oluşturabilir. Yapay bir akciğer, akciğerlere giriş olmaksızın solunum ile yardımcı olabilen bir cihazdır. Ancak etkili yapay akciğerleri engelleyen temel sorunlar vardır. Eğer ki kararlı bir CA varyantı tasarlanabiliyorsa, küçük verimli yapay akciğer sağlamak mümkün olacaktır.

Kimyasal olarak benzer moleküller içeren kompleks ortamda iz analit miktarının belirlenmesi, birçok kimyasal sistemde yoktur. Bu nedenle biyolojik moleküllere dayanan 'biyosensör' olarak adlandırılan sensörlerin geliştirilmesi böyle özgülük ve hassaslık sağlayabilir. hCA II'nin çinkoya yüksek afinitesi bazı bitkilerde, omurgasızlarda ve balıklarda aşırı toksisite endişesi için denizdeki ve atık sudaki az miktarda çinko miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

Travma yaralanmalarında veya büyük ameliyatlarda kullanılmak üzere sürekli bir kan kaynağı gerekir. Doğal kan sıklıkla sınırlı miktarda olduğundan, 4-5 çapraz bağlı stroma içermeyen hemoglobin (poliSFHb) molekülleri kan süstitüelerin gelişiminde ilerleme kaydedilmiştir. Ancak süstitüelerin en büyük dezavantajı, yetersiz CO₂ giderme oranıdır. Bu sınırlamayı aktivite ile aşmak için katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve CA bileşiminin poliSFHb yerine geçmesi belirtilmiştir (poliSFHb-SOD-CAT-CA) (Boone *et al.* 2013).

Son zamanlarda atmosferdeki CO₂ konsantrasyonunda ve bu gazın sera etkisi üzerinde hızlı bir artışı olması nedeniyle çok sayıda araştırma, çeşitli CA'ların biyoteknolojik kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır. Çeşitli canlılardan izole edilen

CA'ların yüksek katalitik aktivitesi, CO₂'yi yakalamak amacıyla kullanılmaktadır (Supuran 2003).

1.3. Sülfonamidler

Sülfonamidler, çinko enzimi karbonik anhidraz inhibitörlerini tasarlamakta kullanılan en yaygın çinko bağlama grubu (ZBG) dur. Yapısal özellikleri sülfonamid grubunu, Zn⁺² iyonu ve yakındaki kalıntılarla gösterilen CA boşluğu aktif bölgelerinin en derin ve merkezi bölümüne sığması için ideal parça haline getirir.

Karbonik anhidraz izoformlarını inhibe eden sülfonamid türevlerinin tasarımında iki ana yaklaşım olan halka ve kuyruk yaklaşımları uygulanmıştır. Birincisi, ZBG'ye doğrudan bağlı halkayı modüle etmekten ibaretken; ikincisi, CAI'nin yapı iskelesi içinde bulunan aromatik / heterosiklik halkaya farklı kuyrukların eklenmesinden meydana gelir (Nocentini *et al.* 2016).

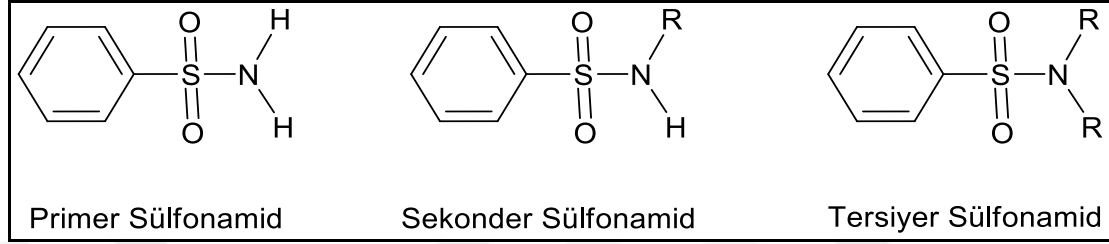
Sülfonamid azotundaki sübstitüentin bulunma derecesine bağlı olarak sülfonamidler; primer, sekonder veya tersiyer olarak sınıflandırılır (Şekil 1.6). Primer sülfonamidler, sülfonil grup üzerinde iki hidrojen atomu içerirken; sekonder sülfonamidler, bir hidrojen atomu içerir. Bu H⁺'ler kısmen asidiktir ancak tersiyer sülfonamidler, iyonize olabilen bir proton içermediğinden asidik değildir (De Ruyter 2005). Birincil sülfonamidler (-SO₂NH₂), CA inhibitörlerinin ana sınıfını temsil eder (Bozdağ *et al.* 2017).

Enzim molekülünün çok sayıda anyonu bağladığı bilinmektedir. Bunların arasında enzimin hem çok güçlü hem de seçici inhibitörleri olan bazı aromatik sülfonamidlerin 'sülfonamid-karbonik anhidraz' kompleksleri kristalografik olarak araştırılmıştır. Sülfonamid amino grubu, çinko suyun yerini alır ve bu yapılarıdaki hidrojen bağlarını treonine¹⁹⁹ O^γ'a bağlar. Sadece potansiyel hidrojen bağı vericileri (sülfonamidler, HS ve HSO) normalde çinko suyunun bulunduğu koordinasyon alanına ulaşabilir (Hakansson *et al.* 1992).

Yüzden fazla sülfonamid kinetik, fizyolojik ve farmakolojik çalışmalarla araştırılmıştır. Sülfonamidin enzim aktif bölgesinden çinko iyonuna anyon olarak koordinasyon yapıp tüm hCA'ların katalitik aktivitesini inhibe ettiği kanıtlanmıştır. CA inhibe edici etkisi için araştırılan aromatik sülfonamidler arasında benzen

sulfonamidler en iyi CA önleyici etkiyi göstermiştir (Arslan *et al.* 2016; Gocer *et al.* 2017).

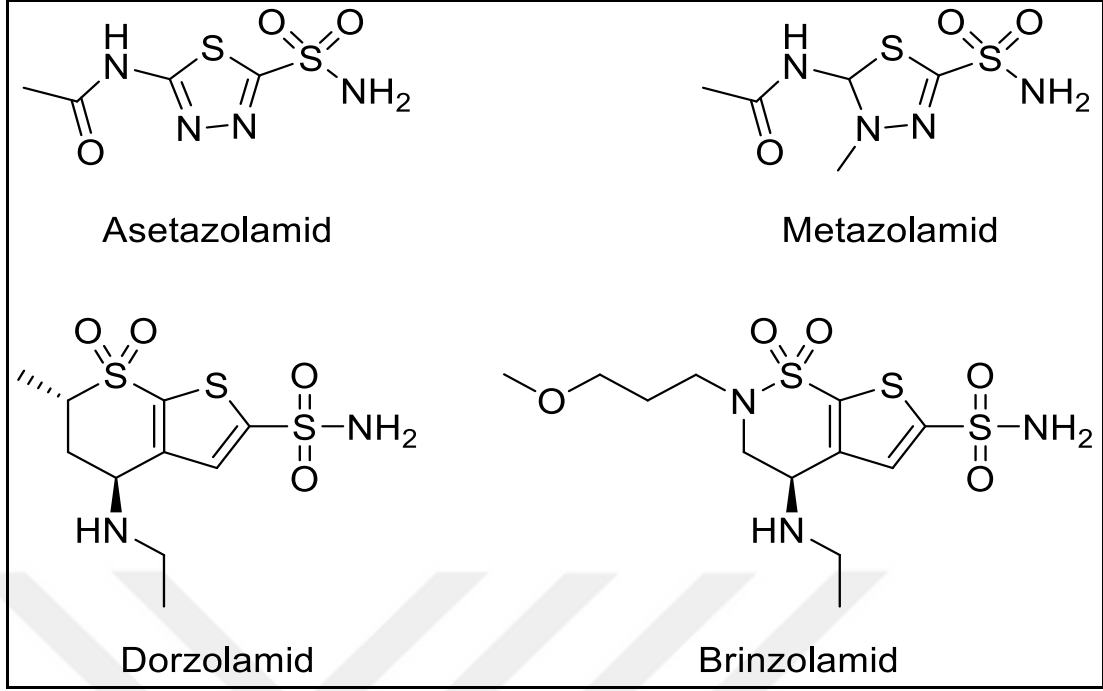
Sulfonamidler pek çok biyolojik aktiviteye sahiptir ve farmakolojik örnekleri klinikte; antibakteriyel, hipoglisemik, diüretik, antihipertansif ve antiviral ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Abbate *et al.* 2004).



Şekil 1.6. Sülfonamidlerin genel yapısı (De Ruiter 2005)

Karbonik anhidraz enzimi, insanda bilinen 16 farklı izoenzimi içermektedir. Bu izoenzimlerden bazıları (CA I, CA II ve CA IV) insan gözünde bulunur. Glukom, göz içi basıncından dolayı (GİB) yavaş yavaş görme alanı kaybıyla karakterize edilen bir hastalık grubudur. Karbonik anhidraz inhibitörleri yıllardır glukom tedavisinde kullanılmaktadır ve klinik tıpta glukom tedavisinde bilinen en iyi inhibitörleridir. Bu inhibitörler, artmış göz içi basıncını azaltarak hastalığın tedavisinde oldukça etkilidir (Bülbül *et al.* 2008).

CA IX'un inhibisyonu ile ilgili yapılan ilk çalışmada; asetazolamid (AZA) , metazolamid (MZA), etokzolamid (EZA), diklorofenamid (DCP) gibi klinikte kullanılan bir seri aromatik ve heterosiklik sulfonamidler kullanılmıştır (Sławiński *et al.* 2014, Şekil 1.7). Yapılan çalışmalarda sulfonamidlerin karbonik anhidraz inhibisyonu ile antitümör maddeler olarak da etkili olduğu belirtilmiştir (Mojzych *et al.* 2015).



Şekil 1.7. Klinikte kullanılan birincil sülfonamid ilaçları - CA inhibitörleri (Krasavin *et al.* 2017)

1.4. Çalışmanın Amacı

Karbonik anhidrazlar, canlılardaki CO₂ seviyesini düzenlemek için kullanılan enzimlerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Bu nedenle; fizyolojik pH kontrolü, gaz dengesi, kalsifikasyon ve fotosentez gibi çeşitli proseslerde anahtar rol oynar.

Karbonik anhidraz enzimi insan eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, *Plasmodium falciparum*, sığır kemiği ve sığır lökositleri gibi çok sayıda kaynaktan yoğun şekilde incelenmiş ve saflaştırılmıştır (Beydemir *and* Gülçin 2004). Yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin geliştirilmesi, sülfonamidlerin kimyasal alanının genişletilmesine bağlı olarak karbonik anhidrazın aktif bölgesi ile etkileşebilen yeni inhibitörlerin geliştirilmesine imkan sağlayabilir (Angapelly *et al.* 2017).

Karbonik anhidraz inhibitörleri yaygın olarak glokom hastalığının tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı kanser türlerinin tedavisi, nörodejeneratif hastalıklar ve obezite tedavisinde karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri kullanılmaktadır.

Günümüzde ilaç olarak kullanılmakta olan CAI'lerin, insan metabolizmasındaki beklenmeyen yan etkilerinin fazla olması nedeni ile yeni ve daha etkili inhibitörlerin tasarlanması dünya çapında araştırılmaktadır. Bu nedenle araştırma konumuz daha güçlü, yan etkileri az olan (ya da hiç olmayan) ve daha özgül inhibitörleri belirlemektir. Bu tez çalışmasında, tasarlanmış 4-metilbensülfonamid türevlerinin insan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ise sülfonamid bileşiklerinin hCA I-II için etkili inhibitörler olarak kullanıp kullanılmayacağı bilgisine ulaşılabacaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enziminin çeşitli kaynaklardan saflaştırılarak birçok bileşik tarafından inhibe edildiği tespit edilmiştir.

Chazalette (2004) indan bölümleri içeren bir dizi aromatik sülfonamid inhibitörlerinin karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve II üzerindeki etkilerini incelemiştir. Asetamido, 4-kloro-benzoil, valproil, tetra ve pentafluorobenzoil kısımlarını içeren yeni sülfonamidler, hCA I üzerinde oldukça güçlü inhibitörler olarak etki göstermiştir. Bazı türevler aynı zamanda hCA II inhibe edici özelliklere sahiptir ancak bu sülfonamidlerin antikonvülsan aktivitesi, metazolamid gibi diğer sülfonamid / sülfamad CA inhibitörlerine kıyasla oldukça düşüktür. Ayrıca hazırlanan 2-amino / asetamido-indan-5-sülfonik asitler şimdiye kadar bildirilen en güçlü sülfonik asit CA inhibitörleri arasında (iki izozime karşı, hCA I-II) özellik göstermiştir.

Kasımoğulları (2009) yeni 5-amino-1, 3,4-tiadiazol-2-sülfonamid türevlerinin insan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki etkilerini incelemiştir. Esteraz aktivitesi için yeni bileşiklerin bazılarının ortalama IC₅₀ değerleri hCA I için 2,7-6,6 µM iken (hCA I'in esteraz aktivitesini inhibe etmeyen inhibitör 10 dışındakiler); hCA II için 0,013-4,2 µM aralığında bulunmuştur. Elde edilen bu veriler, sentezlenen bileşiklerin etkili inhibisyon özelliği gösterdiği ve glokom tedavisinde aday bir ilaç olarak görülebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

İnsan karbonik anhidraz izoenzimi II (hCA II) ve sığır karbonik anhidraz (bCA) üzerine sentezlenen perfloroalkansülfonamidler 1 serisi, perfloroalkansülfonamidlerin sodyum tuzu ve polifluoroalkansülfonamid türevlerinin etkisi araştırılmıştır. Bütün bileşikler, sığır karbonik anhidrazına karşı güçlü bir inhibisyon etkisi gösterirken; bileşiklerden yalnızca bir tanesinin (2b) insan karbonik anhidraz izoenzimi II üzerine ticari ilaç olan asetazolamidden daha iyi inhibisyon özelliği göstermiştir (Benfodda *et al.* 2010).

Innocenti (2010) bir dizi (poli) fenol ile memeli CA izoformlarının (CA I-XIV) ayrıntılı bir inhibisyon çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. P-hidroksibenzoik asit, p-kumarin asit, kafeik asit, ferulik asit, galik asit, sirinjik asit, kersetin ve elajik asit gibi çeşitli fenolik asitler ve fenol doğal ürünleri ile bu enzimler üzerindeki inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Memeli izozimleri (hCA I, XII, XIII ve XIV),

düşük mikromolar veya submikromolar aralıkta bu (poli) fenoller ile inhibe edilmiştir. Burada araştırılan fenoller, klinik olarak kullanılan sülfonamidlerin / sülfamadların veya kumarinkilerden farklı olan bir CA inhibisyon mekanizmasına sahiptir. Katalitik çinko iyonuna bağlanan sülfonamidlerin aksine fenoller, Zn (II) koordinatlı su molekülüne bağlanır ve aktif bölge boşluğunda daha dışa bağlanarak çeşitli amino asit kalıntılarıyla temas eder. Bu bileşik sınıfı, tıbbi açıdan ilgili CA'ların yalnızca birisini veya birkaçını hedef alan izoform seçici inhibitörlere yol açabileceği belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada doğal ürün (NP) kumarin CA inhibitörünün keşfedilmesinin ardından, CA inhibisyonu için NP kumarinlerin daha kapsamlı olarak araştırıldığı ilk çalışmadır. Kumarin farmakoforunu ihtiva eden 24 bitki kumarini ve 3 asidik kumarini içeren NP'ler toplanmıştır. Bu yapılar, insan CA izozimlerinin (hCA I, II, VII, IX, XII ve XIII) inhibisyonu için değerlendirilmiş ve geniş bir inhibisyon ve izozim seçicilik profilleri aralığı belirlenmiştir. Yeni kemoterapilerin önemli bir kaynağı olduğu kanıtlanan NP'lerin, yapılan araştırma sonucunda hastalıklarla ilgili CA enzimlerini inhibe eden yeni kemotiplerin keşfi ve NP'lerin daha ileri değerlendirilmesini desteklemek için bir platform sağlamıştır (Davis *et al.* 2013).

Sethi (2013) küçük bir seri 4,5,6,7-tetrakloro-1, 3-dioksoizoidolin-2-il benzensülfonamid hazırlanarak, fizyolojik açıdan ilişkili üç CA izoformunun (CA I, II ve VII) inhibisyonu için araştırma yapmışlardır. Bu bileşikler, genel olarak CA I'in daha az potansiyele sahip inhibitörleridir. Ancak bunların çoğu, güçlü ve düşük nanomolar değerler ile CA II ve CA VII için etkiliydi. Bu tür bileşiklerin yeni antiglokoma, antiepileptik, ödem veya yükseklik hastalığı ilaçlarının geliştirilmesi için dikkat çekici adaylar olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Biyolojik olarak aktif benzensülfonamid parçası içeren bileşiklerin karbonik anhidraz inhibe edici aktivitesi, insan sitozolik izoformları olan hCA I ve hCA II'ye ve aynı zamanda anti-tümör ajanlar için geçerli hedefler olan hCA IX ve hCA XII transmembran izoformlarına karşı değerlendirildiği çalışmada, IC₅₀ değerleri 7,29-8,94 µM aralığında bulunmuştur. Yeni sentezlenen bileşiklerin çoğu, tümör ile ilişkili izoform hCA IX'a karşı AZA'dan daha güçlüdür. Bu yeni sülfonamidler ayrıca hCA I / XII ve hCA II / XII karşı yüksek seçicilik göstermiştir (Ghorab *et al.* 2014).

Özdemir (2014) yeni aromatik / heteroaromatik propansülfonilhidrazon bileşiklerinin sentezi, fiziksel özellikleri ve karbonik anhidraz II (CA II) enzimine karşı inhibisyon çalışmasında bu izoformun en iyi aromatik / heteroaromatik propansülfonilhidrazon inhibitörleri, o-aminobenzaldehidpropansülfonilhidrazon ve aynı IC₅₀ (0,55 mM) değerine sahip olan tiofenkarboksialdehit propansülfonilhidrazon olduğunu bildirmişlerdir.

Yıldırım (2015) imidler ve tosil klorür kullanılarak sentezledikleri bir dizi yeni sülfonamidin, sitozolik insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I-II) üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Bu N-asilsülfonamidler, sırasıyla 90,0-215,0 ve 70,1-154,4 nM arasında değişen nanomolar aralıktaki IC₅₀ değerleri ile insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II'yi inhibe etmiştir. Bu bileşiklerin idiyopatik intrakraniyal hipertansiyon (glokom), epilepsi ve yükseklik hastalığının tedavisinde ve antikonvülsan, antiobezite, anti kanser ve anti-enfektif ilaçlar için potansiyel oldukları sonucuna ulaşılmıştır.

Alafeefy (2016) 2-merkaptio-3H-kinazolin-4-1 kuyruk içeren bir dizi heterosiklik benzensülfonamid, süstitüe edilmiş anthranil asitlerin 4-izotiosiyano-benzensülfonamid ile hazırlanan sülfonamidlerin, hCA I ve II insan karbonik anhidraz izoformlarının yanı sıra hCA IX ve XII inhibitörleri olarak araştırmışlardır. hCA II, IX ve XII üzerinde oldukça etkili olan inhibitörler; hCA I üzerinde ise orta potansiyelde etkili inhibitörler olarak özellik göstermiştir. Dolayısıyla bu bileşikler, glokom (CA II ve XII) veya üç izoformun aktivitesinin (CA II, IX ve CA XII) engellendiği patolojilerde, klinik öncesi adaylar olarak ilgi çekici olduğu bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada tiyazol, pirimidin, piridin, izoksazol ve tiyadiazol gruplarına sahip olan dört grup sülfonamid türevleri sentezlenerek afinite kromatografisi ile insan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerine karşı inhibisyon aktivitesi değerlendirilmiştir. Bileşiklerin IC₅₀ değerleri, sırasıyla hCA I için 4,99-77,01 nM, hCA II için 7,62-115,51 nM aralığında bulunmuştur ve bu değerler, bileşiklerin klinik olarak kullanılan AZA ilacı ile karşılaştırıldığında yeterince aktif olduklarını göstermiştir (Gokcen *et al.* 2016).

Metan sülfonik asit hidrazidden, yeni furan sülfonilhidrazonların sentezlendiği çalışmada bileşiklerin enzim inhibisyon etkileri, spektrofotometrik

yöntemle bulunan aktivite parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bazı bileşiklerin IC₅₀ değerleri, $1,02 \times 10^{-4}$ - $5,74 \times 10^{-3}$ M aralığında olduğu ve bileşiklerin inhibisyon aktiviteleri standartla karşılaştırıldığında, glokom tedavisinde güçlü bir inhibitör olarak kullanılabilmesi ve hCA I'e karşı iyi inhibitör özelliklere sahip oldukları belirtilmiştir (Gündüzalp *et al.* 2016).

Yaseen (2016) süstitüe piridazinon parçalarını içeren bir dizi sülfonamid türevlerini, insan sitozolik iki karbonik anhidraz izoformunun (hCA I ve hCA II) inhibisyonu için araştırmışlardır. Tüm sülfonamidler, bu izoformlara karşı çok güçlü bir inhibisyon göstermiştir ki bu moleküller tıbbi kimya uygulamaları ile diğer izoformları hedef alan yeni etkili CA inhibitörlerinin keşfedilmesi için bu gibi moleküllerin potansiyel olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır.

Yine bir başka çalışmada sentezlenen sülfonamidlerin glokom, retinitis pigmentosa gibi çeşitli hastalıklarda yer alan izoformlara (hCA I, II, IV ve IX) karşı karbonik anhidraz inhibitörleri olarak değerlendirilmiştir (Abdel-Aziz *et al.* 2017).

Bir dizi sülfonamidin, süstitüe edilmiş-2-benzoik asitlerin ve primer amino parçaları içeren aromatik sülfonamidlerle reaksiyona girmesiyle elde edildikten sonra yeni bileşikler; patojen bakteri *Vibrio cholerae*, VchCA α ve VhcCA β 'dan dört karbonik anhidraz izoformunun, hCA I ve II'nin ve α - ve β -CA'ların inhibitörleri olarak araştırılmıştır. Bu izoformların, yeni sülfonamidler tarafından etkili bir şekilde inhibe edildiği tespit edilmiştir (Mohamed *et al.* 2017).

Yukarıda belirtilen araştırmalar incelendiğinde, insan CA I ve CA II izoenzimleri üzerine sülfonamid türevlerinin inhibisyon etkisi için birçok çalışma yapılmış ve çeşitli hastalıkların tedavisi için önemli sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmamızda ise insan eritrositlerinde saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerine literatürde yer almayan 4-metilbensülfonamid türevlerinin etkisi incelenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

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

3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar sırasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Spektrofotometre	Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometer
pH metre	Crison MM41 Multimeter
Santrifüj	Thermo Scientific
Peristaltik pompa	Gilson Minipuls 3
Karıştırıcı	WiseMix VM-10
Hassas terazi	OHAUS Pioneer
Otomatik pipet	ISOLAB Seti
Güç kaynağı	Consort EV265 Elektrophoresis Power Supply
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-20)	Arçelik Dikey Derin Dondurucu

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin hazırlanması

1. 0,05 M Tris-SO₄, pH 7,4 (esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 950 ml distile su içerisinde 6,055 g Tris çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

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

3. 25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na₂SO₄ çözeltisi, pH 8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 950 ml distile suda 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄ çözülerek 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye titre edildi. Daha sonra distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

4. 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ çözeltisi, pH 8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 ml distile suda çözüldü. 0,1 N HCl ile pH 8,7'ye getirildikten sonra hacmi 1 litreye tamamlandı.

5. 25 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl çözeltisi, pH 6,3 (kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl alınıp, pH 6,3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

6. 0,1 M CH₃COONa / 0,5 M NaClO₄ çözeltisi, pH 5,6 (kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g NaClO₄ ve 2,04 g CH₃COONa₃H₂O, 120 ml distile su içerisinde çözüldü. 0,1 N HCl ile pH'sı 5,6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 150 ml'ye tamamlandı.

7. 0,2 M NaHCO₃ çözeltisi, pH 8,8 (Sefaroz-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO₃, 950 ml distile suda çözülerek, 0,1N NaOH ile pH 8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

8. 0,2 M NaHCO₃ çözeltisi, pH 10 (Sefaroz-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon çözelti): 16,8 g NaHCO₃, 950 ml distile suda çözülerek 0,1 N NaOH ile pH 10'a titre edildikten sonra toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

9. Sülfanilamid çözeltisi (afinite jeli hazırlanırken kullanılan çözelti): 25 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1 M HCl içinde çözüldükten sonra 75 mg NaNO₂

ihativa eden 0°C'daki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katılarak hazırlandı.

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

3.1.4. Deneyde kullanılan kanın temini

Deneyde kullanılacak sağlıklı insan kanı, Ağrı Devlet Hastanesi Kan Merkezi'nden temin edildi ve numune kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.2. Metodlar

3.2.1. Protein tayini

Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, Warburg yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu metotta, proteinlerin ihtiva ettiği tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Aynı hacimdeki bütün elüsyonlarda, Sefaroz-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemlerinden sonra protein tayini yapıldı ve kuvarz küvetler kullanılarak spektrofotometre ile absorbansları 280 nm'de köre karşı okundu.

Kantitatif protein tayini

Bu metotta, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki, hemolizattaki protein miktarları belirlendi. Bu metod, 595 nm'de maksimum absorbans gösteren 'Protein-Coomassie Brilliant Blue G-250' kompleksinin oluşumu esasına dayanır. Kompleks bileşenlerinin bağlanması oldukça hızlı gerçekleşir ve çözeltilerde uzun süre kalır. Bu metodun duyarlılığı, 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu yol izlendi: 1 ml'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır serum albümin çözeltisinden tüplere; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Distile su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml'ye tamamlandı. 4900 µl

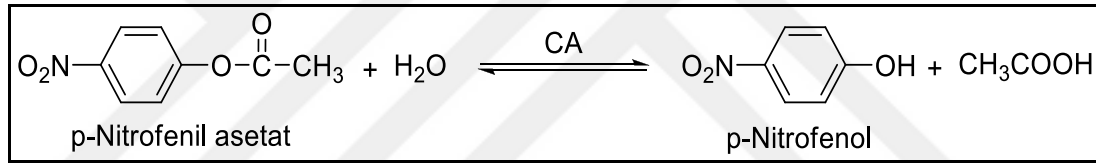
renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile yeterince karıştırıldıktan 10 dakika sonra 595 nm’de 3 ml’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. 0,1 ml aynı tampon ve 4,9 ml renklendirme reaktifinden oluşan karışım kör olarak kullanıldı ve absorbans-µg protein değerleri standart grafik haline getirildi.

3.2.2. Enzim aktivitesi tayini

Esteraz aktivitesi tayini

CA enzimi üzerinde inhibitörlerin etkisini araştırmak için bu metod kullanıldı. Metod, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır.

Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorbans veren *p*-nitrofenolat veya *p*-nitrofenol’a hidrolize eder ($\epsilon_{348}=5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması (Verpoorte *et al.* 1976)

Fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir, çünkü 348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi de aynı absorbans değerini göstermektedir. 348 nm dalga boyunda, *p*-nitrofenilasetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan dolayı kör olarak kullanılmaktadır.

Tayin işlemlerinde şu yol izlenmiştir: 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim kuvartz küvetlere konulduktan 3 dakika sonraki 25°C’de 348 nm’de absorbansı okundu.

Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak karışımın 3 dakika sonraki absorbansı ile sifıra ayarlandı. Böylece 3 dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve *p*-nitrofenilasetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise azaltılan suyun miktarı kadar inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Deneyde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi günlük hazırlandı: 27,2 mg ester, 1 ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 ml distile suya azar azar ilave edildi. Esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı bu çözelti 3 mM'dir, daha derişğini hazırlamak mümkün değildir. Asetonun tercih edilme sebebi ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe etmesidir.

3.2.3. Enzim saflaştırma çalışmaları

Hemolizatin hazırlanması

Santrifüj tüplerine alınan insan taze kanı, +4°C'de 2500 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj uygulamasından sonra tüplerin üst bölümünde kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıkla dikkatli bir şekilde alındı, tüplerin alt bölümünde kalan eritrosit peleti ise 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Taze kana her defasında aynı işlem uygulandı. İşlemler sonucunda elde edilen eritrositler, hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu distile su ile karıştırılarak hemoliz edildi.

Eritrosit hücre zarlarını hemolizattan uzaklaştırmak için +4°C'de 20.000 x g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Hemolizatin üst kısmı damlalıkla alındı ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere belirli koşullarda saklandı (Hunaiti *and* Soud 2000; Çoban *et al.* 2008).

Enzimin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Sefaroz-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sefaroz-4B matriksi üzerinde hazırlandı. L-tirozin, kolon materyaline kovalent olarak takıldıktan sonra diazollenmiş sülfanilamid tirozine kenetlendi. Söz konusu sülfanilamid, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını; tirozin ise afinite jelinin uzantı kolunu oluşturmaktadır. Karbonik anhidraza özgü bir inhibitör olan sülfanilamid, afinite jelinin yapısına girerek CA'nın yüksek oranda saflaştırılmasında başarı bir şekilde kullanılmaktadır (Kohn *and* Wilchek 1978).

Sefaroz-4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması

Saf su ile yıkanıp dekante edilen 20 mL Sefaroz-4B, eşit hacimde distile su ile bir araya getirildi. 4 g toz halindeki CNBr, buz banyosu içerisinde karıştırılan jel

süspansiyonuna eklendi. Süspansiyonun pH'ı stabil hale gelinceye kadar pH metre kullanılarak 4 M NaOH ile pH 11'e çıkarıldı. Elde edilen karışım, buchner hunisine aktarılıp süzöldükten sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile yıkandı ve bir behere alındı. 80 mg tirozin, 250 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponunda çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra, süspansiyon 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve aynı sıcaklıkta 16 saat bekletildi. Bekleme süresi bitiminde jel yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı ve böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH 8,8) yıkama işlemi tekrar edildi. Tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisine eklendi (Laemmli 1970; Arslan *et al.* 1996, Arslan *et al.* 1997).

Sülfanilamid kenetlendirmesi

Yaklaşık 0°C civarında 10 ml, 1 M HCl içinde 25 mg sülfanilamid çözüldü. Bu çözeltiye, 75 mg NaNO₂ içeren 0°C'deki 5 mL çözelti 10 dakikada süresince damla damla katıldı. Daha sonra diazolanmış sülfanilamid, 40 ml Sefaroz-4B-L-tirozin süspansiyonuna aktarıldı. pH'ı 9,5'a çıkarmak için 1 M NaOH kullanıldı. Bu süspansiyonun pH'ı sabit tutularak oda sıcaklığında 3 saat süreyle yavaşça karıştırıldıktan sonra 200 ml, 0,05 M Tris-SO₄ (pH 7,4) tamponu ve 1 L saf su ile yıkandı. Daha sonra üzerine aynı tampondan bir miktar eklenerek saklandı (Cuatracases 1970).

Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponunun (Tris-HCl, pH 7,8) içine alınarak jel süspansiyonu edildi ve su trompu kullanılarak vakum ile havası alındı. Hazırlanmış süspansiyon jel, 1 x 10 cm'lik boyuta sahip kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun denge durumu, pH'larının ve elüat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının eşitlenmesinden anlaşıldı.

Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Hemolizat (pH 8,7) ile katı Tris kolona uygulandı ve kolon, 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkandı. 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH

6,3) tamponu uygulanarak hCA I enzimi, daha sonra, 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi kullanılarak hCA II enzimi elüe edildi (Türkoğlu *et al.* 2017). Elde edilen elüatlar, fraksiyon toplayıcıları ile 5'er ml halinde tüplere konulduktan sonra 280 nm'deki absorbanlarına bakıldı. Kolonun akış hızı ise peristaltik pompa yardımıyla 20 ml / saat'e ayarlandı.

3.2.4. hCA enzimi için IC₅₀ değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

CA enzimini elde etmek amacıyla hastaneden alınan insan kan örnekleri, saflaştırıldı. IC₅₀ değerlerini belirlenmek için farklı inhibitör konsantrasyonları kullanıldı ve aktivite ölçümleri optimum koşullarda yapıldı. Leneweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten faydalanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

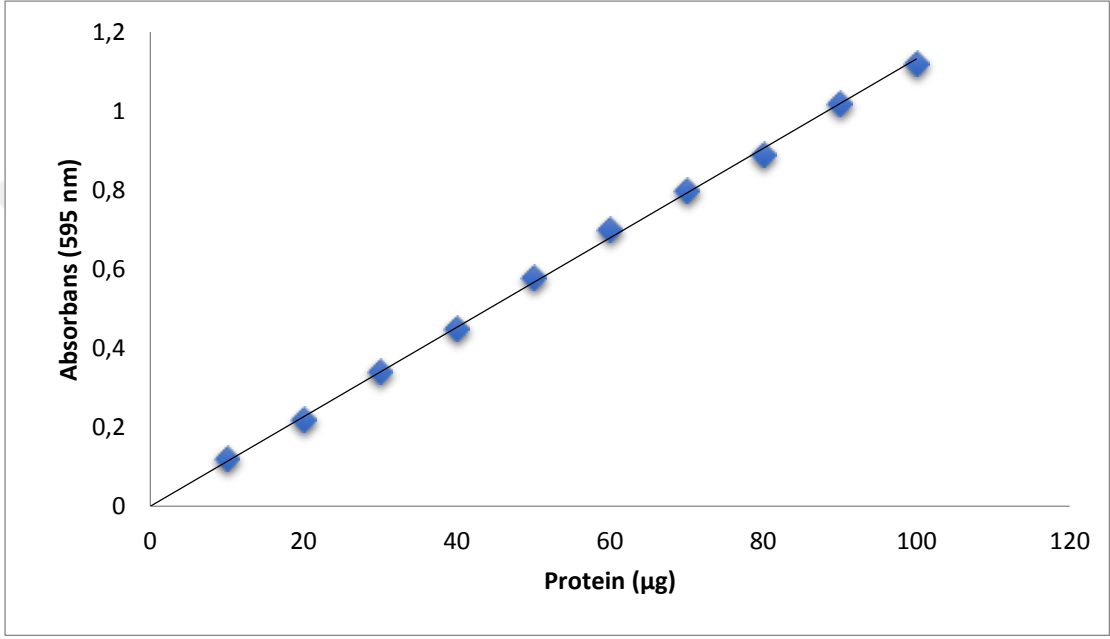
3.3. Sülfonamid Türevlerinin Sentezi

Sülfonamid bileşiklerin sentezi (**1-9** numaralı), Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tayfun ARSLAN tarafından 'FEN-BAP-A-250414-55' kapsamında sentezlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik

Bradford yöntemiyle, elde ettiğimiz enzim çözeltilerindeki kantitatif protein tayini yapıldı. Öncelikle standart grafik hazırlandı. Daha sonra hazırlanan standart grafikten faydalanılarak protein miktarları hesaplandı (Şekil 4.1).



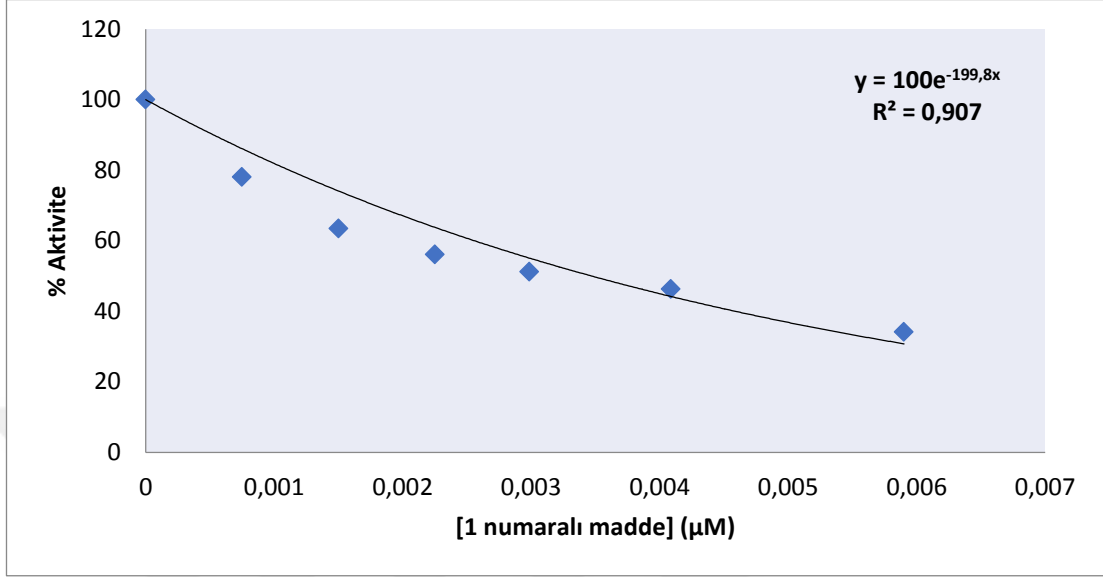
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik.

4.2. hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerine Sülfonamid Türevlerinin Etkilerinin Belirlenmesi için Yapılan Çalışmaların Sonuçları

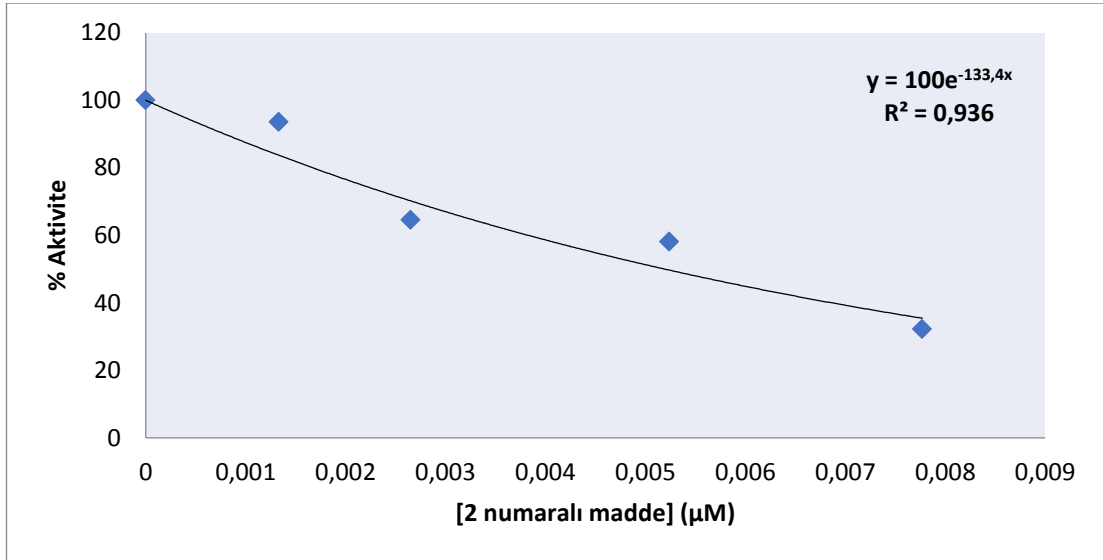
4.2.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevleri ile ilgili sonuçlar

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimi için 9 farklı 4-metilbensülfonamid bileşiklerinin etkisi araştırıldı. Ölçümler, esteraz aktivitesi tayini yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir sülfonamid türevi için (%) aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.2-4.10). Daha sonra, bu grafiklerden

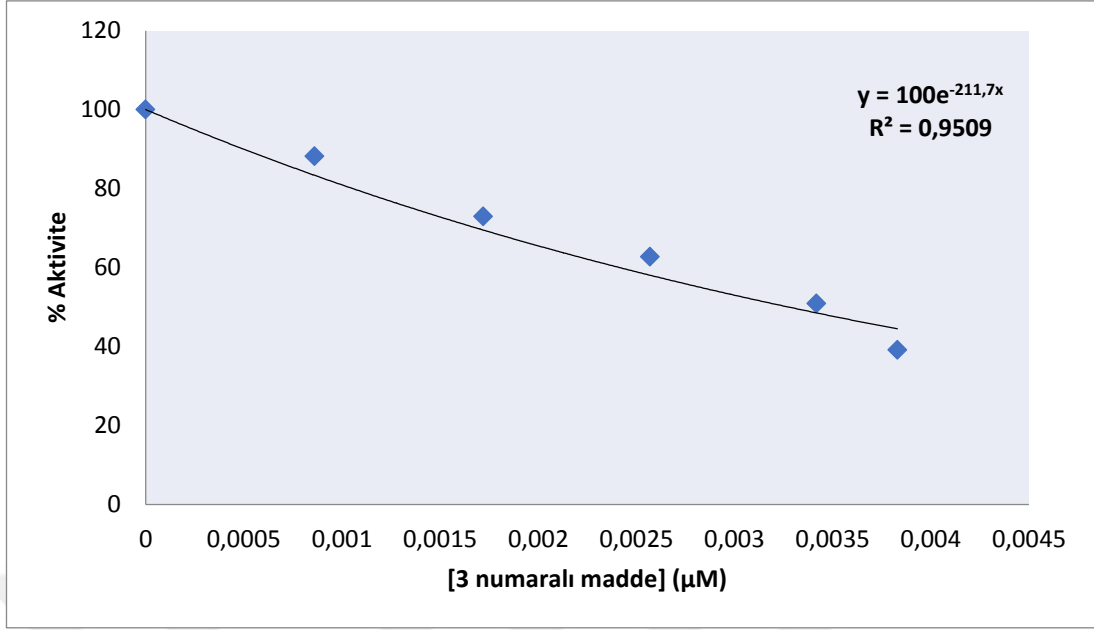
yararlanılarak %50 enzim inhibisyonuna sebep olan sülfonamid konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplandı.



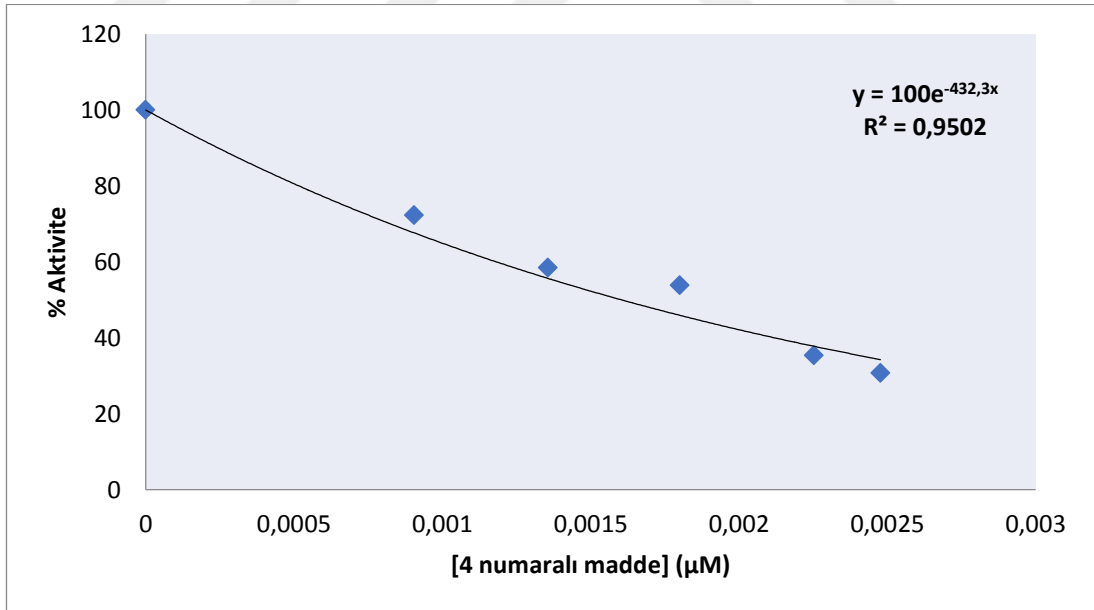
Şekil 4.2. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1 numaralı madde] grafiği.



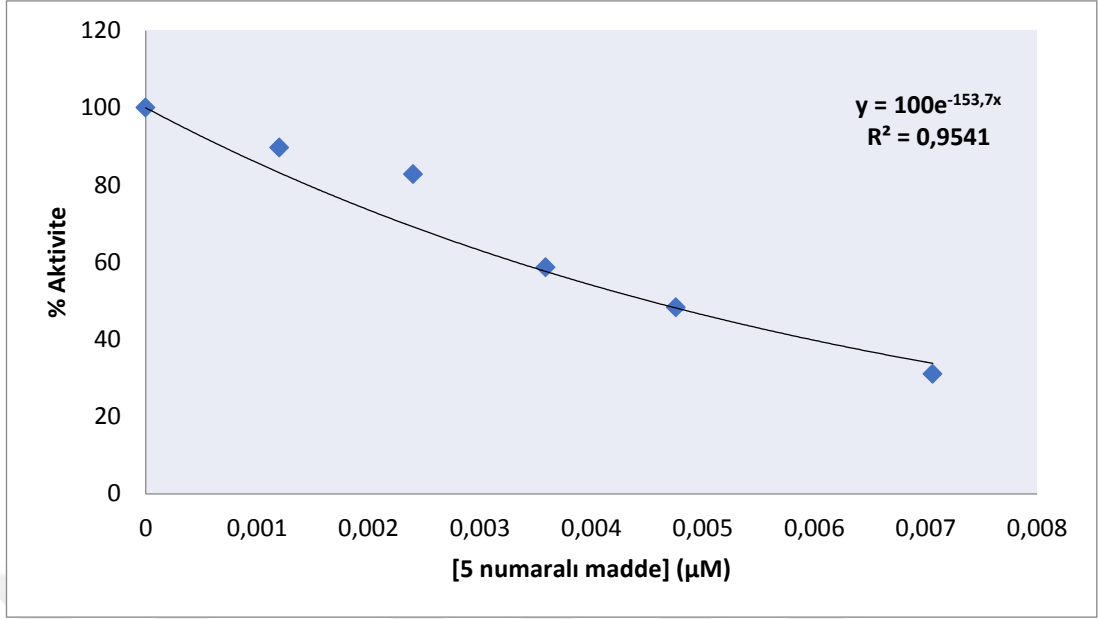
Şekil 4.3. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2 numaralı madde] grafiği.



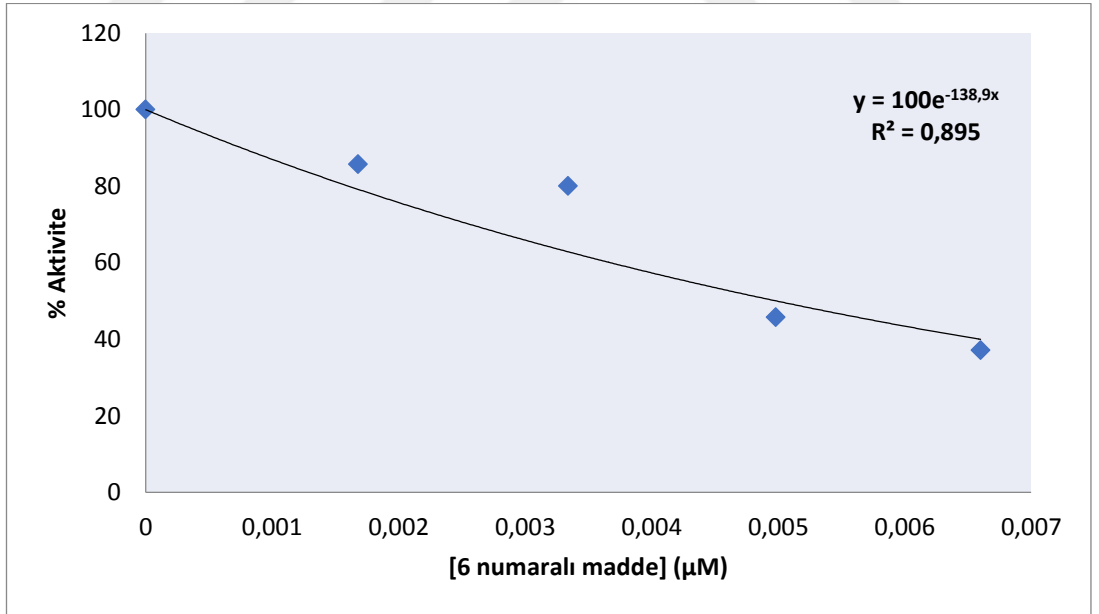
Şekil 4.4. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3 numaralı madde] grafiği.



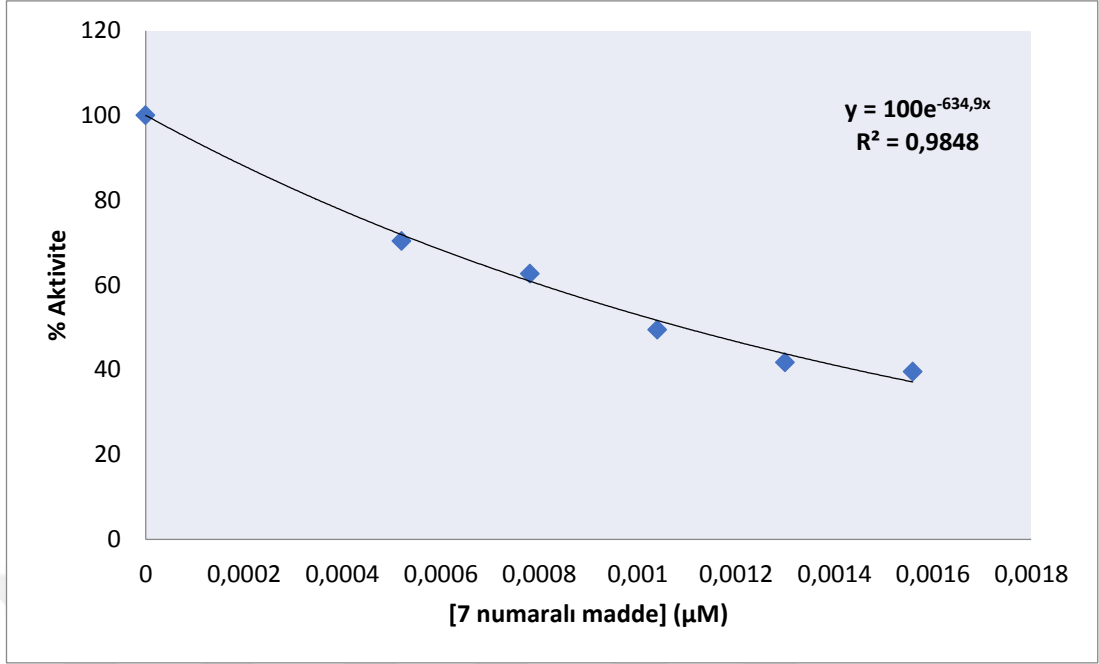
Şekil 4.5. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 4 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[4 numaralı madde] grafiği.



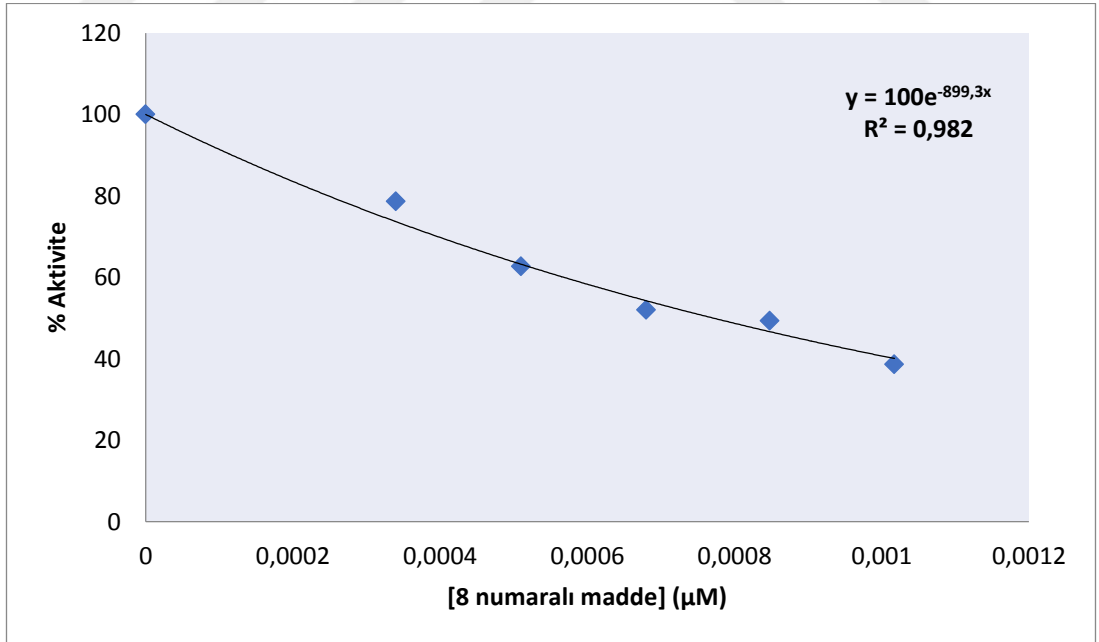
Şekil 4.6. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 5 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5 numaralı madde] grafiği.



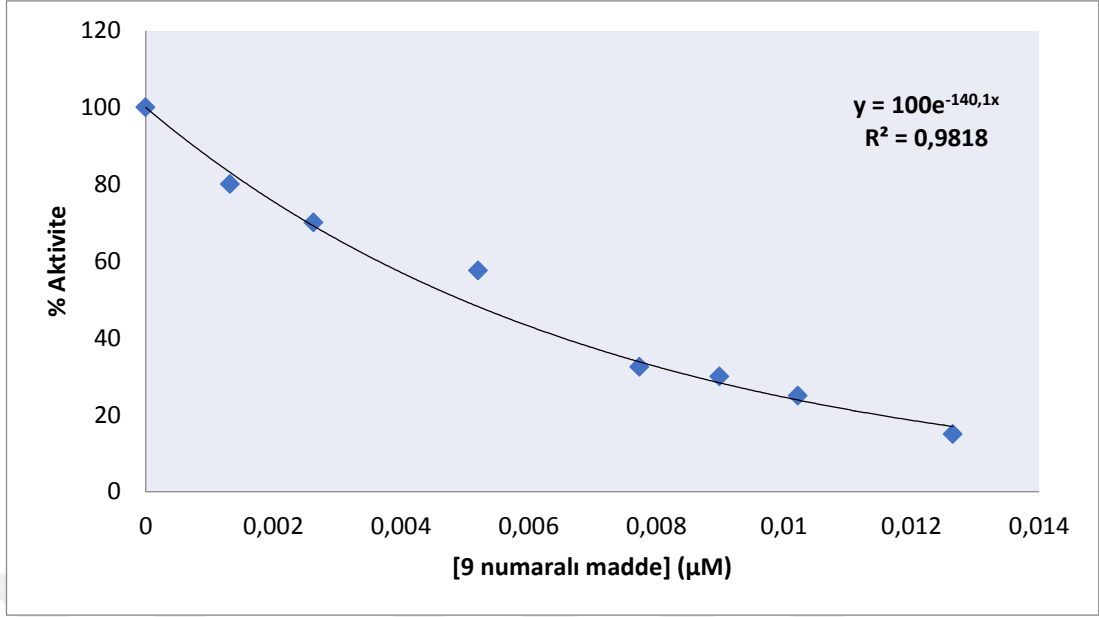
Şekil 4.7. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 6 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[6 numaralı madde] grafiği.



Şekil 4.8. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 7 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[7 numaralı madde] grafiği.



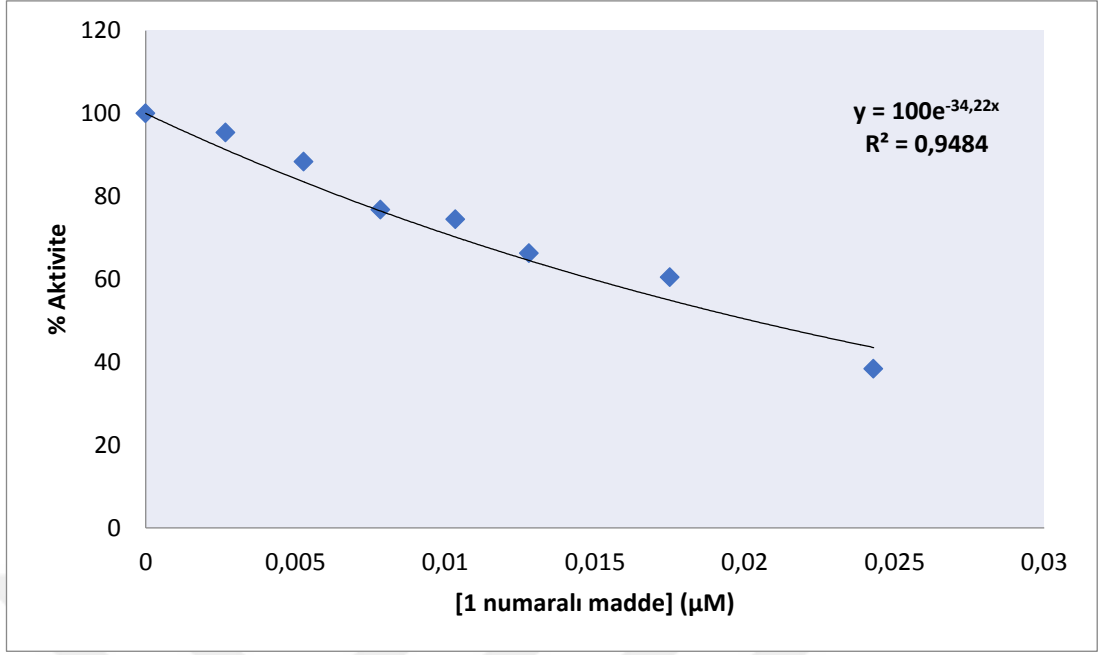
Şekil 4.9. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 8 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[8 numaralı madde] grafiği.



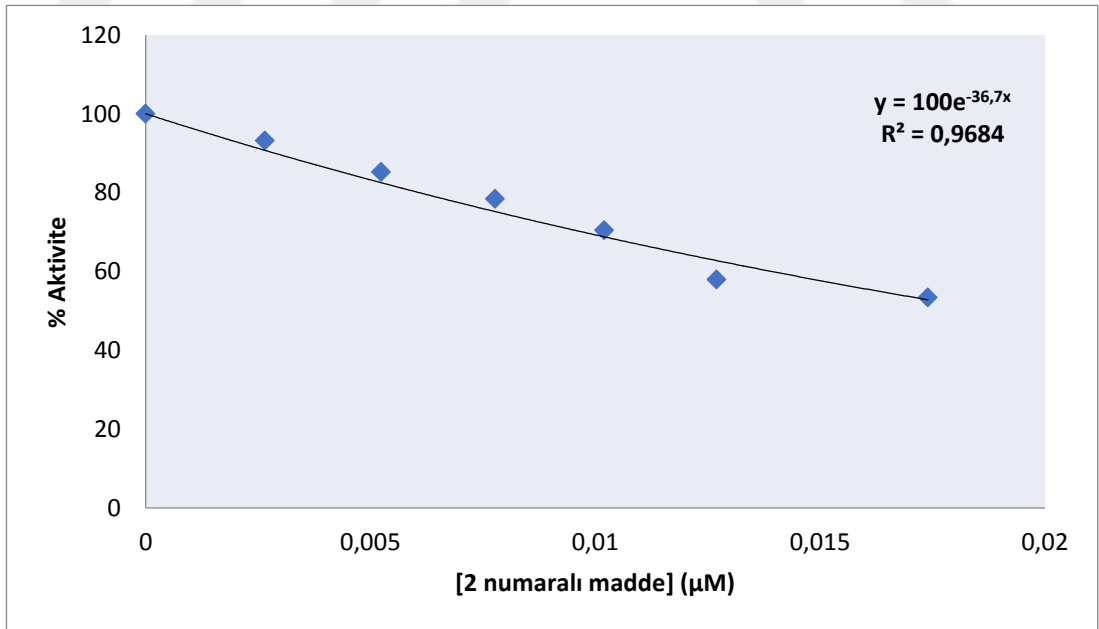
Şekil 4.10. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 9 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[9 numaralı madde] grafiği.

4.2.2. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevleri ile ilgili sonuçlar

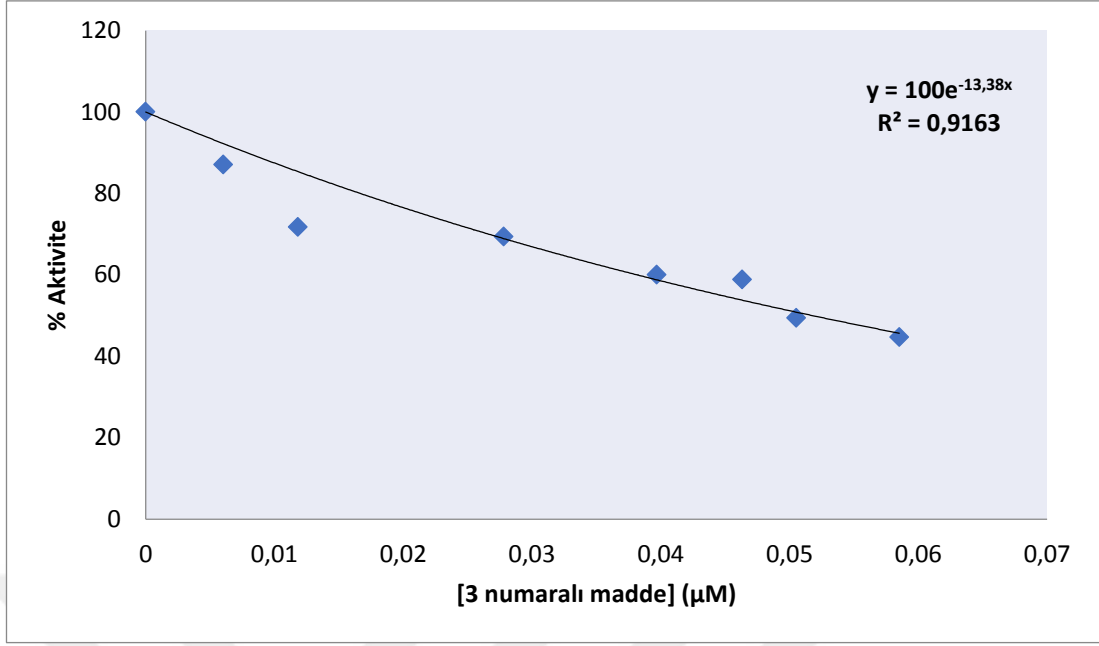
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimi için 9 farklı 4-metilbensülfonamid bileşiklerinin etkisi araştırıldı. Ölçümler, esteraz aktivitesi tayin yöntemiyle yapıldı. İnhibisyon etkisi gösteren her bir sülfonamid türevi için (%) aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 4.11-4.19). Daha sonra, bu grafiklerden yararlanılarak %50 enzim inhibisyonuna sebep olan sülfonamid konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri) hesaplandı.



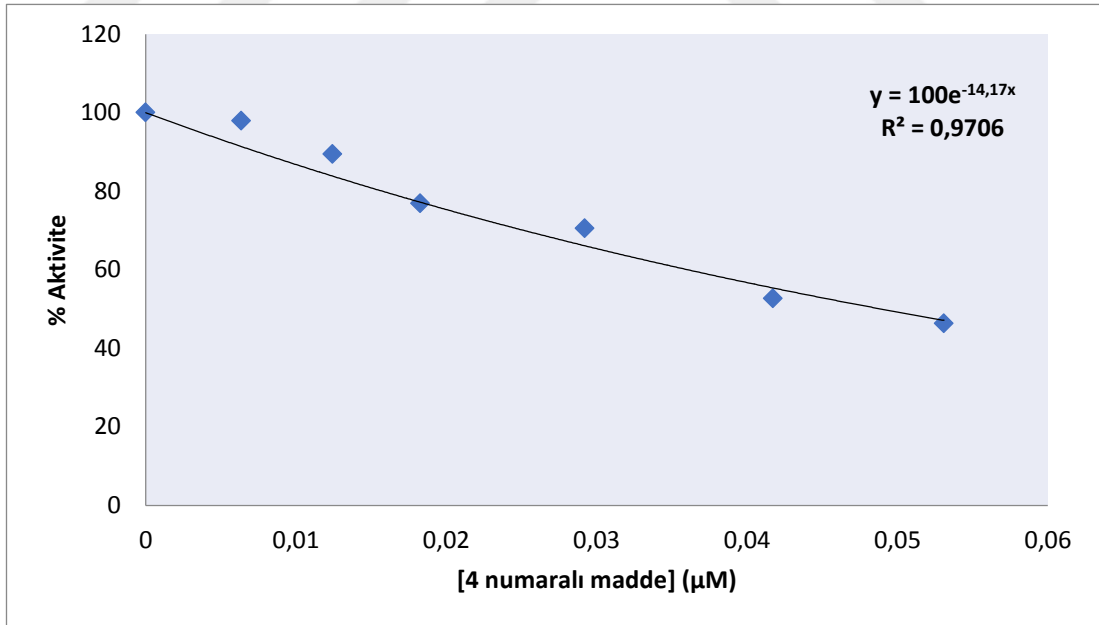
Şekil 4.11. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 1 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[1 numaralı madde] grafiği.



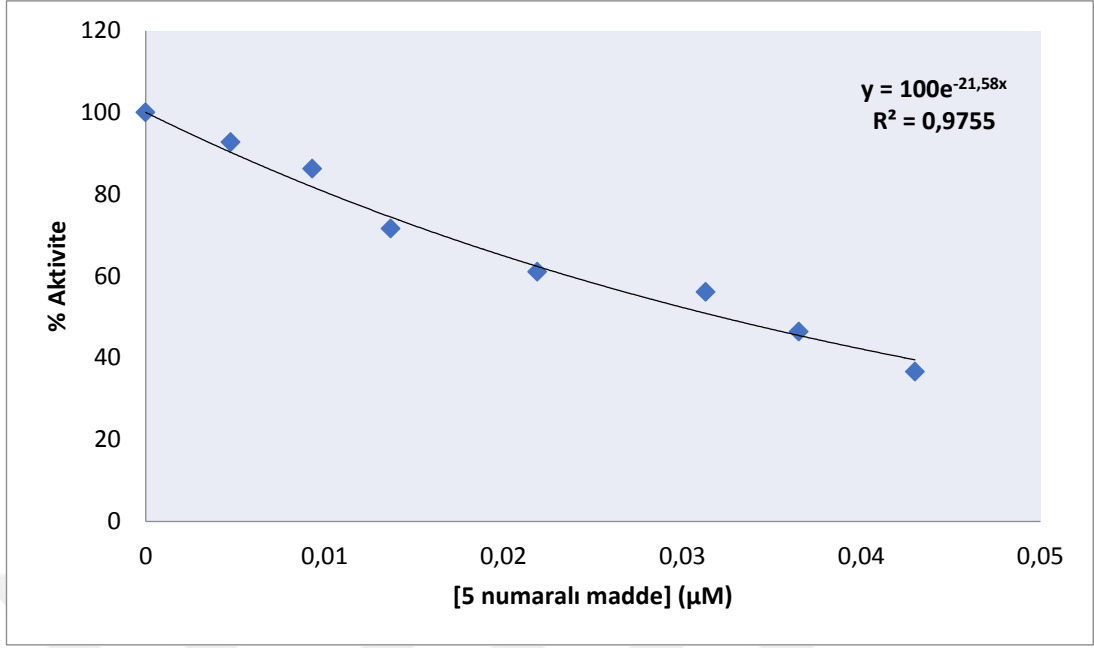
Şekil 4.12. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 2 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[2 numaralı madde] grafiği.



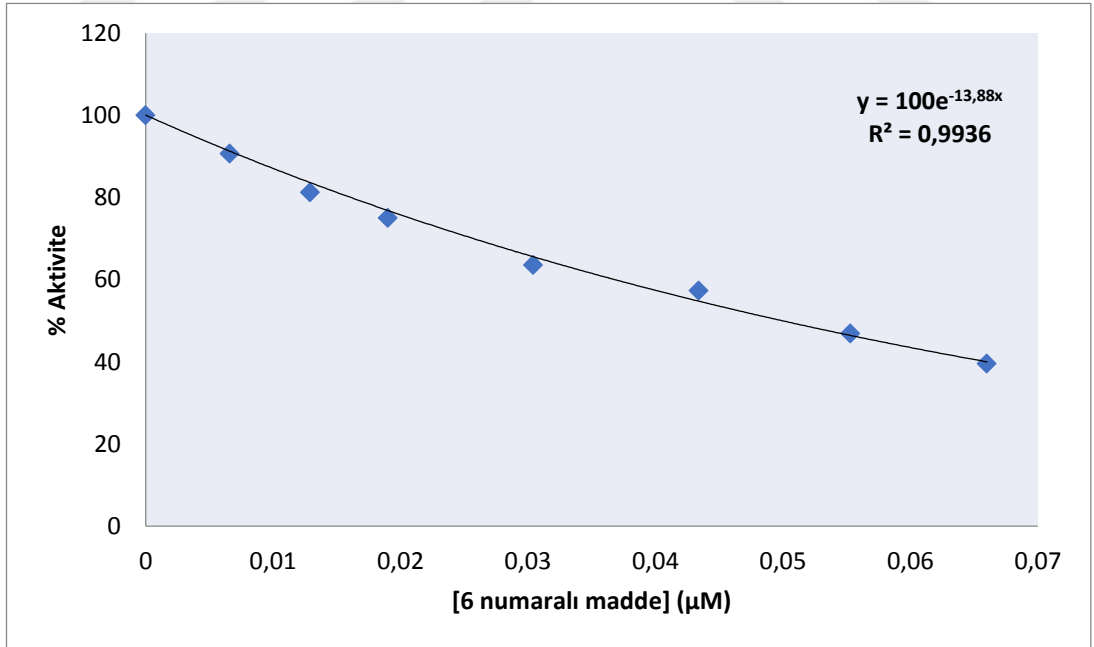
Şekil 4.13. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 3 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[3 numaralı madde] grafiği.



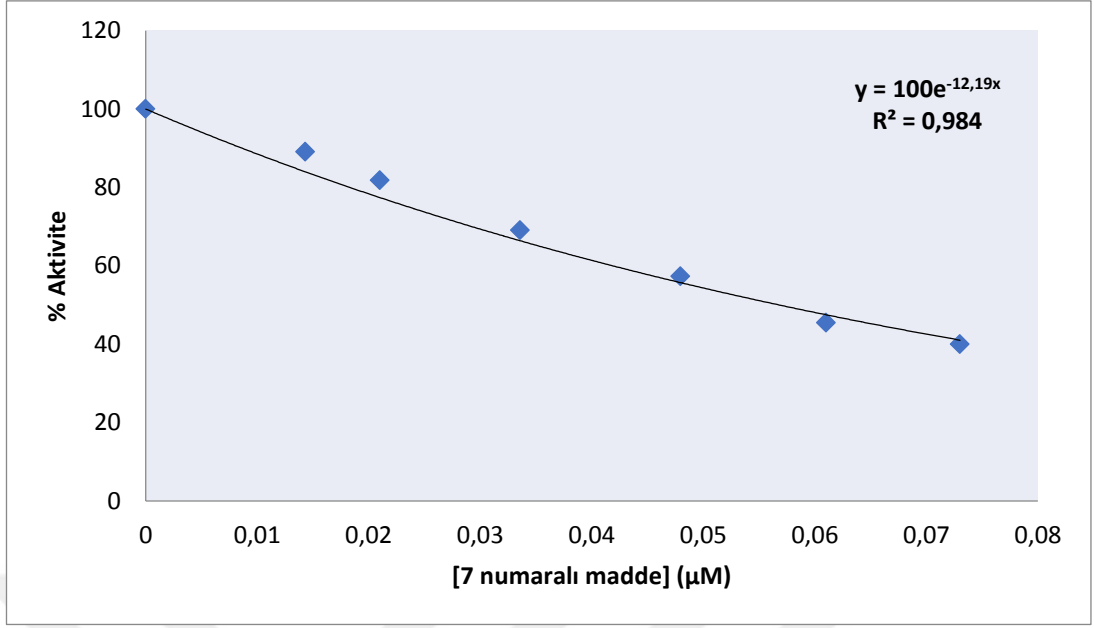
Şekil 4.14. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 4 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[4 numaralı madde] grafiği.



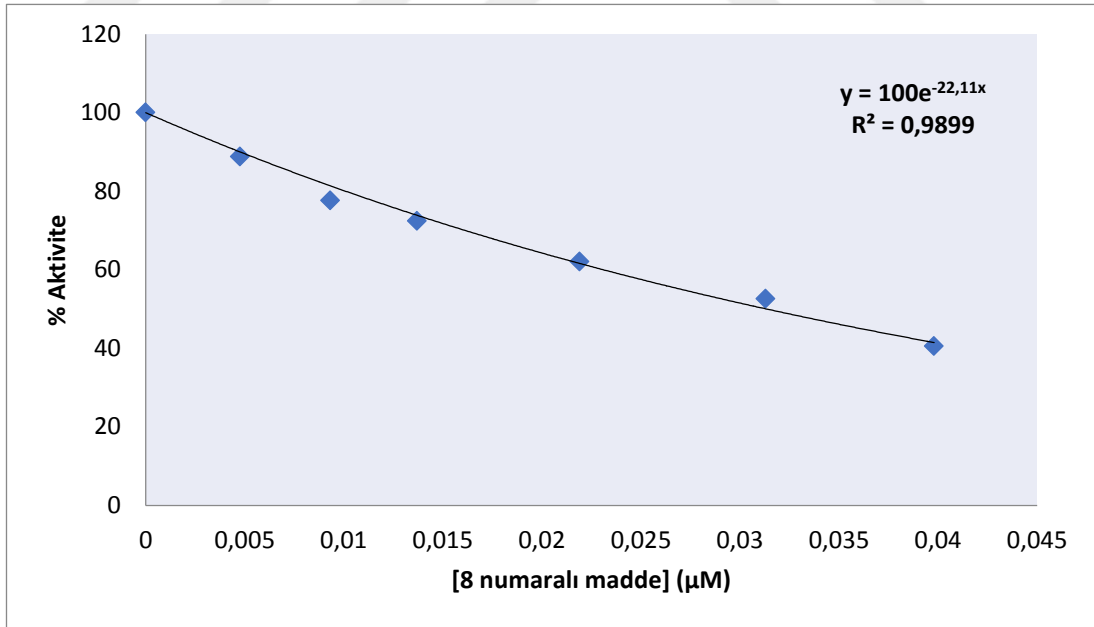
Şekil 4.15. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 5 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[5 numaralı madde] grafiği.



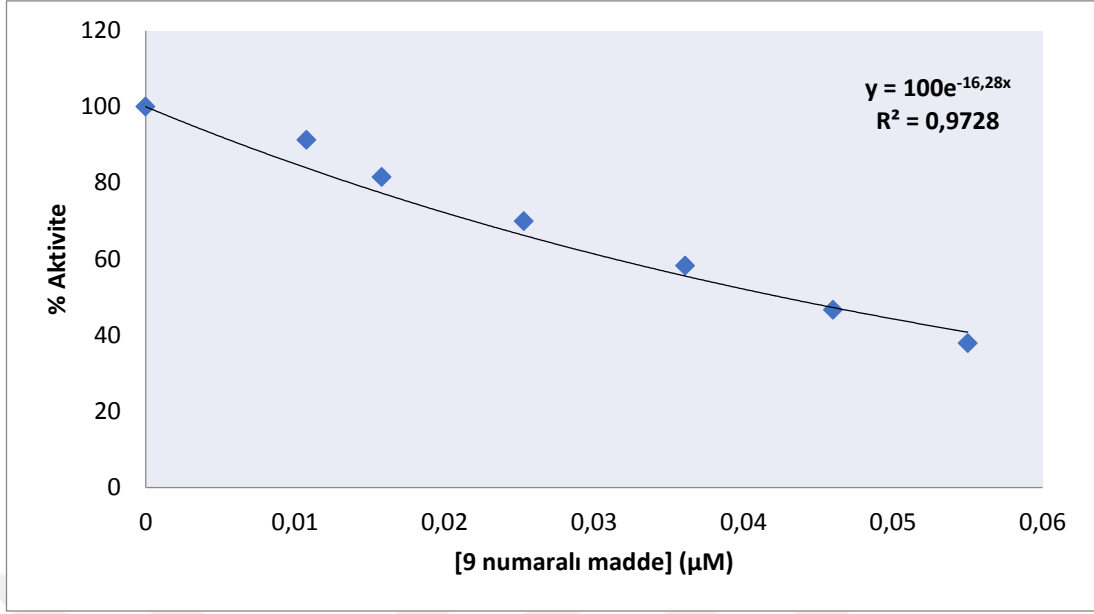
Şekil 4.16. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 6 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[6 numaralı madde] grafiği.



Şekil 4.17. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 7 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[7 numaralı madde] grafiği.



Şekil 4.18. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 8 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[8 numaralı madde] grafiği.



Şekil 4.19. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi yöntemi ile 9 numaralı maddenin farklı konsantrasyonlarında IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[9 numaralı madde] grafiği.

4.2.3. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevlerinin IC_{50} değerlerinin belirlenmesi ile ilgili sonuçlar

Numaralandırılmış sülfonamid bileşiklerine ait % Aktivite-[I] grafikleri çizildikten sonra bu grafiklerden faydalanılarak %50 inhibisyona sebep olan 4-metilbensülfonamid bileşiklerinin konsantrasyonları (IC_{50} değerleri) hesaplandı. Elde edilen tüm verilerin daha iyi karşılaştırılabilmesi için bu değerler birer çizelge halinde gösterildi (Çizelge 4.1, 4.2).

Çizelge 4.1. hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevlerinin %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri).

İnhibitör	hCA I için IC₅₀ değerleri (nM)
1 numaralı madde	3,469
2 numaralı madde	5,196
3 numaralı madde	3,274
4 numaralı madde	1,603
5 numaralı madde	4,510
6 numaralı madde	4,990
7 numaralı madde	1,092
8 numaralı madde	0,770

Çizelge 4.2. hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevlerinin %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları (IC₅₀ değerleri).

İnhibitör	hCA II için IC₅₀ değerleri (nM)
1 numaralı madde	20,255
2 numaralı madde	18,887
3 numaralı madde	51,805
4 numaralı madde	48,916
5 numaralı madde	32,120
6 numaralı madde	49,938
7 numaralı madde	56,862
8 numaralı madde	31,350
9 numaralı madde	42,576

4.2.4. İnsan eritrosit CA I-II enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları sonuçları

İnsan kanından elde edilen hemolizatın, Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonilamid kolonuna uygulanması sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. İnsan eritrositlerinden hCA I-II izoenzimlerinin Sefaroz-4B-L-tirozin sülfonamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılması basamakları.

Saflaştırma basamakları	Toplam hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Aktivite (EU/mL)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	12	15,86	115	190,32	1380	7,251	100	1
hCA I	6	0,22	156	1,33	936	703,76	67,82	97,05
hCA II	4	0,05	170	0,20	680	3400	49,27	468,90

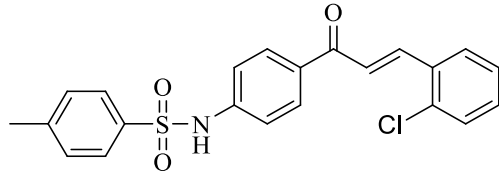
4.3. Sentezlenen Bileşiklerin ^1H - ^{13}C NMR'ları

4.3.1. Kimya

Bruker Ascend 400 (100)-Mhz spektrometrelerinde ^1H ve ^{13}C spektrumları kaydedildi ve dahili standart olarak Me_4Si 'ye göre kimyasal kaymalar bildirildi (λ). Elementel analizler, Costech ECS 4010 cihazı üzerinde gerçekleştirildi. Erime noktaları, bir Barnstead elektrotermal 9200 serisi dijital cihaz kullanılarak belirlendi.

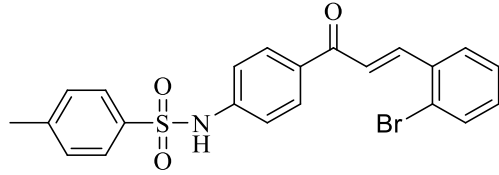
4.3.2. Sülfonamid türevlerinin sentezleri için genel metod

Karbonaldehit (20.0 mmol) ve uygun bir asetofenon (20.0 mmol) etanol (6 mL) solüsyonuna NaOH'nın sulu bir çözeltisi (%30, 10 mL) ilave edildi. Karışım, bir gün oda sıcaklığında karıştırıldı ve daha sonra buzlu su üzerine döküldü. Karışım, 3M hidroklorik asit kullanılarak nötrale edildi. Elde edilen çökelti filtrelendi ve etanol-su ve eterden kristalleştirildi.



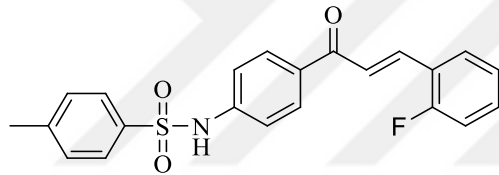
(1)

(E) -N- (4- (3- (2-klorofenil) akriloyl) fenil) -4-metilbenzensülfonamid (Bahekar *et al.* 2016)



(2)

(E) -N- (4- (3- (2-bromofenil) akriloyl) fenil) -4-metilbenzensülfonamid (Bahekar *et al.* 2016)



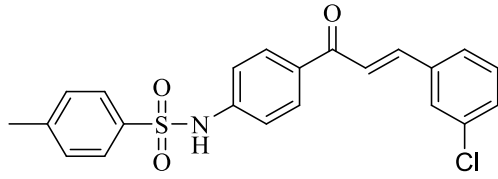
(3)

(E) -N- (4- (3- (2-florofenil) akriloyl) fenil) -4-metilbenzensülfonamid

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), (δ :ppm): 8.04 (d,J=8,2H), 7.92 (d,J=16,2H), 7.74 (d,J=8,2H), 7.38 (d,J=7.2,2H), 7.25 (m, 2H), 7.07 (m, 3H), 7.00 (m,2H).

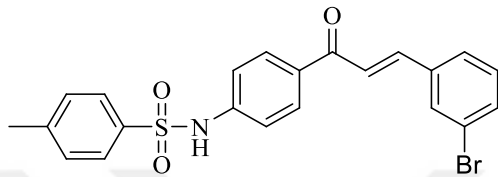
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), (δ :ppm): 187.81, 162.59/160.10, 144.21, 143.13, 136.92, 135.09, 132.66, 130.73/130.36, 130.25/129.53, 127.22, 125.42, 125.39, 124.49, 124.46/122.86, 122.75, 118.41/118.30, 116.64/116.43.

Hesaplama değeri: $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{FNO}_3\text{S}$: C, 66.82; H, 4.59; N, 3.54; Bulunan değeri: C, 66.86; H, 4.63; N, 3.57.



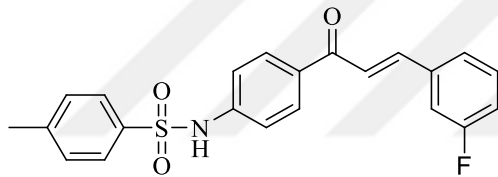
(4)

(E) -N- (4- (3- (3-klorofenil) akriloil) fenil) -4-metilbensensülfonamid (Agrawal *et al.* 2016)



(5)

(E) -N- (4- (3- (3-bromofenil) akriloil) fenil) -4-metilbensensülfonamid (Bahekar *et al.* 2016)



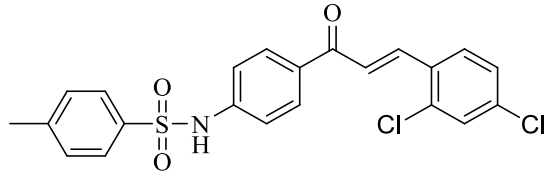
(6)

(E) -N- (4- (3- (3-fluorofenil) akriloil) fenil) -4-metilbensensülfonamid

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), (δ :ppm): 8.07(d,J=8,2H), 7.91(d,J=16,1H), 7.72(d,J=8,2H), 7.38(m,3H), 7.30-7.20(m,3H), 7.12(m,3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), (δ :ppm): 187.91, 164.17-161.75(d,J=242), 144.23, 143.05, 142.81, 142.44, 137.82-136.92 (d,j=90), 132.79, 132.37, 130.34, 130.25, 131.34-131.26(d,j=8), 127.23-127.20(d,j=3), 125.96, 123.83, 118.37-118.32(d,j=50), 115.15(d,j=220).

Hesaplama değeri: $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{FNO}_3\text{S}$: C, 66.82; H, 4.59; N, 3.54; Bulunan değer: C, 66.85; H, 4.62; N, 3.57.



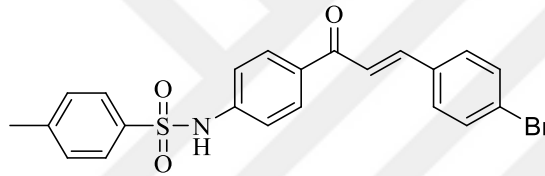
(7)

(E) -N- (4- (3- (2,4-diklorofenil) akriloil) fenil) -4-metilbensensülfonamid

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6), (δ :ppm): 7.70-7.75 (m,3H), 8.07 (d,J=8.2,2H), 7.19(d,J=8.2H), 7.9(d,J=7.2=2H), 8.2(d,J=15.2,1H), 7.2-7.32(m,3H).

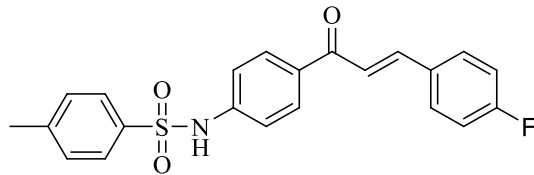
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6), (δ :ppm): 187.57, 144.07, 143.44, 143.09, 139.20, 135.96, 135.52, 132.23, 131.93, 131.45, 130.84, 130.31, 130.24, 129.96, 127.19, 125.76, 118.43, 21.42.

Hesaplama değeri: $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{NO}_3\text{S}$: C, 59.20; H, 3.84; N, 3.14; Bulunan değeri: C, 59.23; H, 3.85; N, 3.17.



(8)

(E) -N- (4- (3- (4-bromofenil) akriloil) fenil) -4-metilbensensülfonamid (Ghorab *et al.* 2015)



(9)

(E) -N- (4- (3- (4-fluorofenil) akriloil) fenil) -4-metilbensensülfonamid (Ghorab *et al.* 2015)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Karbonik anhidrazlar, fizyolojik koşullar altında karbon dioksitin bikarbonata ve bir protona dönüşen hidrasyonunu katalizleyen metaloenzimlerdir (Akocak *et al.* 2017). Meydana gelen reaksiyon tersinirdir (Engberg *et al.* 1985). Bu reaksiyonların birinci dereceden hız sabitleri, hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonları için sırasıyla $3,5 \cdot 10^{-2}$ ve 20 saniye^{-1} 'dir (Henry and Swenson 2000). Karbonik anhidrazlar; arkealarda, bakterilerde, omurgalılarda, protozoalarda, yosunlarda ve yeşil bitkilerin kloroplastlarında bulunur (Çoban *at al.* 2008; Ghiasi *et al.* 2017; Piazzetta *et al.* 2017). CA izoformları pH düzenlemesi, elektrolit salınımı, biyosentetik süreçlerde ve tümörigenez gibi birçok fizyolojik süreçlerde rol oynar (Carta *et al.* 2015).

CA izoenzimlerinin doku dağılımı, kinetik özellikleri ve hücre altı lokalizasyonlarında farklılıklar vardır. CA I, II, III, VII ve XIII sitoplazmada iken; IV, IX, XII ve XIV membrana bağlıdır; VA ve VB mitokondride bulunur; CA VI salgı formudur (Bottcher *et al.* 1994; Demir *et al.* 2001; Hilvo *et al.* 2005). CA izozimlerinin çoğu ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi, yükseklik hastalığı ve osteoporoz gibi bir dizi rahatsızlığın tedavisinde önemli terapötik hedeflerdir.

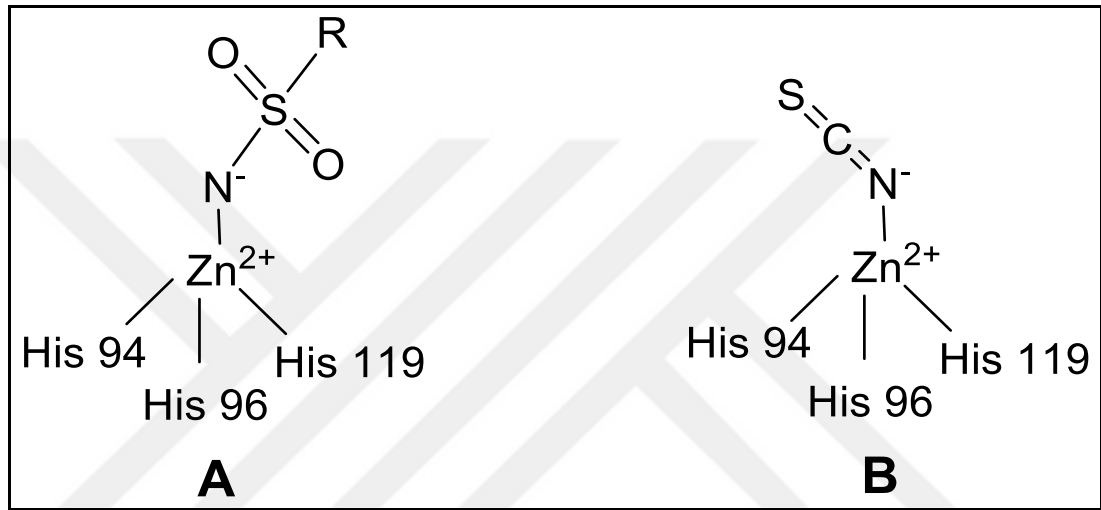
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin tanımlanması; moleküler ve kinetik karakterizasyon, subseleler fraksiyonlama ve sülfonamidler gibi spesifik inhibitörler ile birtakım deneysel yaklaşımlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şimdiye kadar sayısız sülfonamid ve sülfonamid olmayan (fenoller, tiyoller, kumarinler, poliaminler ve ditiyokarbamatlar) CA inhibitörleri sentezlendi veya izole edildi. CA inhibitörleri arasında en umut verici sınıf, süstitüe olmayan sülfonamidlerdir (Mert *et al.* 2015; Koutnik *et al.* 2017).

Sülfonamidler, sülfamadlar ve sülfamid bileşikleri ile biyoizosterileri en çok kullanılan CA inhibitörleri iken; birinci sınıf sülfonamidler en çok araştırılan CA inhibitörleridir (Angapelly *et al.* 2017; İvanova *et al.* 2017; Kocyigit *et al.* 2017).

Sülfonamid CA inhibitörleri, sistemik veya topikal olarak uygulanmaktadır. Sistemik inhibitörler genellikle istenmeyen yan etkilere neden olduğundan son zamanlarda topikal uygulanabilen suda çözünür sülfonamid CA inhibitörlerinin geliştirilmesi yoluna gidilmiştir. Güçlü CA inhibitörleri olan RSO_2NH_2 tipi sülfonamidler, çeşitli hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde yaygın olarak

kullanılmaktadır (Renzi *et al.* 2000). Şekil 5.1’de sülfonamidler ve anyonik inhibitörlerin CA inhibisyon mekanizması gösterilmiştir.

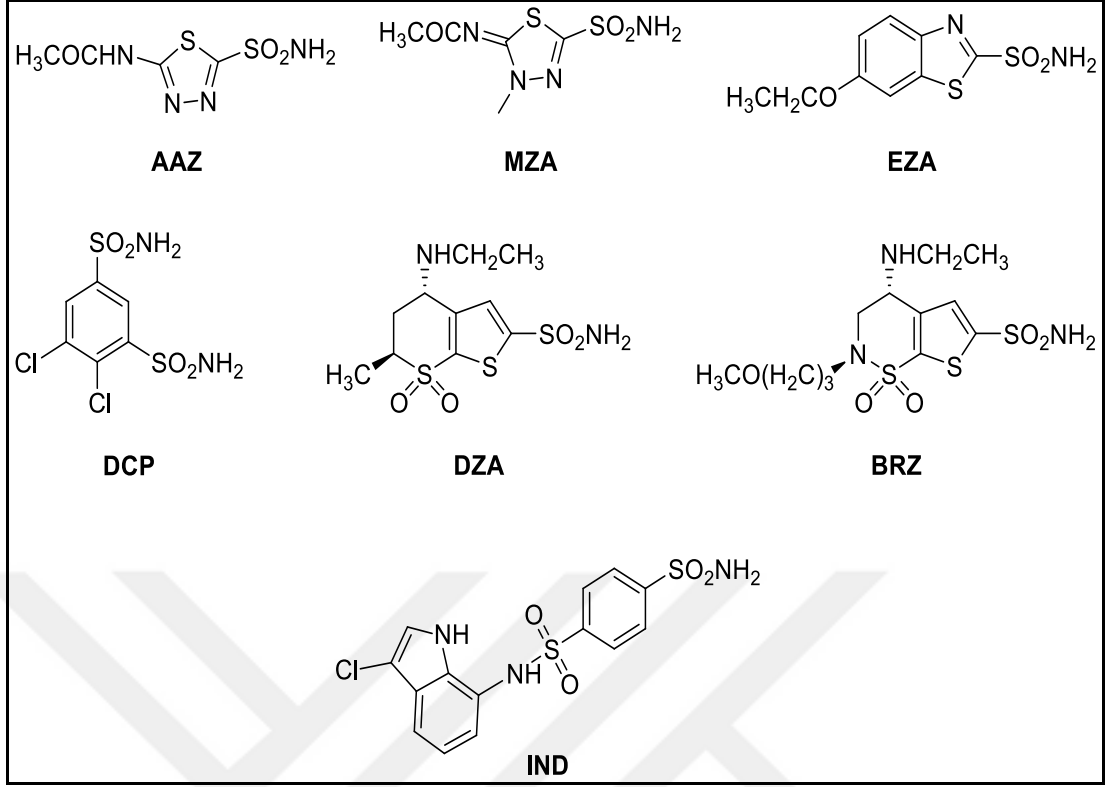
Sülfonamidler ve bunların Schiff bazından türetilen bileşikler, birçok ilaç metal kompleksleri şeklinde uygulandıklarında, modifiye farmakolojik ve toksikolojik potansiyele sahiptir. Serbest bir amino grubuna sahip olan sülfonamidler, kolaylıkla türevlenebilir ve geniş bir biyomedikal uygulama alanına sahiptir (Chohan *et al.* 2012).



Şekil 5.1. Sülfonamidler ve anyonik inhibitörler tarafından inhibe edilen CA enziminin inhibisyon mekanizması (Supuran *et al.* 2004).

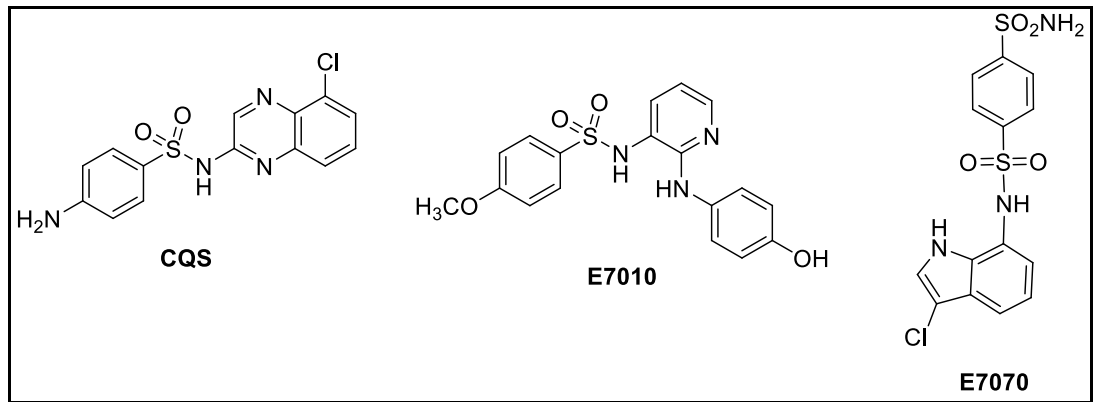
CAI ilaçları, halka yaklaşımı ile yani sülfamoil kısımları içeren çok sayıda halka sistemi araştırılarak tasarlanmıştır. Daha sonra, alternatif bir yaklaşım olan ‘kuyruk yaklaşımı’ ile topikal aktiviteye sahip antiglokoma CAI’lerin tasarımı belirtilmiştir (Chazalette *et al.* 2004).

Glokom, artmış göz içi basıncı (GİB) ile karakterize bir hastalıktır. Göz içi basıncındaki bu artış, optik sinir hasarına yol açar ve glokoma bağlı görme kaybı için kabul edilen bir risk faktörüdür (Vernier *et al.* 2010). Benzothiadiazine ve yüksek tavan diüretiklerinin yanısıra sistemik antiglokoma ilaçları, asetazolamid, metazolamid, etoksazolamid ve diklorofenamid’in gelişimini sağlamıştır. Glokom tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar Şekil 5.2’de gösterilmiştir.



Şekil 5.2. Sistemik antiglokom ilaçları (Chazalette *et al.* 2004)

Primer sülfonamidler ve analogları, diüretik maddeler olarak yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra özellikle son yıllarda kanser tedavisinde CA inhibitörlerinin ana sınıfını oluşturmaktadır (Eldehna *et al.* 2017, Şekil 5.3). Ayrıca sülfonamid CA inhibitörleri, antikonvülsan ve antiobezite faktörleri olarak da klinik kullanımları mevcuttur (Carta *et al.* 2015).



Şekil 5.3. Antitümör sülfonamid türevlerinin yapısı (Supuran and Scozzafava 2000)

Bu çalışmada, insan taze kanından CA I ve CA II izoenzimleri saflaştırıldı ve yeni tasarlanan sülfonamidlerle, CA'nın esteraz aktivitesini kullanarak inhibisyon çalışması yapıldı. Kullanılan insan CA I ve II izozimleri, kromatografi yöntemi ile saflaştırılmıştır (Arslan *et al.* 2016).

Çalışmamızda kullanılan karbonik anhidraz (CA) izoenzimlerinin (hCA I-II) saflaştırılması için öncelikle Sefaroz-4B afinite jeli hazırlandı, daha sonra, izoenzimler eritrositlerden saflaştırıldı. Afinite kromatografisinde kullanılmak üzere Sefaroz-4B üzerinde hazırlanan afinite jeli, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlendi. Önce matriks olarak seçilen Sefaroz-4B, CNBr ile aktifleştirildi. CNBr ile aktifleştirilen jele, L-tirozin uzantı kolu takıldı. Daha sonra, sülfanilamid diazollanarak tirozine kenetlendirildi. Jele adsorbe olan karbonik anhidraz izoenzimlerinin (hCA I-II) elüsyonları için sırasıyla kullanılan tampon çözeltileri; 25 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl (pH 6,3) ve 0,1 M CH₃COONa / 0,5 M NaClO₄ (pH 5,6)'dır. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin spesifik aktiviteleri sırasıyla 703,76 EU / mg ve 3400 EU / mg olup, %67,82 ve %49,27 verimle saflaştırıldı.

Kalitatif protein tayini, Warburg yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu metotta proteinlerin ihtiva ettiği tirozin ve triptofan amino asitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Segel 1968). Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında elüatların protein miktarları, belirtilen dalga boyunda absorbansları ölçülerek belirlendi.

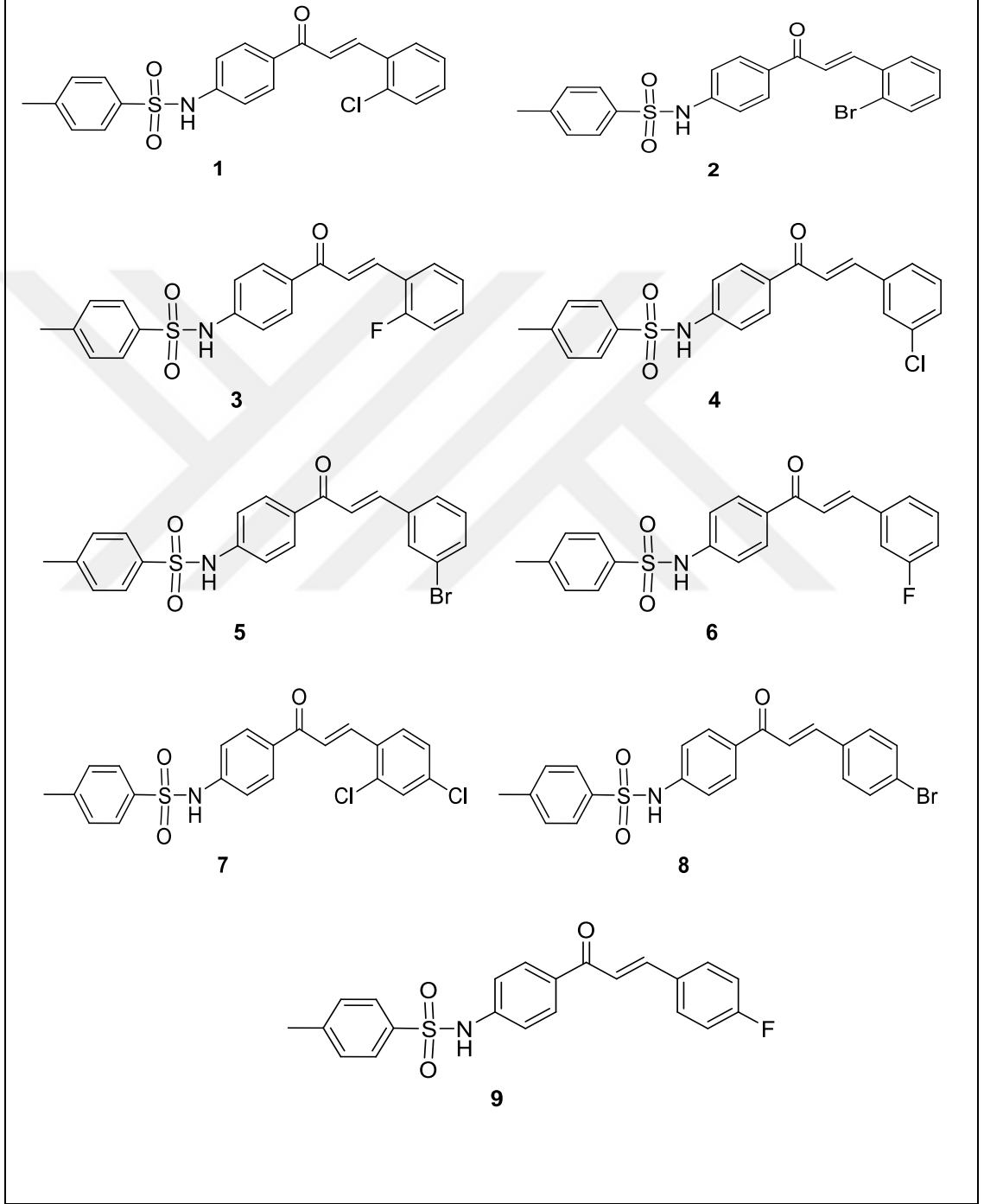
Coomassie-Blue yöntemi ile kantitatif protein tayini belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayinlerine göre avantajları; bozucu faktörlerin pek olmaması, kısa sürede uygulanabilirliği ve protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Enzim aktivitesi tayini için kullanılan aktivite yöntemi, esteraz aktivitesidir. Bu yöntem, karbonik anhidrazın ester bağlarının parçalanması esasına dayanır. Karbonik anhidraz enzimi, *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenole hidroliz etmektedir ve oluşan bu ürün ise 348 nm'de absorpsiyon vermektedir.

Suda çözünmeyen *p*-Nitrofenil asetat öncelikle az miktarda asetonda çözüldü ve daha sonra su ile seyreltilerek sulu çözeltileri hazırlandı. Çözücü olarak asetonun tercih edilmesinin nedeni ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır (Armstrong *et al.* 1966; Verportee *et al.* 1967). hCA I ve hCA II

izoenzimlerinin bulunduğu ortamdan dolayı (eritrositler) aktivite ölçüm pH'sı 7,4 olarak alınmıştır.

Şekil 5.4'te çalışmamızda kullanılan 4-metilbenzen Sülfonamid türevlerinin (1-9 nolu bileşikler) açık formülleri gösterilmiştir.



Şekil 5.4. 4-metilbenzen Sülfonamid türevlerinin yapısı – CA inhibitörleri

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri için farklı inhibitör konsantrasyonlarında esteraz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibitör etkisi gösteren sülfonamid türevleri için % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklere bağlı olarak IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 5.1). IC₅₀ değeri, inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede kullanılmıştır.

Çizelge 5.1. hCA I-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevlerinin %50 inhibisyona sebep olan konsantrasyonları.

İnhibitör	hCA I-II için IC ₅₀ değerleri (nM)	
	hCA I	hCA II
1	3,469	20,255
2	5,196	18,887
3	3,274	51,805
4	1,603	48,916
5	4,510	32,120
6	4,990	49,938
7	1,092	56,862
8	0,770	31,350
9	4,497	42,576
AZA	21,95*	15,170*

* Gokcen *et al.* 2016 referansından alınmıştır.

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi hCA I-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-metilbensülfonamid türevlerine ait IC₅₀ değerleri, sırasıyla hCA I için 0,770-5,196 nM, hCA II için 18,887-56,862 nM aralığındadır.

Pek çok sülfonamid / sülfamad CAI’sı önemli fizyolojik fonksiyonları oynadığı düşünülen memeli izozimleri için yüksek afiniteye sahip olmakla birlikte, bu sınıftan yeni farmakolojik bileşiklerin tasarlanması için temel sorun, bu tür bileşiklerin farklı hedef izozimlere karşı spesifikliğinin olmamasıdır (Supuran *and* Scozzafava 2007).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında:

- ❖ İnsan eritrositlerindeki karbonik anhidraz enzimi, Sefaroz-4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kolonu uygulanarak saflaştırıldı.
- ❖ 4-metilbensülfonamid türevlerinin, saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkileri incelendi. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren maddeler için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Elde edilen değerlere göre sülfonamid bileşiklerinin (**1-9** numaralı) hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibitör etkisi olduğu belirlendi.
- ❖ Tüm bileşiklerin karbonik anhidraz izoenzimi I’e karşı, ticari ilaç olan asetazolamidden daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Ancak AZA, insan karbonik anhidraz izoenzimi II üzerine bileşiklerden daha güçlü inhibisyon özelliği göstermiştir.
- ❖ Söz konusu tasarlanan sülfonamid bileşiklerinin türevleri literatürde de yer almaktadır. Literatürdeki çalışmalar ile kıyaslama yapıldığında araştırdığımız bileşiklerin, bazı türevlerden daha etkili inhibitörler olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızın özgün değeri ise çalışmayı tasarladığımız 4-metilbensülfonamid türevlerinin ilk kez bu tez çalışmasında karbonik anhidraz inhibitörü olarak denenmesidir. Ancak bu teze araştırma konusu olan problem durumu, mevcut inhibitörlerin yeterli olmadığı ve istenmeyen birçok yan etkilerinin oluşmasıdır. Bu nedenle sülfonamid inhibitörlerinin gelişimi hem önemli yan etkileri olmayan yeni ilaç türlerinin elde edilmesinde hem de

özgöl inhibitörlerin bulunduğu spesifik fizyolojik çalışmalar için faydalı olacağı öngörüsündeyiz.



KAYNAKLAR

- Abbate, F., Casini, A., Owa, T., Scozzafa, A. and Supuran, C. T., 2004. "Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(1), 217-223.
- Abdel-Aziz, A. A. M., Angeli, A., El-Azab, A. S., El-Enin, M. A. A. and Supuran, C. T., 2017. "Synthesis and biological evaluation of cyclic imides incorporating benzenesulfonamide moieties as carbonic anhydrase I, II, IV and IX inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(5), 1666-1671.
- Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B. and McKenna, R., 2013. "Structural annotation of human carbonic anhydrases." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2), 267-277.
- Agrawal, N. R., Bahekar, S. P., Agrawal, A. R., Sarode, P. B. and Chandak, H. S., 2016. "Cascade Michael-Aldol reaction: efficient annulation of sulfonamide chalcones into novel cyclohexenones under solvent-free conditions." *Arkivoc*, iv, 227-245.
- Akocak, S., Lolak, N., Nocentini, A., Karakoc, G., Tufan, A. and Supuran, C. T., 2017. "Synthesis and biological evaluation of novel aromatic and heterocyclic bis-sulfonamide Schiff bases as carbonic anhydrase I, II, VII and IX inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(12), 3093-3097.
- Alafeefy, A. M., Carta, F., Ceruso, M., Al-Tamimi, A. M. S., Al-Kahtani, A. A. and Supuran, C. T., 2016. "Development of 3-(4-aminosulphonyl)-phenyl-2-mercapto-3Hquinazolin-4-ones as inhibitors of carbonic anhydrase isoforms involved in tumorigenesis and glaucoma." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24, 1402-1407.
- Al-Rashida, M., Ashraf, M., Hussain, B., Nagra, S. A. and Abbas, G., 2011. "Discovery of new chromone containing sulfonamides as potent inhibitors of bovine cytosolic carbonic anhydrase." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(11), 3367-3371.
- Altıntop, M. D., Sever, B., Özdemir, A., Kucukoglu, K., Onem, H., Nadaroglu, H. and Kaplancikli, Z. A., 2017. "Potential inhibitors of human carbonic anhydrase isozymes I and II: Design, synthesis and docking studies of new 1,3,4-thiadiazole derivatives." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(13), 3547-3554.
- Amine, A., El Harrad, L., Arduini, F., Moscone, D. and Palleschi, G., 2014. "Analytical aspects of enzyme reversible inhibition." *Talanta*, 118, 368-374.
- Angapelly, S., Ramya, P. V. S., Angeli, A., Monti, S. M., Buonanno, M., Alvala, M., Supuran, C. T. and Arifuddin, M., 2017. "Discovery of 4-sulfamoyl-phenyl- β -lactams as a new class of potent carbonic anhydrase isoforms I, II, IV and VII inhibitors: The first example of subnanomolar CA IV inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(2), 539-544.

- Armstrong, J. M., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. and Edsall, J. T., 1966. "Purification of Sepharose-4B and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase." *The Journal Biological Chemistry*, 214(21), 5137-5149.
- Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoglu, B., 1997. "Synthesis and investigation of inhibition effects of new carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 5(3), 515– 518.
- Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 1996. "A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography." *Turkish Journal of Medicinal Sciences*, 26, 163-166.
- Arslan, T., Türkoğlu, E. A., Şentürk, M. and Supuran, C. T., 2016. "Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel chalcone substituted benzenesulfonamides." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(24), 5867-5870.
- Aszalos, A. A., 1978. "Classification of enzymes. Enzymes in anesthesiology." Foldes, F. F. Springer, New York, 71-88.
- Bahekar, S. P., Hande, S. V., Agrawal, N. R., Chandak, H. S., Bhoj, P. S., Goswami, K. and Reddy, M. V. R., 2016. "Sulfonamide chalcones: Synthesis and in vitro exploration for therapeutic potential against *Brugia malayi*." *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124, 262-269.
- Bayrak, Ç., Taslimi, P., Gülçin, İ. and Menzek, A., 2017. "The first synthesis of 4-phenylbutenone derivative bromophenols including natural products and their inhibition profiles for carbonic anhydrase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes." *Bioorganic Chemistry*, 72, 359–366.
- Benfodda, Z., Guillen, F., Romestand, B., Dahmani, A. and Blancou, H., 2010. "Synthesis and investigation of inhibition effect of fluorinated sulfonamide derivatives on carbonic anhydrase." *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(3), 1225-1229.
- Bergaya, F., Theng, B. K. G. and Lagaly, G., 2006. "Handbook of clay science." Elsevier Science, 1224 p, Amsterdam.
- Beydemir, Ş., and Gülçin, İ., 2004. "Effect of melatonin on carbonic anhydrases from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Boone, C. D., Habibzadegan, A., Gill, S. and McKenna, R., 2013. "Carbonic anhydrases and their biotechnological applications." *Biomolecules*, 3(3), 553-562.
- Bottcher, K., Waheed, A. and Sly, W. S., 1994. "Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: Purification, characterization and comparison with mammalian CAs." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312(2), 429-435.
- Bozdog, M., Alafeefy, A. M., Altamimi, A. M., Carta, F., Supuran, C. T. and Vullo, D., 2017. "Synthesis of new 3-(2-mercapto-4-oxo-4H-quinazolin-3-yl)-benzenesulfonamides with strong inhibition properties against the tumor

- associated carbonic anhydrases IX and XII.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(10), 2782–2788.
- 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.
- Bülbül, M., Kasimoğullari, R. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 2008. “Amide derivatives with pyrazole carboxylic acids of 5-amino-1,3,4-thiadiazole 2-sulfonamide as new carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and investigation of inhibitory effects.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 895-900.
- Carta, F., Manelli, L. D. C., Pinard, M., Ghelardini, C., Scozzafava, A., McKenna, R. and Supuran, C. T., 2015. “A class of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors with neuropathic pain modulating effects.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(8), 1828-1840.
- Carta, F., Vullo, D., Osman, S. M., AlOthman, Z. and Supuran, C. T., 2017. “Synthesis and carbonic anhydrase inhibition of a series of SLC-0111 analogs.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(9), 2569-2576.
- Carter, N. D., Hemmett-Emmett, D., Jeffrey, S. and Tashian, R. E., 1981. “Testosterone-induced, sulfonamide-resistant carbonic anhydrase isozyme of rat liver is indistinguishable from skeletal muscle carbonic anhydrase III.” *FEBS Letters*, 128(1), 114-118.
- Chazalette, C., Masereel, B., Rolin, S., Thiry, A., Scozzafava, A., Innocenti, A. and Supuran, C. T., 2004. “Carbonic anhydrase inhibitors. Design of anticonvulsant sulfonamides incorporating indane moieties.” *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(23), 5781–5786.
- Chohan, Z. H., Shad, H. A. and Supuran, C. T., 2012. “Synthesis, characterization and biological studies of sulfonamide Schiff’s bases and some of their metal derivatives.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(1), 58-68.
- Clarke, K. G., 2013. “*Bioprocess engineering: An introductory engineering and life science approach.*” Woodhead Publishing Limited, 244 p, UK and USA.
- Cuatrecasas, P., 1970. “Protein purification by affinity chromatography: Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads.” *The Journal Biological Chemistry*, 245 (12), 3059-3065.
- Cuesta, S. M., Rahman, S. A., Furnham, N. and Thornton, J. M., 2015. “The classification and evolution of enzyme function.” *Biophysical Journal*, 109, 1-5.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. and Ekinçi, D., 2007. “Morphine inhibits erythrocyte carbonic anhydrase in vitro and in vivo.” *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2257-2261.
- Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. and Ekinçi, D., 2008. “The effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: in vivo and in vitro studies.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(2), 266-270.

- Davis, R. A., Vullo, D., Maresca, A., Supuran, C. T. and Poulsen, S. A., 2013. "Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1539-1543.
- Del Prete, S., Vullo, D., Osman, S. M., AlOthman, Z., Supuran, C. T. and Capasso, C., 2017b. "Sulfonamide inhibition profiles of the β -carbonic anhydrase from the pathogenic bacterium *Francisella tularensis* responsible of the febrile illness tularemia." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25, 3555-3561.
- Del Prete, S., Vullo, D., Zoccola, D., Tambutté, S., Capasso, C. and Supuran, C. T., 2017a. "Kinetic properties and affinities for sulfonamide inhibitors of an α -carbonic anhydrase (CruCA4) involved in coral biomineralization in the Mediterranean red coral *Corallium rubrum*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(13), 3525-3530.
- Demir, N., Demir, Y. and Çoskun, F., 2001. "Purification and characterization of carbonic anhydrase from human erythrocyte plasma membrane." *Turkish Journal of Medical Sciences*, 31, 477-482.
- De Ruiter, J., 2005. "Principles of drug action 1, carboxylic acid structure and chemistry: Part 2." 1-10.
- De Simone, G. and Supuran, C. T., 2012. "(In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors." *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 117-129.
- Deutsch, H. F., 1987. "Carbonic anhydrases." *International Journal of Biochemistry*, 19(2), 101-113.
- Durdagi, S., Şentürk, M., Ekinci, D., Balaydın, H. T., Göksu, S., Küfrevioğlu, Ö. İ., Innocenti, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2011. "Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII evidence a new binding mode within the enzyme active site." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 1381-1389.
- Eldehna, W. M., Al-Ansary, G. H., Bua, S., Nocentini, A., Gratteri, P., Altoukhy, A., Ghabbour, H., Ahmed, H. Y. and Supuran, C. T., 2017. "Novel indolin-2-one-based sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, *in vitro* biological evaluation against carbonic anhydrases isoforms I, II, IV and VII and molecular docking studies." *European Journal of Medicinal Chemistry*, 127, 521-530.
- Engberg, P., Millqvist, E., Pohl, G. and Lindskog, S., 1985. "Purification and some properties of carbonic anhydrase from bovine skeletal muscle." *Archives of Biochemistry Biophysics*, 241(2), 628-38.
- Engelking, L. R., 2015. "Chapter 5-properties of enzymes." *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*, 26-31.
- Ergen, A., 2015. "Enzimler. Biyokimya." Ulukaya, E. Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, 53-68.
- Esbaugh, A. J. and Tufts, B. L., 2006. "The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates." *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 154, 185-198.

- Ferraroni, M., Cornelio, B., Sapi, J., Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2017. "Sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors: Zinc coordination and tail effects influence inhibitory efficacy and selectivity for different isoforms." *Inorganica Chimica Acta*, In Press.
- Ferry, J. G., 2010. "The γ class of carbonic anhydrases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 374-381.
- Ghiasi, M., Hemati, S. and Zahedi, M., 2017. "Activation modelling of b- and c-class of carbonic anhydrase with amines and amino acids: Proton transfer process within the active site from thermodynamic point of view." *Computational and Theoretical Chemistry*, 1109, 42-57.
- Ghorab, M. M., Alsaid, M. S., Ceruso, M., Nissan, Y. M. and Supuran, C. T., 2014. "Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, molecular docking, cytotoxic and inhibition of the human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX, XII with novel benzenesulfonamides incorporating pyrrole, pyrrolopyrimidine and fused pyrrolopyrimidine moieties." *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 22, 3684-3695.
- Ghorab, M. M., Ragab, F. A., Heiba, H. I., El-Gazzar, M. G. and Zahran, S. S., 2015. "Synthesis, anticancer and radiosensitizing evaluation of some novel sulfonamide derivatives." *European Journal of Medicinal Chemistry*, 92, 682-692.
- Gocer, H., Akıncioğlu, A., Göksu, S. and Gülçin, İ., 2017. "Carbonic anhydrase inhibitory properties of phenolic sulfonamides derived from dopamine related compounds." *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 398-402.
- Gokcen, T., Gulcin, I., Ozturk, T. and Goren, A. C., 2016. "A class of sulfonamides as carbonic anhydrase I and II inhibitors." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(S2), 180-188.
- Gong, W., Ran, Z., Ye, F. and Zhao, G., 2017. "Lignin from bamboo shoot shells as an activator and novel immobilizing support for α -amylase." *Food Chemistry*, 228, 455-462.
- Guler, O. O., Capasso, C. and Supuran, C. T., 2016. "A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(5), 689-694.
- Gündüzalp, A. B., Parlakgümüş, G., Uzun, D., Özmen, Ü. Ö., Özbek, N., Sarı, M. and Tunç, T., 2016. "Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, characterization and inhibition activities of furan sulfonylhydrazones against carbonic anhydrase I (hCA I)." *Journal of Molecular Structure*, 1105, 332-340.
- Haertle, T., 2016. "Enzymes: Analysis and food processing. *Encyclopedia of food and healthy*." Caballero, B., Finglas, P. M. and Toldra, F. Elsevier, Amsterdam, 2, 524-538.
- Hakansson, K., Carlsson, M. and Svensson, L. A., 1992. "Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes." *Journal of Molecular Biology*, 227(4), 1192-1204.

- Hassan, Md. I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F. and Sly, W. S., 2013. "Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 1570-1582.
- Henry, R. P. and Swenson, E. R., 2000. "The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs." *Respiration Physiology*, 121(1), 1-12.
- Heravi, Y. E., Bua, S., Nocentini, A., Del Prete, S., Saboury, A. A., Sereshti, H., Capasso, C., Gratteri, P. and Supuran, C. T., 2017. "Inhibition of malassezia globosa carbonic anhydrase with phenols." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(9), 2577-2582.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G. N., Waheed, A., Halmi, P., Hänninen, M., Hämäläinen, J. M., Vihinen, M., Sly, W.S. and Parkkila, S., 2005. "Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase." *Biochemical Journal*, 392 (1), 83-92.
- Hollò, G., 2015. "54-Carbonic anhydrase inhibitors." *Glaucoma (Second Edition)*, 1, 559-565.
- Hunaiti, A. A. and Soud, M., 2000. "Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood." *The Science of the Total Environment*, 248 (1), 45-50.
- Innocenti, A., Sarıkaya, S. B. Ö., Gülçin, İ. and Supuran, C. T., 2010. "Carbonic anhydrase inhibitors, Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(6), 2159-2164.
- Ivanova, J., Carta, F., Vullo, D., Leitans, J., Kazaks, A., Tars, K., Žalubovskis, R. and Supuran, C. T., 2017. "N-Substituted and ring opened saccharin derivatives selectively inhibit transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(13), 3583-3589.
- Iqbal, S., Saleem, M., Azim, M. K., Taha, M., Salar, U., Khan, K. M., Perveen, S. and Choudhary, M. I., 2017. "Carbohydrazones as new class of carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, kinetics, and ligand docking studies." *Bioorganic Chemistry*, 72, 89-101.
- Johansson, M. I. and Forsman, C., 1993. "Kinetic studies of pea carbonic anhydrase." *European Journal of Biochemistry*, 218, 439-446.
- Kasımoğulları, R., Bülbül, M., Günhan, H. and Güteryüz, H., 2009. "Effects of new 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide derivatives on human carbonic anhydrase isozymes." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3295-3301.
- Kass, M. A., 1989. "Topical carbonic anhydrase inhibitors." *American Journal of Ophthalmology*, 107(3), 280-282.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2009. "*Biyokimya*." Aktif Yayınevi, 637 s, Erzurum.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2008. "*Biyokimya*." Aktif Yayınevi, 118 s, İstanbul.

- Keller, M. A., Piedrafita, G. and Ralser, M., 2015. "The widespread role of non-enzymatic reactions in cellular metabolism." *Current Opinion in Biotechnology*, 34, 153–161.
- Khameneh, H. P., Bolouri, T. G., Nemati, F., Rezvani, F., Attar, F., Saboury, A. A. and Falahati, M., 2017. "A Spectroscopic study on the absorption of carbonic anhydrase onto the nanoporous silica nanoparticle." *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 739-745.
- Kocyigit, U. M., Budak, Y., Gürdere, M. B., Tekin, Ş., Köprülü, T. K., Ertürk, F., Özcan, K., Gülçin, İ. and Ceylan, M., 2017. "Synthesis, characterization, anticancer, antimicrobial and carbonic anhydrase inhibition profiles of novel (3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-((E)-3-(3-aryl)acryloyl) phenyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-methanoisindole-1,3(2H)-dione derivatives." *Bioorganic Chemistry*, 70, 118-125.
- Kohn, J. and Wilchek, M., 1978. "A colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide." *Biochemical Biophysical Research Communications*, 84(1), 7-14.
- Koutnik, P., Shcherbakova, E. G., Gozem, S., Caglayan, M. G., Minami, T. and Anzenbacher, P., 2017. "Fluorescence-based assay for carbonic anhydrase inhibitors." *Chemistry*, 2(2), 271-282.
- Krasavin, M., Korsakov, M., Zvonaryova, Z., Semyonychev, E., Tuccinardi, T., Kalinin, S., Tanç, M. and Supuran, C. T., 2017. "Human carbonic anhydrase inhibitory profile of mono- and bisulfonamides synthesized via a direct sulfochlorination of 3-and 4- (hetero) arylisoxazol-5-amine scaffolds." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6), 1914-1925.
- Krungkrai, S. R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. and Krungkrai, J., 2001. "Characterization of carbonic anhydrase in plasmodium falciparum." *International Journal of Parasitology*, 31(7), 661-668.
- Kurbanoglu, S., Ozkan, S. A. and Merkoçi, A., 2017. "Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications." *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 886-898.
- Laemmli, U. K., 1970. "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227, 680-685.
- Lindskog, S., 1997. "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 1-20.
- Maren, T. H., 1967. "Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology and inhibition." *Physiological Reviews*, 47(4), 595-781.
- Maren, T. H., 1987. "Carbonic anhydrase: General perspective and advances in glaucoma research." *Drug Development Research*, 10(4), 255-276.
- Maślanka, T., 2015. "A review of the pharmacology of carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of glaucoma in dogs and cats." *The Veterinary Journal*, 203(3), 278-284.
- McDonald, A. G. and Tipton, K. F., 2014. "Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties." *The Febs Journal*, 281, 583-592.

- Mert, S., Alim, Z., İşgör, M. M., Anıl, B., Kasımoğulları, B. and Beydemir, Ş., 2015. "Novel pyrazole-3,4-dicarboxamides bearing biologically active sulfonamide moiety as potential carbonic anhydrase inhibitors." *Arabian Journal of Chemistry*, In press.
- Mogk, L. G. and Cyrlin, M. N., 1988. "Blood dyscrasias and carbonic anhydrase inhibitors." *Ophthalmology*, 95(6), 768-771.
- Mohamed, M. A., Abdel-Aziz, A. A. M., Sakr, H. M., El-Azab, A. S., Bua, S. and Supuran, C. T., 2017. "Synthesis and human/bacterial carbonic anhydrase inhibition with a series of sulfonamides incorporating phthalimido moieties." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(8), 2524-2529.
- Mojzych, M., Ceruso, M., Bielawska, A., Bielawski, K., Fornal, E. and Supuran, C. T., 2015. "New pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazine sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(13), 3674–3680.
- Nannipieri, P., Kandeler, E. and Ruggiero, P., 2002. "Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. *Enzymes in the environment: Ecology, activity and applications.*" Burns, R. G. and Dick, R. P. Marcel Dekker Incorporate, New York, 1-33.
- Nocentini, A., Vullo, D., Bartolucci, G. and Supuran, C. T., 2016. "N-Nitrosulfonamides: A new chemotype for carbonic anhydrase inhibition." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(16), 3612-3617.
- Özdemir, Ü. Ö., Altuntaş, A., Gündüzalp, A. B., Arslan, F. and Hamurcu, F., 2014. "New aromatic/heteroaromatic propanesulfonylhydrazone compounds: Synthesis, physical properties and inhibition studies against carbonic anhydrase II (CAII) enzyme." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128, 452-460.
- Perales, D. T., Navarro, J. M. and Polaina, J., 2016. "Enzymes: Function and characteristics. *Encyclopedia of food and health.*" Caballero, B., Finglas, P. M. and Toldra, F. Elsevier, Amsterdam, 2, 532-538.
- Pfeiffer, N., 1997. "Dorzolamide: Development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor." *Survey of Ophthalmology*, 42(2), 137-151.
- Piazzetta, P., Marino, T., Russo, N. and Salahub, D. R., 2017. "The role of metal substitution in the promiscuity of natural and artificial carbonic anhydrases." *Coordination Chemistry Reviews*, 345, 73-85.
- Purich, D. L., 2010. "Enzyme kinetics: Catalysis & Control." Elsevier, 865 p, Florida.
- Register, A. M., Koester, M. K. and Noltmann, E. A., 1978. "Discovery of carbonic anhydrase in rabbit skeletal muscle and evidence for its identity with "Basic muscle protein" ". *The Journal of Biological Chemistry*, 253(12), 4143-4152.
- Renzi, G., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2000. "Carbonic anhydrase inhibitors: Topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10 (7), 673-676.

- Rıcklı, E. E., Ghazanfar, S. A. S., Gibbons, B. H. and Edsall, J. T., 1964. "Carbonic anhydrases from human erythrocytes: Preparation and properties of two enzymes." *The Journal of Biological Chemistry*, 239(4), 1065-1078.
- Segel, H. I., 1968. "*Biochemical calculations.*" John Wiley and Sons Incorporated, 403 p, New York.
- Segel, H. I., 1975. "*Enzyme kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady – state enzyme systems.*" Department of Biochemistry and Biophysics University of California Davis, 99 p, California.
- Sethi, K. K., Verma, S. M., Tanç, M. and Supuran, C. T., 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), 5168–5174.
- Sławiński, J., Pogorzelska, A., Żołnowska, B., Brożewicz, K., Vullo, D. and Supuran, C. T., 2014. "Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of a novel series of 5-substituted 2,4-dichlorobenzenesulfonamides and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and the transmembrane tumor-associated isozymes IX and XII." *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82, 47-55.
- Smirnovienė, J., Smirnovas, V. and Matulis, D., 2017. "Picomolar inhibitors of carbonic anhydrase: of inhibition and binding assays." *Analytical Biochemistry*, 522, 61-72.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001. "Carbonic anhydrase inhibitors." *Current Medicinal Chemistry*, 1(1), 61-97.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2000. "Carbonic anhydrase inhibitors - Part 94. 1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents?" *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(9), 867-874.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2007. "Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(3), 4336–4350.
- Supuran, C. T., 2010. "Carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3467–3474.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. and Casini, A., 2003. "Carbonic anhydrase inhibitors." *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146-189.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. and Conway, J., 2004. "*Carbonic anhydrase: Its inhibitors and activators.*" CRC Press, 363 p, London.
- Supuran, C. T., 2016. "Structure and function of carbonic anhydrases." *Biochemical Journal*, 473(14), 2023-2032.
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Daşdan A., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Supuran, C. T., 2009. "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3207–3211.

- Topal, F., Gulcin, I., Dastan, A. and Guney, M., 2017. "Novel eugenol derivatives: Potent acetylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitors." *International Journal of Biological Macromolecules*, 94(B), 845-851.
- Türkoğlu, E. A., Şentürk, M., Supuran, C. T. and Ekinci, D., 2017. "Carbonic anhydrase inhibitory properties of some uracil derivatives." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 74-77.
- Vernier, W., Chong, W., Rewolinski, D., Greasley, S., Pauly, T., Shaw, M., Dinh, D., Ferre, R. A., Nukui, S., Ornelas, M. and Reyner, E., 2010. "Thioether benzenesulfonamide inhibitors of carbonic anhydrases II and IV: Structure-based drug design, synthesis, and biological evaluation." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(9), 3307-3319.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. and Edsall, J. T., 1967. "Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C." *The Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221-4229.
- Yaseen, R., Ekinci, D., Senturk, M., Hameed, A. D., Ovais, S., Rathore, P., Samim, M., Javed, K. and Supuran, C. T., 2016. "Pyridazinone substituted benzenesulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(4), 1337-1341.
- Yıldırım, A., Atmaca, U., Keskin, A., Topal, M., Çelik, M., Gülçin, İ. and Supuran, C. T., 2015. "N-Acylsulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrase isoenzymes I and II." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(10), 2598-2605.
- Xiao, Z., Duan, R., Cui, W., Zhang, Y., Zhang, S., Chen, F., Zhang, Y., Liu, J., Zhang, D., Meng, Y., Wang, L. and Wang, H., 2011. "Synthesis and evaluation of new carbonic anhydrase inhibitors." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(10), 3221-3228.
- Wieczorek, J. F. and Jelonek, M. A., 2017. "The multifunctional face of plant carbonic anhydrase." *Plant Physiology and Biochemistry*, 112, 362-368.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Asiye EFE
Doğum Yeri	Ağrı
Tarihi	12.09.1988
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Cumhuriyet Üniversitesi / Çevre Mühendisliği (2013)
Yüksek Lisans Öğrenimi	Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı / Biyokimya Bilim Dalı (2015-Devam) Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı (2013-Devam)
Bilimsel Faaliyetler	A. Uluslararası Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler 1. Efe, A., Turkoglu, E.A., Arslan, T., Senturk, M., Inhibition Effect of 4-Methylbenzensulfonamide Derivates on Human Carbonic Anhydrase Isoenzymes (hCA I-II). International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development 2017 Bildiri Kitabı, 5-7 Ekim, 2017, Erzurum. 2. Arslan, T., Dizdaroglu, Y., Albay, C., Turkoglu, E.A., Efe, A., Senturk, M., Inhibitory Properties of Chalcone and Pyrazole Derivatives on Human Carbonic Anhydrases. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development 2017 Bildiri Kitabı, 5-7 Ekim, 2017, Erzurum. 3. Bayram, N., Celik, H., Turkoglu, E.A., Efe, A., Senturk, M., Inhibitory Properties of Some Analgesic Drugs on Acetylcholinesterase. III. İlaç ve Eczacılık Kongresi Bildiri Kitabı, 26-29 Nisan, 2017, Istanbul.

	<p>B. Katılım Belgeleri</p> <p>1. Efe, A., Kriyojeller ve Yaşam Bilimlerindeki Uygulamaları (Davetli konuşmacı). I. Eczacılık Günleri, Eczacılık Fakültesi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, 2016, Ağrı.</p> <p>2. Efe, A., Eczacılıkta Gelişen Disiplinler (Organizasyon kurulu). I. Eczacılık Günleri, Eczacılık Fakültesi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, 2016, Ağrı.</p> <p>3. Efe, A., International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development. Atatürk Üniversitesi, 2017, Erzurum.</p> <p>C. Diğer Yayınlar</p> <p>1. Efe, A., Türkoğlu, E.A., Biyosensörler. 2017, Sayı 6, Bio Medya Dergisi.</p>
İş Deneyimi	
Stajlar	Sivas Belediyesi (2012) Samsun Belediyesi (2011) Ağrı Çevre İl Müdürlüğü (2011)
İletişim	
E-posta Adresi	asiye_efe.004@hotmail.com asiyefe04@gmail.com