



2-AMİNO-6-METOKSİ BENZOTİYAZOL İLE
DİPİKOLİNİK ASİDİN TÜREVLERİNİN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE
İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Melike ASLAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ocak-2014

2-AMİNO-6-METOKSİ BENZOTİYAZOL İLE DİPİKOLİNİK ASİDİN TÜREVLERİNİN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Melike ASLAN

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Ocak-2014

KABUL VE ONAY SAYFASI

Melike ASLAN'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "2-Amino-6-Metoksi Benzotiyazol ile Dipikolinik asidin türevlerinin karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

06 / 01 /2014

Üye Doç. Dr. Metin BÜLBÜL



Üye Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA



Üye Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK



Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... /2014 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**2-AMİNO-6-METOKSİ BENZOTİYAZOL İLE DİPİKOLİNİK ASİDİN
TÜREVLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE İNHİBİSYON
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Melike ASLAN

Kimya Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2014

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Karbonik anhidraz (E.C. 4. 2. 1. 1), aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. Karbondioksitin HCO_3^- ve H^+ iyonlarına dönüşümlü hidratasyonu reaksiyonunu katalizler.

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni karbonik anhidraz (CA) inhibitörlerinin, karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla önce insan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri (CA-I, CA-II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırıldı. Elektroforez ve spesifik aktivite tayini ile safsızlıkları ispatlandı.

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin (**1-6**) insan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bileşiklerin inhibisyon etkisini belirlemek için karbonik anhidraz enziminin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü. İnhibisyon etkisi gösteren bileşikler için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri belirlendi.

Sentezlenen yeni bileşiklerin, CA-I ve CA-II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği, fakat esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Esteraz IC_{50} değerleri CA-I için 0,800 – 0,193 mM arasında, CA-II için ise 0,754 – 0,174 mM arasında bulundu.

Anahtar Kelimeler: IC_{50} Değerleri, İnhibisyon, Karbonik anhidraz, Benzotiyazol, Dipikolinik asit.

THE INHIBITION STUDIES OF 2-AMINO-6-METHOXY BENZOTHAZOLE AND DIPICOLINIC ACID DERIVATIVES ON CARBONIC ANHYDRASE

Melike ASLAN

Chemistry Department, MSc. Thesis, 2014

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Carbonic anhydrase (E.C. 4.2.1.1) is a metalloenzyme and contains zinc(II) ion in its active side. It catalyses the reversible reaction of CO_2 to HCO_3^- and H^+ ions.

In this study, the inhibition effects of new carbonic anhydrase (CA) inhibitors's, which candidates for treatment of glaucoma, or carbonic anhydrase enzyme have been investigated.

Firstly, erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II) from human erythrocyts were separately purified by affinity chromatography. Electrophoresis and specific activity was proven by the determination of impurities.

Later, the inhibition effects of newly synthesized compounds (**1-6**) on CA-I and CA-II isoenzymes were determined. To determine inhibitory effects of the compounds, the hydratase and esterase activities of carbonic anhydrase enzyme were measured. %Activity vs. [I] graphics were drawn and the IC_{50} values were calculated for potential inhibitory compounds.

According to *in vitro* studies, any inhibition effects of **1-6** compounds were not observed on hydratase activity of CA-I and CA-II isoenzymes. These new compounds inhibited the esterase activities of CA-I and CA-II isoenzymes. The IC_{50} values of compounds for esterase activity are 0,800 – 0,193 mM for CA-I and 0,754 – 0,174 mM for CA-II, respectively.

Keywords: IC_{50} Values, Inhibition, Carbonic Anhydrase, Benzothiazole, Dipicolinic acid.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı, değerli Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen, danışman hocam Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü bilgi desteğini ve yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Ekrem TUNCA'ya, bu çalışma kapsamında kullanılan inhibitör bileşiklerin sentezini ve karakterizasyonunu gerçekleştiren Doç. Dr. Cengiz YENİKAYA ve Araş. Gör. Dr. Halil İLKİMEN'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarda yardımlarını gördüğüm çalışma arkadaşlarım Damla DEMİR, Mehmet Said YILMAZ ve Müşerref ERTAŞ'a;

Çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve hayatım boyunca maddi ve manevi yardımını esirgemeyen Babam Mehmet ASLAN; Annem Hacer ASLAN ve ablam Merve ASLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ	8
2.1. Enzim Özellikleri ve Fizyolojik Önemi	8
2.1.1. α - Karbonik anhidrazlar (α -CA)	9
2.1.2. β - Karbonik anhidraz (β -CA)	9
2.1.3. γ -Karbonik anhidrazlar (γ -CA)	10
2.2. CA Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları	10
2.3. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri	11
2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	12
2.5. Karbonik Anhidrazın Katalitik Mekanizması	13
2.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi	14
2.7. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	15
2.8. Glokom Hastalığı	16
3. PROTON TRANSFER TUZLARI	19
4. MATERYAL VE YÖNTEM	20
4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
4.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar	20
4.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı	23
4.4 Yöntemler	24
4.4.1 Protein tayini	24
4.4.1.1 Kalitatif protein tayini	24
4.4.1.2 Bradford yöntemi ile ilgili protein tayini	24
4.4.2 Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	25
4.4.2.1 CO ₂ -hidrataz aktivitesi tayini	25

İÇİNDEKİLER (devam)

4.4.2.2 Esteraz aktivitesi tayini.....	25
4.4.3 Afinite jelinin hazırlanması.....	26
4.4.3.1 Sepharose-4B matrisi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı	26
4.4.3.2 Sepharose-4B' nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması.....	27
4.4.3.3 Sülfanilamid kenetlendirilmesi	27
4.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması.....	29
4.4.4.1 Hemolizat eldesi.....	29
4.4.4.2 Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu.....	29
4.4.4.3 Diyaliz işlemi	29
4.4.5 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelenmesi.....	30
4.4.5.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	30
4.4.5.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	30
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
5.1 CA-I ve CA-II izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılması sonuçları.....	32
5.2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	33
5.3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimleri (CA-I ve CA-II) Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	34
5.3.1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	34
5.3.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	34
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	47
KAYNAKLAR DİZİNİ	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enzimle substrat arasındaki ilişki.....	1
1.2. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.....	4
1.3. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.....	4
1.4. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.....	5
1.5. Saflaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu.....	6
2.1. CA-II enziminin 3 boyutlu yapısı.....	9
2.2. Karbonik anhidraz enziminin ortam pH'ına göre katalizlediği dönüşümler.....	12
2.3. Zn ²⁺ ile koordinasyon halindeki su molekülünün hidroksit grubuyla Thr199 ve Glu106 rezidüleri arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.....	13
2.4. CA enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizmasının şematik gösterimi.....	14
2.5. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri.....	17
2.6. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri.....	17
3.1. Brønsted-Lowry asit-bazın nötralizasyon tepkimesi.....	19
4.1. <i>In vitro</i> inhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşiklerin formülleri.....	22
4.2. Afinite jelinin hazırlanması.....	28
5.1. Bradford metoduyla protein tayini için kullanılan standart grafik.....	33
5.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE analizi.....	34
5.3. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.....	35
5.4. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.....	36
5.5. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.....	37
5.6. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.....	38
5.7. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (3) bileşiğinin etkisi.....	39
5.8. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (3) bileşiğinin etkisi.....	40
5.9. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (4) bileşiğinin etkisi.....	41
5.10. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (4) bileşiğinin etkisi.....	42
5.11. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (5) bileşiğinin etkisi.....	43
5.12. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (5) bileşiğinin etkisi.....	44
5.13. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (6) bileşiğinin etkisi.....	45
5.14. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (6) bileşiğinin etkisi.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı ve işlevi.....	11
2.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri.....	13
5.1. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (1) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	35
5.2. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (1) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	36
5.3. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (2) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	37
5.4. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (2) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	38
5.5. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (3) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	39
5.6. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (3) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	40
5.7. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (4) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	41
5.8. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (4) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	42
5.9. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (5) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	43
5.10. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (5) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	44
5.11. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (6) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	45
5.12. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (6) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki <i>in vitro</i> inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....	46
6.1. <i>In vitro</i> inhibisyon çalışmalarından elde edilen esteraz IC ₅₀ ve K _i değerleri.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar

Açıklama**Kısaltmalar**

CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Karbonik anhidraz ilişkili protein
EC	Enzim kod numarası
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EU	Enzim ünitesi
hCA I	İnsan eritrosit karbonik anhidraz enzimi I
hCA II	İnsan eritrosit karbonik anhidraz enzimi II
I	İnhibitör
IOP	Göz içi basıncı (Intraocular Pressure)
S	Substrat
SDS-PAGE	Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
TRIS	Trishidroksimetilaminometan

Açıklama

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve yüksek bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler.

Canlıları oluşturan moleküller, yani, biyomoleküller kinetik yönden oldukça kararlı olup, kendiliğinden kolayca reaksiyon vermezler. Bir hücredeki tüm kimyasal olaylar enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimler genellikle tek tip bir kimyasal reaksiyonu veya aynı özellikte reaksiyonları katalizler (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^{15} ile 10^{20} kat daha hızlıdır. Her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir (Champe ve Harvey, 1997).

Enzimlerle kataliz tepkimesine katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Enzimler substratlara göre daha hacimlidirler ve dolayısıyla kataliz olayında enzimin sınırlı bir alanının etkin olduğu düşünülmüş ve bu alana da aktif bölge denilmiştir. Aktif bölgeler çoğu kez, enzimdeki yarıklara veya multienzimlerde alt birimler arasındaki ara kesit yüzeylerine yerleşmiştir (Dikmen ve Özgünen, 2004).

Aktif bölge; substrata komplementer olan üç boyutlu yapıda aminoasit yan zincirleri içerir. Aktif bölge substratı bağlayarak bir enzim – substrat (ES) kompleksi meydana getirir. ES sonradan parçalanarak enzim ve ürüne dönüşür (Champe ve Harvey, 1997).



Şekil 1.1. Enzimle substrat arasındaki ilişki.

Enzimler substrat üzerinde etki gösterebilmesi için protein yapıda olmayan bir koenzime (kofaktör) gereksinimi vardır. Koenzim, Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da organik, metalorganik kompleks bir molekül olabilir. Enzimler sıcaklıkla denatüre olurken, kofaktörler ısıya dayanıklıdır. Katalitik olarak aktif olan enzim kofaktör kompleksi holoenzim olarak adlandırılır. Holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılır. Holoenzimin kofaktör kısmının, bazı enzimler için Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} gibi bir veya daha

fazla inorganik iyon; bazı enzimler için ise organik veya metaloorganik kompleks bir moleküldür. Bazı enzim-kofaktör bağlanmalarında koenzim enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent bağlı olup enzim proteininden ayrılmazlar. Bunlara prostetik grup denir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları asit-baz katalizi, kovalent kataliz veya enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırır (İnan ve Gül, 2001).

Enzimlerin büyük bir kısmı protein yapısında olduğundan şartların değişmesine karşı oldukça hassastırlar. Bu yüzden bir çözeltideki enzim varlığı, enzimin etki ettiği substrat molekülü veya reaksiyon sonucu meydana gelen ürün veya enzimatik reaksiyona aracılık eden diğer parametreler üzerinden tespit edilmektedir (Gözükara, 1997).

Bir çözelti içindeki enzim aktivitesi “enzim ünitesi” (birimi) cinsinden verilir. 25°C’de ve optimal şartlarda 1 mikromol (10^{-6} mol) substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına “1 enzim ünitesi” (EU veya U şeklinde gösterilir) denilir. Ancak uluslararası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi mol olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi katal’dır. 1 katal enzim, belirli şartlar altında saniyede 1 mol madde dönüşümünü sebep olur.

Enzim aktiviteleri, bir başka deyimle, enzimlerin reaksiyon hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler;

- Substrat konsantrasyonu
- Enzim konsantrasyonu
- İnhibitör veya aktivatör konsantrasyonu
- Kofaktör konsantrasyonu (varsa)
- pH
- Sıcaklık
- İyonik şiddet

Her enzim için aktivitelerin maksimum olduğu pH değerleri vardır ve bu değere optimum pH denir. Bu değerlerin üzerinde ve altında aktivite düşer. Kimyasal reaksiyonların hızı sıcaklıkla artar. Enzimli reaksiyonlar bu genel kuraldan farklı bir davranış göstermez. Artan sıcaklıkla enzimatik reaksiyon hızı artar, fakat 50-60°C üzerine çıkıldığında aktivitede düşüş gözlenir. Bu durum yüksek sıcaklıkla enzim yapısında meydana gelen denatürasyondan kaynaklanır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısıyla ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı yüksek olan enzimlerden biri de karbonik anhidraz enzimidir ($600.000s^{-1}$) (Harper, 1975).

Enzimin inhibisyonu enzimler üzerinde çalışılan önemli konulardan biridir. Enzimlerin aktivitelerini bazı bileşikler azaltır ve hatta yok ederler, bu olaya inhibisyon bu bileşiklerde inhibitör denilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzim inhibisyonu, dönüşümsüz (irreversible) inhibisyon ve dönüşümlü (reversible) inhibisyon olmak üzere iki grupta incelenir.

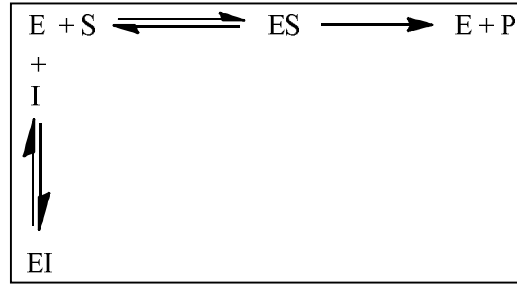
Dönüşümsüz inhibisyonda inhibitör enzime ya kovalent olarak ya da zor ayrışan bir kompleks oluşturacak şekilde bağlanır. Bu yüzden dönüşümsüz inhibitörlere “enzim inaktivatörleri” de denir (İnan ve Gül, 2001). Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_m ise değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyonda ise enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon dört grupta incelenir;

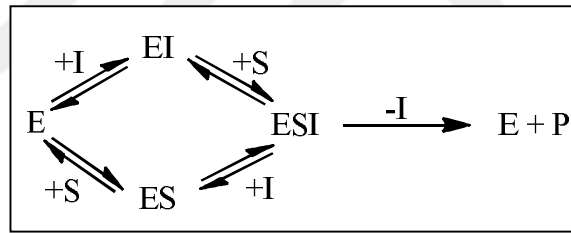
- 1)Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- 2)Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- 3)Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)
- 4)Lineer karışık tip inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör; yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Yarışmalı inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş K_m 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Yani, yarışmalı bir inhibitör varlığında $1/2V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekir (Champe ve Harvey, 1997; Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Şekil 1.2. Yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

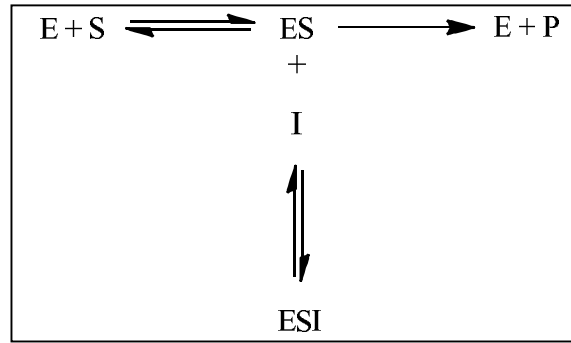
Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda etkiyebilir. Bu durum bağlanmanın enzimin farklı bölgesine olduğunu gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini azaltarak gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma yoktur. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri düşerken, K_m değeri sabit kalır. Substrat ve inhibitör aynı bölgelere bağlanmadığından, enzimin iki farklı inaktif kompleksi oluşur: EI ve ESI (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Şekil 1.3. Yarışmasız inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

Diğer dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitör serbest enzime bağlanamaz, ES kompleksine bağlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır (Telefoncu, 1986; Gilbert, 1992).

Yarı yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Buna göre inhibitör varlığında ortamda sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_m değeri azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} değeri de azalır. (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Şekil 1.4. Yarı yarışmalı inhibisyonun reaksiyon üzerinde gösterimi.

Lineer karışık tip inhibisyon türü yarışmasız inhibisyonun özel bir tipidir. Bu inhibisyon substratın EI kompleksine bağlanabildiği zaman gerçekleşir. Her iki durumda da inaktif ESI kompleksi oluşur (Arslan, 2003).

Enzim inhibisyonu gibi konuları ele alan çalışmalarda enzim saflığı çok önemlidir. Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok ham bir hücre özütünden ayırmaktır (Dikmen ve Özgüven, 2004). Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. Çok sayıda enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Proteinlerden globüler proteinler suda ve sulu tuz çözeltilerinde çözünürler bu özelliklerinden yararlanarak saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

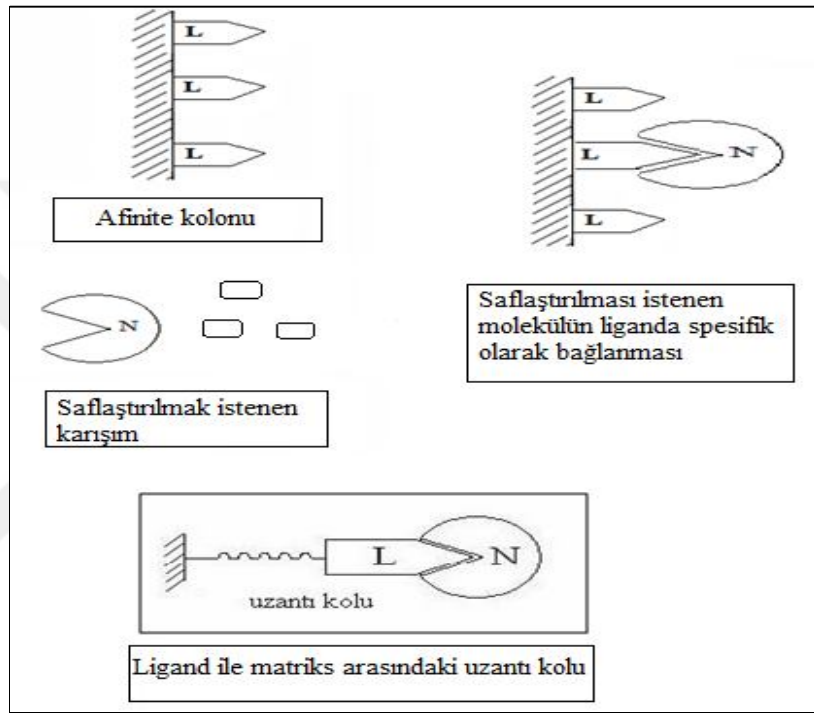
Globüler proteinlerin saflaştırma işleminde yararlanılan özellikleri ise;

- Molekül büyüklüğü
- Çözünürlük farkı esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Elektriksel yük esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Seçimli adsorpsiyon esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması
- Spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılması (Afinite kromatografisi)

Karbonik anhidraz enzimi için, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, en doğru sonucu vereni afinite kromatografisi (spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi) yöntemidir ve bu yöntemle karbonik anhidraz enzimi saflaştırılarak karakterizasyon incelenmesi yapılabilmektedir. Bu yöntemde; ligand, çok spesifik olduğundan enzime kolayca bağlanır. Safsızlıklar ise kolon materyaline tutunamadıklarından kolonun akış yönünde

ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzim kolonda kalır. Kolonda kalan enzim, uygun tamponlarla elue edilir (Dikmen ve Özgüen, 2004).

Afinite kromatografisi aşağıdaki gibi şematize edilebilir. Burada basamak basamak afinite jeli oluşumu, numunenin jele tutunması ve istenilen enzimin saf bir şekilde elüsyonu gösterilmiştir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Saflaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu.

Saflaştırılmak istenen molekülün kolondaki liganda bağlanması, çoğu durumda matriks ile ilgili molekül arasındaki sterik engelden dolayı zorlaşmakta ve kolon verimi düşmektedir. Bu problem, uygun uzantı kolu kullanılarak ortadan kaldırılabilir.

Sonuç olarak, proteinlerin aktive edilmiş matrikslere bağlanmasındaki koşullar; proteinin denatürasyonuna veya inhibisyonuna neden olmamalıdır. Genelde bağlanma protein molekülünün dış yüzeyindeki lizin rezidüleri, ya da başka bir amin grubu ile olur. Bu grup; nükleofilik yani protonlanmamış halde bulunacağı yüksek bir değerde olmalı fakat inaktivasyona neden olacak kadar da yüksek olmamalıdır. Tüm bu özellikler göz önüne alınırsa, bir afinite kolonunun verimli olabilmesi için; matriksin iyi akış özelliklerine sahip, ligandı bağlama ve elüsyon işlemlerine dayanıklı, akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda

olması gerekir. Ligandın ise adsorbe edeceği bileşikle afinitesi olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolonun kapasitesi artar ve istenilen protein yüksek derecede saflaştırılmış olarak elde edilir.

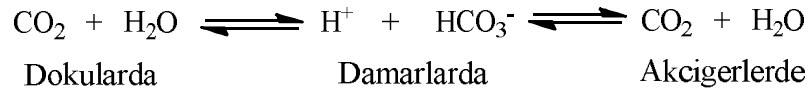
Enzimler için spesifik aktivite hesaplanmalıdır. Spesifik aktivite (özgül aktivite) terimi; 1 mg proteine karşılık gelen enzim ünitesi (E.U./ mg protein) olarak ifade edilir. Bu değer enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim saflaştırılması esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği tespit edilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ

2.1. Enzim Özellikleri ve Fizyolojik Önemi

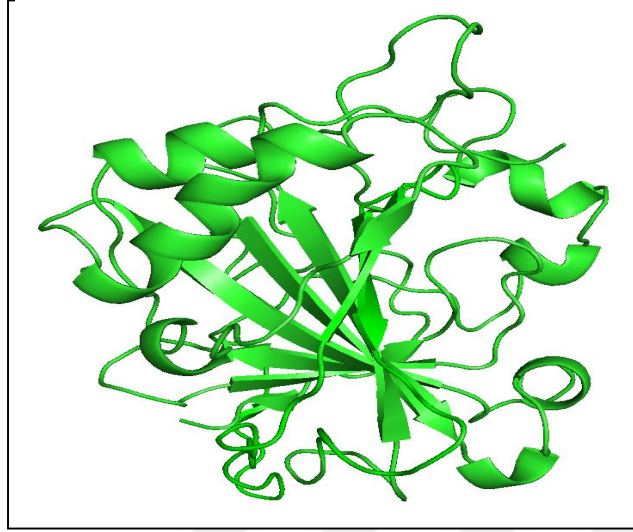
Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidroliyaz, E.C. 4.2.1.1) çinko içeren ve karbondioksitin tersinir hidrasyonunu katalize eden bir enzimdir (Lindskog, 1997). Katalizlenen reaksiyon;



Yapılan çalışmalarda; yukarıdaki hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarının kendiliğinden oluşum hızından çok daha hızlı olduğu görülmüştür (Slyke ve Hawkins, 1930). Bu olaylarda kanda var olan bir enzimin rol alabileceği düşünüldü. Daha sonra karbonik anhidraz enzimi Roughton ve Meldrum tarafından insan eritrositlerinde bulundu (Pocker ve Sarkanen, 1979). Birkaç yıl sonra karbonik anhidraz varlığı başka canlılarda ve dokularda da ortaya çıkarıldı (Sly ve Hu, 1995; Supuran ve ark., 2000; Supuran ve Scozzafava, 2001).

Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri belirlenmiştir. CA, sözü geçen canlı hücrelerin çoğunda; sitoplazmada çözülmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunmaktadır (Pocker ve Sarkanen, 1979).

CA'nın insanlarda içine alan birçok canlı türünde CO₂'in hidrasyonu ve bikarbonatın dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen 16 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir. Karbonik anhidraz canlı organizmaların hemen hemen tamamında genetik olarak kodlanan bir enzimdir (Gilmour, 2010). Karbonik anhidraz enzimi birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bunlar α , β , γ ve δ karbonik anhidrazlardır. α -CA lar omurgalılarda, alglerde ve yeşil bitkilerin sitoplazmalarında bulunur. β -CA lar ağırlıklı olarak, alglerde ve mono ve dikotiledonların kloroplastlarında bulunur. γ -CA lar ağırlıklı olarak bazı bakterilerde bulunur. δ -CA lar ise bazı deniz diatomlarında bulunur (Supuran ve Scozzafava, 2007).



Şekil 2.1. CA-II enziminin 3 boyutlu yapısı (Eriksson ve ark., 1988).

2.1.1.α- Karbonik anhidrazlar (α-CA)

Memelilerde farklı doku dağılımları gösteren α- karbonik anhidraz gen ailesine bağlı 16 farklı CA izoenzimi ve CA bağlantılı protein belirlenmiştir. Hayvanlar için; eritrositlerde (CA-I ve CA- II), kırmızı iskelet kası ve yağ dokularında (CA-III), akciğer ve bazı diğer organlardaki kılcal damarların endotel hücrelerinin plazma yüzeyinde ve insan böbreğinde (CA-IV), karaciğer mitokondrilerinde (CA-V), tükürük bezlerinde (CA-VI) ve sitozolde (CA-VII) karbonik anhidraz enzimleri belirlenmiştir. Genelde tek polipeptid yapıya sahip olan bu izoenzimlerin yanında bitkilerde oligomerik yapıda CA izoenzimlerine rastlanmıştır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır (Supuran ve Scozzafava, 2001). Bu izoenzimlerden CA, I, II, III VII ve XII olmak üzere beş tanesi sitozoliktir. CA-IV, CA-IX, CA-XII ve CA-XIV ise membrana bağlıdır. CA-V mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır ve üç tanesi nonkataliktir (VIII, X, XI) (Pocker ve Sarkanen, 1979; Lehtonen ve ark., 2004; Hewett-Emmett, 2000).

2.1.2. β- Karbonik anhidraz (β-CA)

Canlı organizmalarda β-CA'lar α-CA'lar kadar yaygın değildir. β-CA'lar bazı bakteriler, algler ve yüksek bitkilerin kloroplastlarında bulunur (Supuran et al., 2004).

2.1.3. γ -Karbonik anhidrazlar (γ -CA)

Bazı γ -CA'lar Zn^{2+} iyonu bulundurduğu gibi, bazılarında kobalt bulundurduğu gözlenmiştir. Çinko iyonu bulunduran γ -CA'larda koordinasyon geometrisi üçgen bipiramit iken, kobalt bulunduran γ -CA'da koordinasyon geometrisi oktahedraldir (Iverson et al., 2000).

2.2. CA Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

Genel olarak insandaki CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucunda ortaya çıkarılmıştır. İnsanda yedi farklı izoenzimin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett-Emmett, 2000; Sugrue, 2000).

CA-I ve CA-II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinde bulunur. CA-I izoenziminin turnover sayısı $2.5 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ 'dir. CA-I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi bulunamamıştır (Sly ve Hu, 1995; Supuran ve Scozzafava, 2001).

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın üzerinde en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25°C 'de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. CA-II'nin doku dağılımı geniştir ve pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunur. Osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini gösterir (Lindskog, 1997). Çizelge 2.1'de CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı gösterilmiştir.

CA-II ve CA-IV izoenzimleri, göz lensi, kornea, ve silyer epiltelyumda bulunmaktadır. Glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucunda gözdeki CA-II izoenziminin önemi anlaşılmıştır.

CA-III'ün turnover sayısı 8.10^3 s^{-1} 'dir. Düşük aktiviteli bir enzimdir. Diğer CA izoenzimlerine göre, sülfonamidlerin inhibisyonuna daha az hassastır. Başlıca çözünür protein olduğu ve CO_2 'in doku kılcıl damarlarına difizyonunu kolaylaştırmada rol oynadığı sanılmaktadır. Yavaş kasılan kırmızı kas liflerinde en çok bulunur. Ayrıca, yağ hücrelerinde de bu izoenzimin konsantrasyonu yüksektir. CA-I ve CA-II gibi CA-III'te p-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Öte yandan, CA-III'ün fosfataz aktivitesi gösterildiği bildirilmiştir (Lindskog, 1997).

Çizelge 2.1. CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı ve işlevi.

Doku Dağılımı	İşlevsel Roller
Yemek borusu ve larinks epiteli	Mideden yemek borusu ve daha yukarı bölgelere mide içeriğinin geri akımını engeller
Kemik osteoklast hücreleri	Kemik resorpsiyonu
Göz	Aköz hümörün üretimi
Testis	Sperm hareketliliği
Böbrek	İdrar asidifikasyonu
Beyin	BOS salgısı
Akciğer	Gaz değişimi
Eritrositler	Gaz değişimi
Gastrointestinal epiteli	H ⁺ salgısı, HCO ₃ ⁻ salgısı

CA-IV ve CA-VI izoenzimleri sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. CA-IV membrana bağlıdır. Akciğerdeki ve bazı diğer organlardaki kılcal damarların endotel hücrelerinin plazma yüzeyinde ve ayrıca böbrek membranına bağlı bulunduğu gibi bazı epitelyum hücrelerinin membranına bağlı olarak bulunur (Sly ve Hu, 1995).

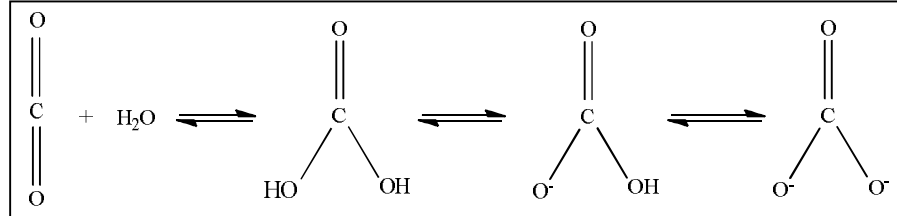
CA-V, belirli dokuların mitokondrilerinin matrikslerinde bulunur. CA-V'in sırasıyla karbamoil fosfat sentetaz-I'e ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağlayarak üroenez ve glikoneogenez de rol oynadığı ileri sürülmektedir. CA-V'in lipogenez olayında da rol oynaması mümkündür (Hazen ve ark., 1996).

CA-VI izoenzimi tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir ve insan tükürüğünden yalıtılmış olup, tükürüğün pH'ının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. CA-VII izoenzimi ise tükürükteki bikarbonatın salgılanmasında rol oynayabilir (Lakkis ve ark., 1996).

2.3. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Karbonik anhidraz çok sayıda olumlu özelliğinin yanınada çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere de sahiptir (Pocker ve Janjik, 1989).

Karbonik anhidraz, CO_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH'ına göre HCO_3^- ve CO_3^{2-} iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO_2 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H_2CO_3 'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Şekil 2.2. Karbonik anhidraz enziminin ortam pH'ına göre katalizlediği dönüşümler.

Karbonik anhidrazın bilinen on beş izoenzimden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzime de bakıldığında sitoplazmada çözülmüş halde buldukları, molekül ağırlıklarının 28000 dalton olup 259 veya 260 aminoasitten tek bir polipeptid zinciri oldukları tespit edilmiştir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{+2} iyonu içermektedir. Zn^{+2} iyonunun kataliz olayındaki fonksiyonu çok önemlidir. Zira uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar aktivitelerini kaybederler (Armstrong ve ark., 1966; Scher ve Dietsch, 1984).

2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

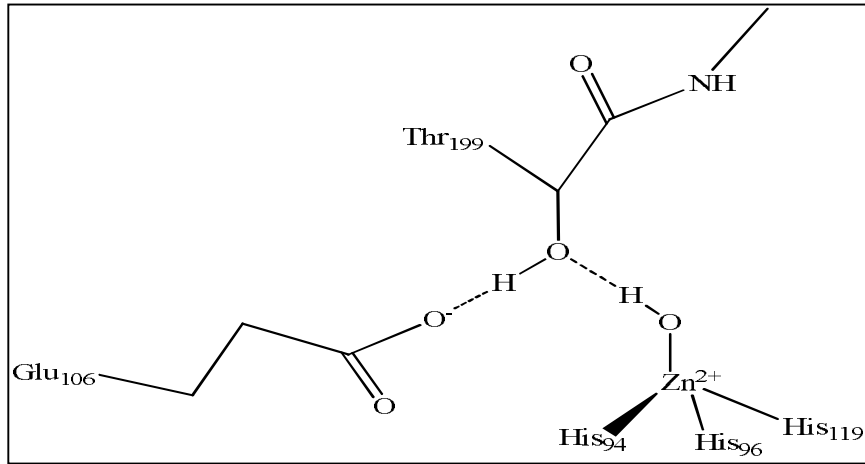
Karbonik anhidraz enzimi HCO_3^- ve H^+ oluşturarak hem CO_2 uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Karboksilik, sülfonik fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Aynı zamanda CA enzimi hidrataz aktivitesi dışında Çizelge 2.2'deki gibi elektrofilik merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizma da fizyolojik bir fonksiyonu olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Kaiser ve Lo, 1969; Jabusch ve Deutsch, 1989).

Çizelge 2.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri (Supuran ve Scozzafava, 2000).

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

2.5. Karbonik Anhidrazın Katalitik Mekanizması

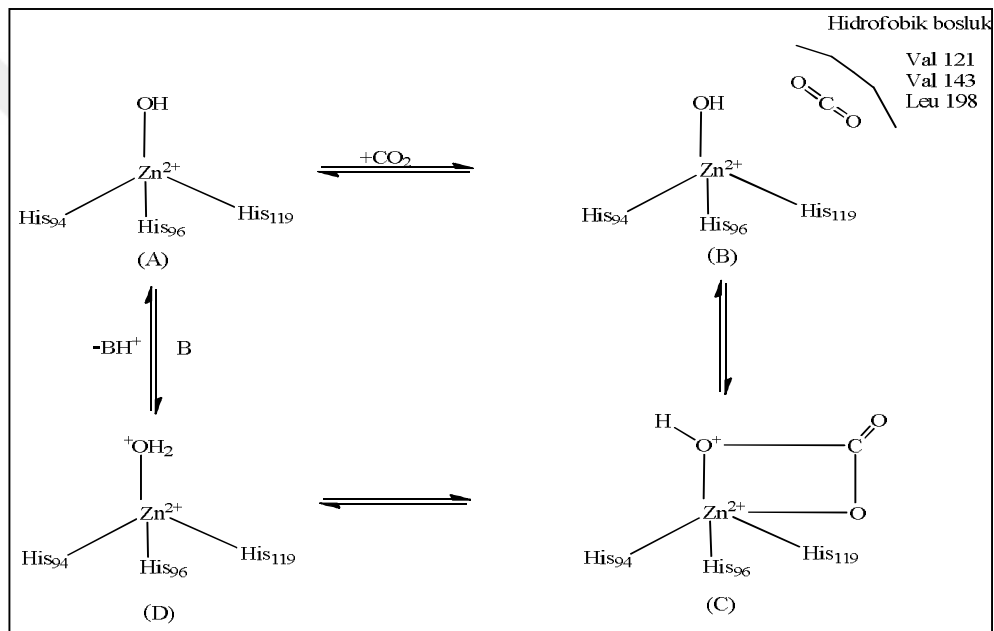
Son 50 yıldır CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre, CA enzimi aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu içermektedir. Aktif bölge yakınındaki amino asitler proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde yerleşmişlerdir.



Şekil 2.3. Zn^{2+} ile koordinasyon halindeki su molekülünün hidroksit grubuyla Thr199 ve Glu106 rezidüleri arasındaki etkileşimin şematik gösterimi.

Yapılan X-ray kristalografi verilerine göre, metal iyonunun bir H_2O veya OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir. Çinko bağlı H_2O , Glu106'nın karboksilat grubuyla ve Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu

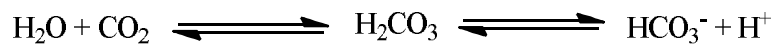
bağlanmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini yükseltmekte ve molekülü nükleofilik atak için uygun yerdeki CO₂'e doğru hareket ettirmektedir (Lesburg ve Christianson, 1995). Zn²⁺ iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu meydana gelir. (Şekil 2.3 –A). Enzimin aktif yapısı, güçlü nükleofilik yapısıyla CO₂ molekülüne saldırır (Şekil 2.3 –B). Bu da, Zn²⁺ iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunu oluşturur (Şekil 2.3 –C). Daha sonra, HCO₃⁻ iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda, Zn²⁺ iyonu su molekülüne tutunur ve bu da Şekil 2.3 –D'de gösterildiği gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Boriack-Sjodin ve ark., 1998).



Şekil 2.4. CA enziminin CO₂- hidratasyon reaksiyonunun kataliz mekanizmasının şematik gösterimi (Lindskog, 1997).

2.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi; CO₂'in hidratasyonu, bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Reaksiyonda görüldüğü gibi, koşullara göre CO₂ gazı oluşmakta ya da harcanmaktadır. Aynı zamanda H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya harcanan CO₂ gazı, metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂' in suda az miktarda çözünmesi ve

fazla zaman alması gibi dezavantajları vardır (Stams ve ark., 1988; Maren ve Conroy, 1993; Briganti ve ark., 1996).

Ortamdaki H^+ konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Fakat bu metodun reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO_2 'in suda çözünmesi ve kullanılan indikatörünün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları vardır. Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0,02-0,05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metotlar aktivite tayininde kullanılmaktadır (Maren ve Conroy, 1993; Lardolfi ve ark., 1998).

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO_2 hidrasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır.

Enzim birimi ise, enzimsiz CO_2 -hidrasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c 'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Lardolfi ve ark., 1998)

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir (Verpoorte ve ark., 1967; Lardolfi ve ark., 1998).

2.7. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki kısımda incelenmektedir. Bunlardan birincisi metallere kompleks yapmış olan anyonlar, diğer grup ise, proteinsiz çinko ligandı tarafından süstitüe edilerek enzimin Zn (II) iyonuna bağlanmış olan veya genellikle trigonal-bipiramidal yapıda olup metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörlerdir.

Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğu belirtilmiştir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları araştırmacıların ilgisini çeken özelliklerinden biridir. Sülfonamidin ligand olarak kullanıldığı bu iyonik yapının aşağıdaki reaksiyona göre oluştuğu ve bu özelliğin de karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemli olduğu bildirilmiştir (Kohn ve Wilchek, 1978).



Sülfonamidler, hidrofilik bölgeye ilaveten, aromatik ve heterosiklik hidrofobik bölgelere sahip olan, süstitüe olmamış bir $-SO_2NH_2$ grubu veya bir $-SO_2NH(OH)$ grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun N atomunun anyonlar şeklinde ($R-SO_2NH^-$ veya $R-SO_2N-OH$) ilk bağlandıkları yer CA enziminin aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonudur. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamıdır (Kohn ve Wilchek, 1978).

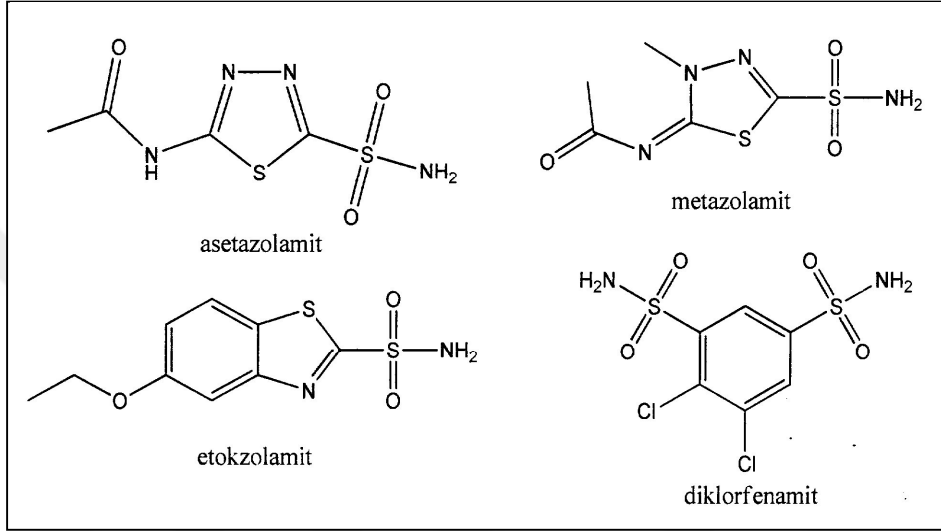
2.8. Glokom Hastalığı

Glokom tedavisinin temel amacı optik sinir başı hasarını ve buna bağlı gelişen görme alanı kayıplarını önlemektir. Optik sinir hasarının gelişiminde göz içi basıncının artmasının yanı sıra diğer birçok faktörün rolü olmasına rağmen uygulanan tedavi yöntemlerinin büyük bir bölümü göz içi basıncını düşürmeye yöneliktir. Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyonu yolu ile glokomlu hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir (James, 1993; Ritch ve ark., 1996).

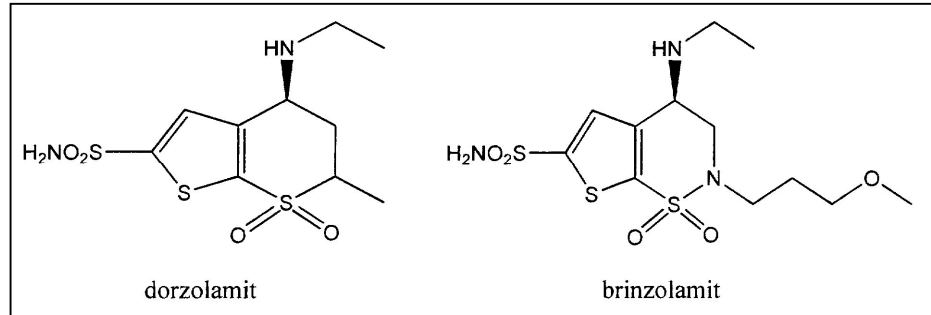
Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış, bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesi arttırılmıştır. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron, emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici antibiyotik olarak günümüzde kliniklerde kullanılmaktadır. Bu nedenle CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi oldukça önemlidir (Sapuran ve Scozzafava, 2000).

İlaç olarak kullanılan karbonik anhidraz inhibitörlerinin tarihi, 1954 yılında glokom tedavisinde kullanılan asetazolamidin sentezine dayanmaktadır. Araştırmacılar asetazolamid molekülü üzerinde küçük değişiklikler yaparak farmakolojik ve klinik açıdan daha üstün bir bileşik olan metazolamidi sentezlemişlerdir. Moleküler düzeyde yapılan bu yeniliğin daha iyi bir emilim, daha az serum proteini bağlama ve daha uzun süre etki gösterme gibi avantajlara sahip olmasının yanında bu bileşiğin hala birtakım sistemik yan etkilerinin bulunması bir dezavantaj teşkil etmekteydi. Araştırmalar sonucunda göze lokal olarak uygulanabilen ve böylelikle diğer dokulardaki karbonik anhidraz enzimlerini inhibe etmeyen, dolayısıyla daha

etkili ve daha az yan etkili iki topikal karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamit ve brinzolamit sentezlenmiştir. Oral yoldan alınan diğer karbonik anhidraz inhibitörleri ise günümüzde ilaç olarak kullanımını yitirmiştir. Bu bileşikler etokzolamit ve diklorfenamit olup terapötik dozlarda göz içi sıvısı üretimini maksimum %50 oranında azaltabilmektedir (Netland, 2008).



Şekil 2.5. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri.



Şekil 2.6. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri.

Bülbül ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; 5-amino-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamit halkası içeren safra asitlerinin türevleri sentezlenmiştir. 5-(3 α -Hidroksi-5- β -kolanamido)-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamit, 5-(3 α ,7 α -dihidroksi-5- β -kolanamido)-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamit ve 5-(3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5- β -kolanamido)-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamit gibi bileşikler sentezlenmiş ve bu bileşiklerin vücutta büyük fizyolojik fonksiyonu olan CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu bileşiklerin, etkili karbonik anhidraz inhibitörleri oldukları rapor edilmiştir (Bulbul M. ve ark., 2002).

Kasımoğulları ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, pirazol karboksilik asitler ve 5-amino-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid bileşiği arasındaki reaksiyondan çeşitli asetazolamit türevi bileşikler sentezlenmiş ve CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir (Kasımoğulları ve ark., 2009).

Kaya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada; akridin (1,4-dihidro piridin) halka sistemi içeren sülfonilamid (4-aminobenzen-sülfanamid) türevi yeni bileşiklerin sentezleri gerçekleştirilmiştir ve CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu reaksiyonda, sülfanilamid bileşiği yerine asetazolamit (AAZ) bileşiği kullanılmış ancak halkalaşma reaksiyonu gerçekleşmediği için sonuç alınamamıştır. Sentezi yapılan yeni sülfonamidlerin inhibisyon çalışmaları neticesinde bu bileşiklerinin çok iyi karbonik anhidraz inhibitörleri oldukları ve ilaç olarak kullanılan asetazolamit bileşiğinden 3-20 kat arasında değişen oranlarda daha iyi inhibisyon özelliğine sahip oldukları bulunmuştur (Kaya M. ve ark., 2011).

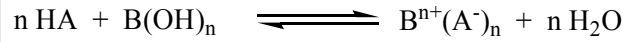
İlkimen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise; 2-amino-6-metoksi benzotiazol ile dipikolinik asitin proton transfer tuzu ve metal kompleksleri sentezlenmiş ve bu bileşiklerin karbonik anhidraz izoenzimleri (CA-I ve CA-II) üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bileşiklerin CA-I ve CA-II üzerinde orta derecede inhibisyon etkisine sahip olduğu tesbit edilmiştir (İlkimen H. ve ark., 2013).

3. PROTON TRANSFER TUZLARI

Fizik, kimya ve biyokimyada en önemli temel reaksiyonlardan biri olan proton transfer tepkimeleri, suyun öz iyonlaşması, asit-baz nötralizasyon reaksiyonu ve enzim katalizi gibi reaksiyonlarda önemli bir anahtar görevi görür (MacDonald, et al., 2000).

Proton transfer tepkimelerinde asitin protonu, bazın ortaklaşmamış elektronu tarafından transfer edilir. Proton transfer tuzlarının, metal iyonları ile reaksiyona girerek oluşturdukları metal kompleksleri genellikle suda çözünebilen iyonik bileşiklerdir. Reaksiyon gerçekleşirken baz tarafından sağlanan elektron çifti kullanılır. Böylece oluşan (+) ve (-) yüklerin bir araya gelerek oluşturdukları tuzlara proton transfer tuzları denir (Aghabozorg, et al., 2009).

Brønsted asit-baz kavramı moleküller arasındaki proton transferi üzerine odaklanır. Brønsted-Lowry asiti (HA) ile Brønsted-Lowry bazının $[B(OH)_n]$ proton transfer tepkimesine girmesi sonucunda tuz ve su molekülleri oluşur (Şekil 3.1). Bu tepkime “nötralizasyon tepkimesi” olarak adlandırılır.



Şekil 3.1. Brønsted-Lowry asit-bazın nötralizasyon tepkimesi.

Literatürde rastlanan proton transfer tuzlarında alifatik veya aromatik karboksilik asit ve aminler kullanılmıştır. Piperazin ile okzalik asit (Aghabozorg, et al., 2006); 4-(fenildiazanil)anilin ile tartarik asit (Smith, et al., 2010); 2-amino-6-metilpiridin ile 5-sülfosalisilik asit (Yenikaya, et al., 2011), 2-(aminometil)piridin, 3-(aminometil)piridin, 4-(aminometil)piridin bileşikleri ile 3,5-dinitrobenzoik asit (Ding et al., 2012); 2-amino-3-metilpiridin, etilendiamin ile 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoik asit (Yenikaya et al., 2010); 2-amino-4-metilpiridin ile 2,6-piridindikarboksilik asit (Büyükkıdan et al., 2011); 2-hidroksietilpiperazin ile 2,6-piridindikarboksilik asit (Büyükkıdan et al., 2012); 2-(4-piridin)benzimidazol ile 4-metilbenzoik asit (Novo et al., 1995) bunlar proton transfer tuzlarında kullanılan bazı asit-baz örnekleridir.

4.MATERYAL VE YÖNTEM

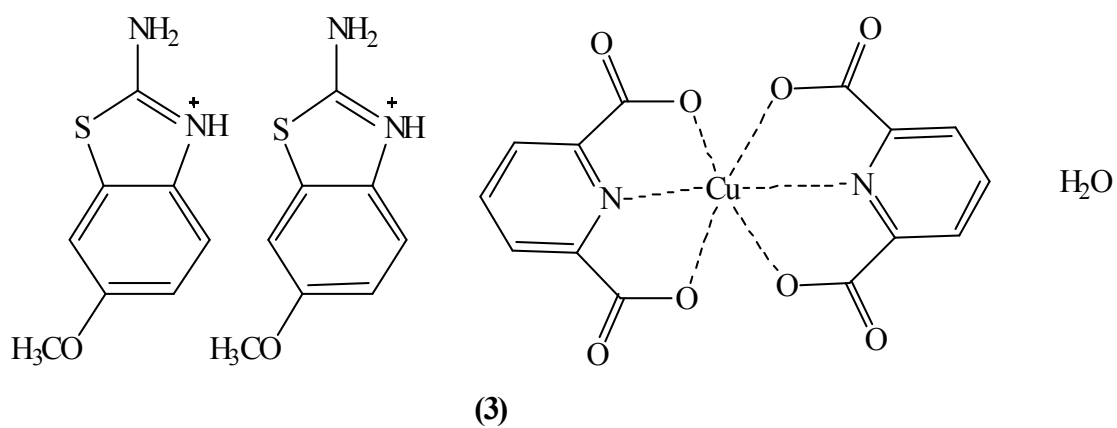
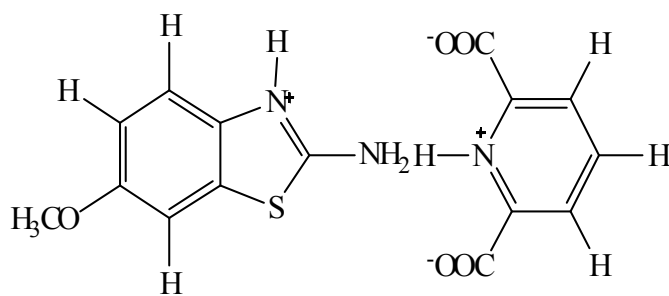
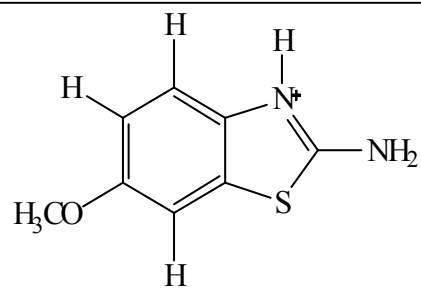
4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

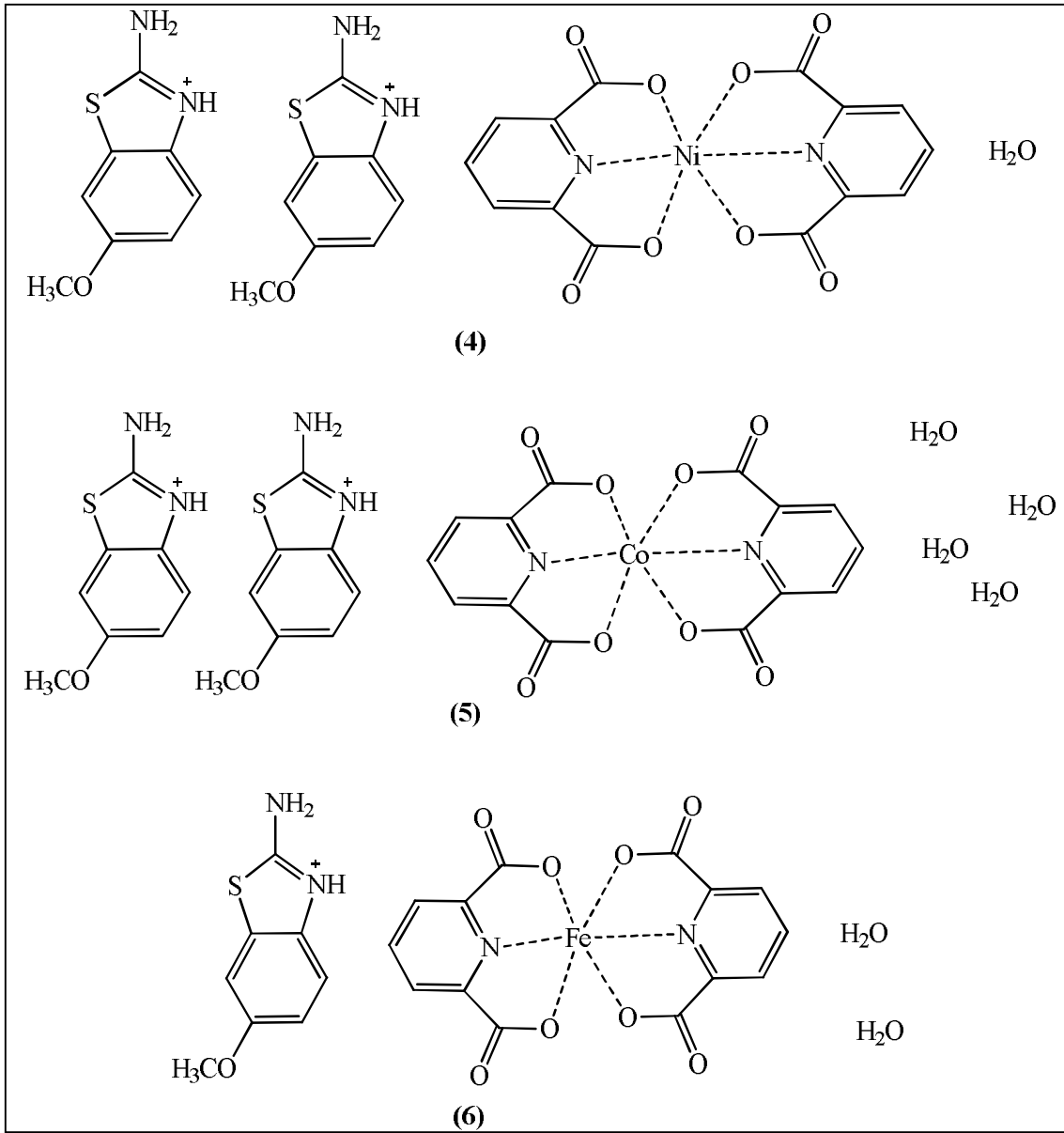
Çalışmalarımızda kullanılan siyanojen bromürle aktifleştirilmiş Sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, tris(hidroksimetil) aminometan (TRIS), sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum hidrojen fosfat, sodyum barbital, sodyum bikarbonat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, N,N' metilen bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue G-250 ve R-250, sodyum hidroksit ve karbondioksit gazı Merck ve Sigma Aldrich firmalarından temin edilmiştir.

4.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar DPÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde bulunmaktadır.

Santrifüj	: Nüve NF800
Soğutmalı santrifüj	: Sigma K30
Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1700 PharmaSpec
pH metre	: Schott Instruments/ Lab850
Peristaltik pompa	: Ismatec MS- 4/8 Reglo digital
Karıştırıcı	: Vortex-Genie, Heidolph
Hassas terazi	: Ohaus- Adventurer
Otomatik pipetler	: Biohit Proline
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR 3001
Çalkalayıcı	: GFL





Şekil 4.1. *In vitro* inhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşiklerin formülleri.

- | | |
|---|--|
| (1) 2-amino-6-metoksibenzotiyazol, | (4) 2-amino-6-metoksibenzotiyazol-3-yum bis(2,6-pirindikarboksilato) nikelat(II) monohidrat, |
| (2) 2-amino-6-metoksibenzotiyazol-3-yum bis(2,6-pirindikarboksilato), | (5) 2-amino-6-metoksibenzotiyazol-3-yum bis(2,6-pirindikarboksilato) kobaltat(II) tetrahidrat, |
| (3) 2-amino-6-metoksibenzotiyazol-3-yum bis(2,6-pirindikarboksilato) kuprat(II) monohidrat, | (6) 2-amino-6-metoksibenzotiyazol-3-yum bis(2,6-pirindikarboksilato) ferrat(III) dihidrat. |

4.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1) Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon 0,05M Tris-SO₄, pH=7,4: 6,055g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1N H₂SO₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

2) Sepharose- 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon: 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8: 16,8 g (0,02 mol) NaHCO₃, 950 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlanır.

3) 0,0025 M Veronal tamponu: 5,15 g sodyum barbitalin 900 mL suda çözüldü, pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

4) Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon: 25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na₂SO₄, pH=8,7: 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

5) Hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon: 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄, pH=8,7: 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü, 1N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

6) Kolona tutunmuş eritrosit CA-I izoenzimi ve CA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti: 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄, pH=5,6: 9,187 g 0,075 mol NaClO₄ ve 2,09 g (0,15 mol) NaCH₃COO.H₂O, 120 mL destile su ile çözüldü. 1N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

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

8) Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

9) Poliakrilamit jelin boyanması için kullanılan çözelti boyama çözeltisi: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

10) Poliakrilamit jelin yıkanması için kullanılan çözelti yıkama çözeltisi: %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

11) Jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

12) Boyama çözeltisi (SDS-elektroforezde jelin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

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

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

15) İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin %1 lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5 er mg alınıp 5 mL dimetilsülfoksitde (DMSO) çözüldü.

4.4 Yöntemler

4.4.1 Protein tayini

4.4.1.1 Kalitatif protein tayini

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

4.4.1.2 Bradford yöntemi ile ilgili protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Boyanın proteine bağlanması çok hızlı gerçekleşir (2 dk). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart hemolizattan tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL Coomasie reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dk sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomasie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

4.4.2 Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

4.4.2.1 CO₂-hidrataz aktivitesi tayini

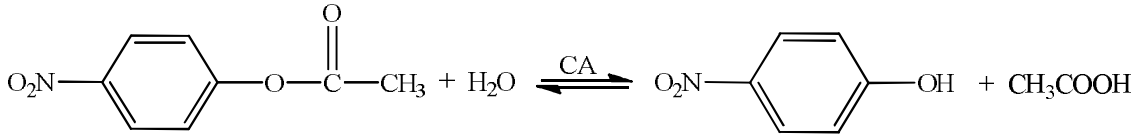
Aktivite tayini Wilbur-Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak ölçüldü. Tampon olarak da, pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na₂CO₃ + 0,1 M NaHCO₃) yararlanıldı. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c'ye bölünmesiyle belirlendi (Maren, 1960; Landolfi ve ark., 1998).

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymuş CO₂ çözeltileri konuldu. pH metreden pH'nın 6,3 civarına düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t₀). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,2 mL). Bu yöntemde göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Yani; $EU = (t_0 - t_c) / t_c$ formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

4.4.2.2 Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin CA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensip olarak karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitro fenil asetatı, 348 nm'de absorbans veren p-nitro fenol veya p-nitro fenolat'a hidroliz etmektedir.



348 nm'de p-nitro fenol ve p-nitro fenolat'ın her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Maren, 1967; James, 1993). Bu dalga boyundaki p-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvars küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından üç dakika sonra 25°C'de 348 nm'de absorbansı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın üç dakika sonraki absorbansı ile sifıra ayarlandı. Bu suretle üç dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitro fenil asetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine o miktarda inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitro fenil asetat substrat çözeltisi, taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş eklendi. Bu çözelti 3 mM'lik olup, daha derişğini hazırlamak esterlin sınırlı çözünlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Armstrong ve ark.,1966). Enzim çözeltilisinin tamponlanması 0,05M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltilisiyle yapıldı (Kohn ve Wilchek, 1978).

Esteraz aktivitesi için;

$$\text{p - Nitrofenol miktar} = \frac{A(OD) / 5}{3} \times 3 = A(OD) / 5 (\mu \text{ mol} / \text{dakika})$$

4.4.3 Afinite jelinin hazırlanması

4.4.3.1 Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanması

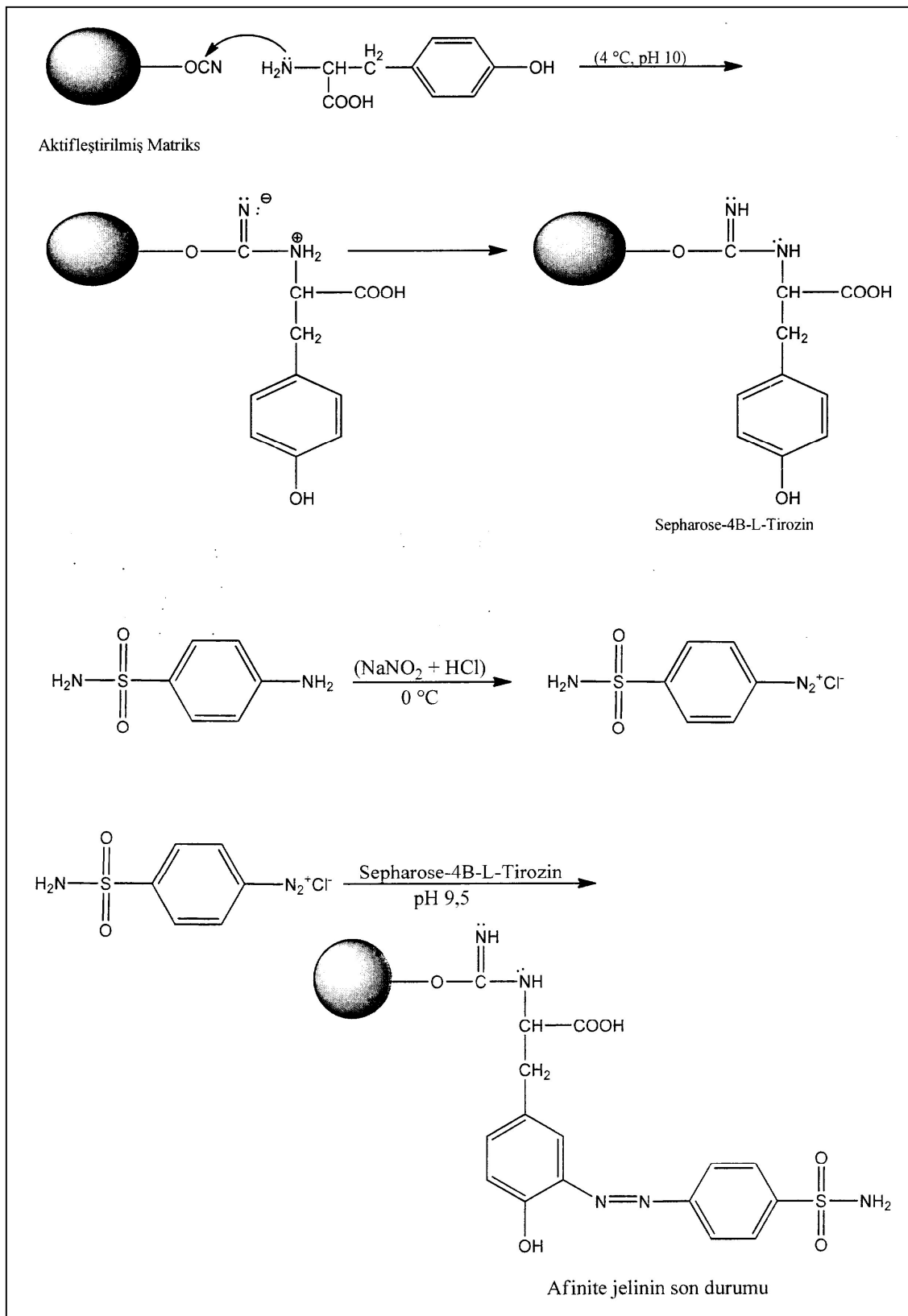
Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır (Kohn ve Wilchek, 1978).

4.4.3.2 Sepharose-4B' nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması

Siyanojen bromürle aktifleştirilmiş Sepharose-4B pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile yıkandı ve bir beher içerisine alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Süspansiyon 4°C'de 2 saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat aynı sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm'de absorbands vermeyinceye kadar bol suyla dekante edildi. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin, çözeltiden tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisine alındı (Arslan ve ark., 1997; Küfrevioğlu ve ark., 1997; Laemmlı, 1970).

4.4.3.3 Sülfanilamid kenetlendirilmesi

25 mg-sülfanilamid, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine 10 dakikada damla damla katıldı. Diazolanmış bulunan sülfanilamid, 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabit tutuldu. 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,05 M tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Cuatracases, 1970). Afinite jelinin hazırlanması esnasında gerçekleşen reaksiyonlar şekil 4.2 de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Afinite jelinin hazırlanması.

4.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

4.4.4.1 Hemolizat eldesi

Kan, antikoagulantlı kan torbalarına alındıktan sonra 4°C’de muhafaza edildi ve 2 gün içerisinde tüketildi. Alınan kanın eritrositlerini ayırmak için 10 mL’lik tüplere konuldu ve 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası birbirinden titizlikle ayrıldı. Sonra altta kalan eritrositler %0,9’luk NaCl çözeltisi ile birkaç defa yıkanıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositler hacimlerinin 1,5 misli 0°C’deki saf su ile hemoliz edildi. Hemoliz edilen eritrositler toplanarak hemolizin tam gerçekleşmesi için yarım saat süreyle karıştırıldı. Hücre zarlarının ayrılması için hemolizat 4°C’de 20.000 rpm’de yarım saat santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin dibine çöken hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatlice alındı. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH’sı katı Tris ile 8,7’ye getirildi. Böylece hemolizat kolona yüklenecek duruma geldi (Rickli ve ark., 1964).

4.4.4.2 Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

İşlemlerden geçen hemolizat kolona tatbik edildi. Kanın kolona yükleme işlemi bittikten sonra yıkama tamponu ilave edildi. Yıkama işlemi kanın kırmızı rengi kolondan tamamen gidinceye kadar ve yıkama tamponuna karşı 280 nm’de 0,05 değerine ulaşıncaya kadar sürdürüldü. Bu değere ulaşıldığında sırasıyla CA-I ve CA-II enzimlerinin elüsyon çözeltileri kolondan geçirildi. Elüsyon her tüp için 5 ml olacak şekilde yapıldı. Elüsyondan alınan her tüpün 280 nm de absorbansına bakıldı. Son olarak elde edilen enzimlere diyaliz işlemi uygulandı.

4.4.4.3 Diyaliz işlemi

Diyaliz, biyolojik moleküllerle safsızlıkların ayrıştırılmasında kullanılır ve tampon çözeltisi ile içerisinde biyomoleküllerin saflaştırılması işlemine dayanır. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları muamele edilecek biyomoleküllerin türüne göre değiştirilir. Genellikle molekül ağırlığı 10.000’den daha fazla olan makro moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya dek devam eder. Dengeye ulaşmak için genellikle 4-6 saatlik sürenin geçmesi gerekmektedir. Dengeye ulaşıldıktan sonra, dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Diyalizin birkaç defa tekrarlanması ile saflaştırma tamamlanır (Temizkan ve Arda, 2004).

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (dializ tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (selofan, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Gözenek çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. Dializ yöntemi, iyonik olan ve olmayan, tüm küçük molekülleri yok etmek veya konsantre etmek için basit, ucuz ve etkin bir yöntemdir. Genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdaki uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür (Temizkan ve Arda, 2004).

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

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

4.4.5.1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin inhibisyon etkileri glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1 lik çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA-I ve CA-II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunun da hidrataz aktivite ölçümleri yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Tablo ve grafiklerde verilen [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

4.4.5.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin inhibisyon etkileri glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1 lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde beş farklı inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Bütün esteraz aktivitesi deneylerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 3 mM, aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3 mL olduğundan ve 1 mL substrat çözeltisi kullanıldığından ortamdaki substrat konsantrasyonu 1 mM dır. Aktivite birimi şöyle hesaplandı: 348 nm de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti (ϵ) $5,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. p-nitrofenil asetatın molar absorpsiyon sabiti ise $0,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbens degerinin 5 değerine bölümü ortamdaki p-nitrofenol (p-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir (Armstrong ve ark., 1966).

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

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

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

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

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması Sonuçları

Afinite kolonunun dengelenmesi, insan kanından elde edilen hemolizatin kolona tatbik edilmesi ve yıkama işlemlerinden sonra CA-I izoenzimi 0,025 M Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH 6,3) tamponu ile CA-II izoenzimi ise 0,1M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) tamponu ile kolondan elüe edildi. Elüatlar beşer mililitrelik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm de kalitatif protein tayini yapıldı.

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

İnsan kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 0,944 mg/mL ve esteraz aktivitesi 150 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 150/0,944=158,9$$

olarak bulundu.

CA-I ve CA-II için coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi deneyleri yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltileri için mL'deki protein miktarı CA-I için 0,802 mg ve mL'deki enzim ünitesi 10 kat seyreltmeye göre hesaplanarak 9200,8 EU olarak bulundu. CA-II için mL'deki protein miktarı 0,402 mg ve mL'deki enzim ünitesi 10 kat seyreltmeye göre hesaplanarak 7163,4 EU olarak bulundu. Buna göre

$$CA-I \text{ için spesifik aktivite } (SA) = 9200,8/0,802= 11472,3$$

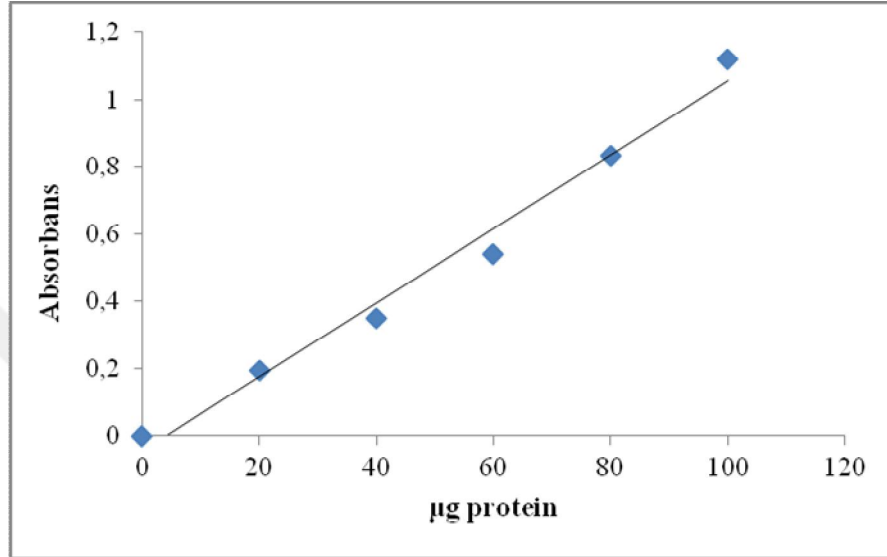
$$CA-II \text{ için spesifik aktivite } (SA) = 7163,4/0,402= 17819,4$$

Bu değerlere göre, hemolizatin doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

$$CA-I \text{ enzimi, } 11472,3/158,9= 72,2 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

$$CA-II \text{ enzimi, } 17819,4/158,9= 112,14 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

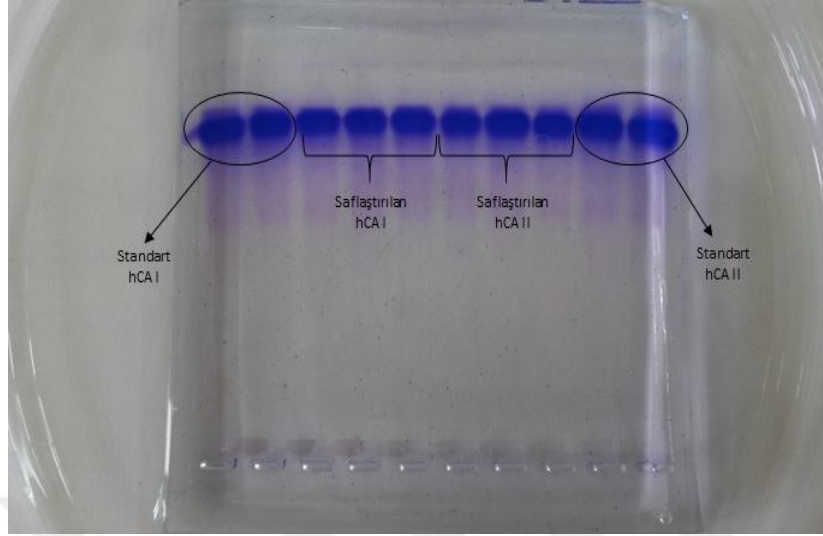
Bradford metoduyla yapılan kantitatif protein tayininde öncelikle bir standart eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart grafikten faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları bulundu. (Şekil 5.1)



Şekil 5.1. Bradford metoduyla protein tayini için kullanılan standart grafik.

5.2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez Sonuçları

Afinite kolonundan elüe edilen CA-I ve CA-II izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) jel elektrofrez yapıldı. Elektrofrez işlemi 4.4.4.4 de anlatıldığı gibi uygulandı. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi. (Şekil 5.2)



Şekil 5.2. Afinite kromatografisi ile safıştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-PAGE analizi.

5.3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimleri (CA-I ve CA-II) Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

5.3.1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

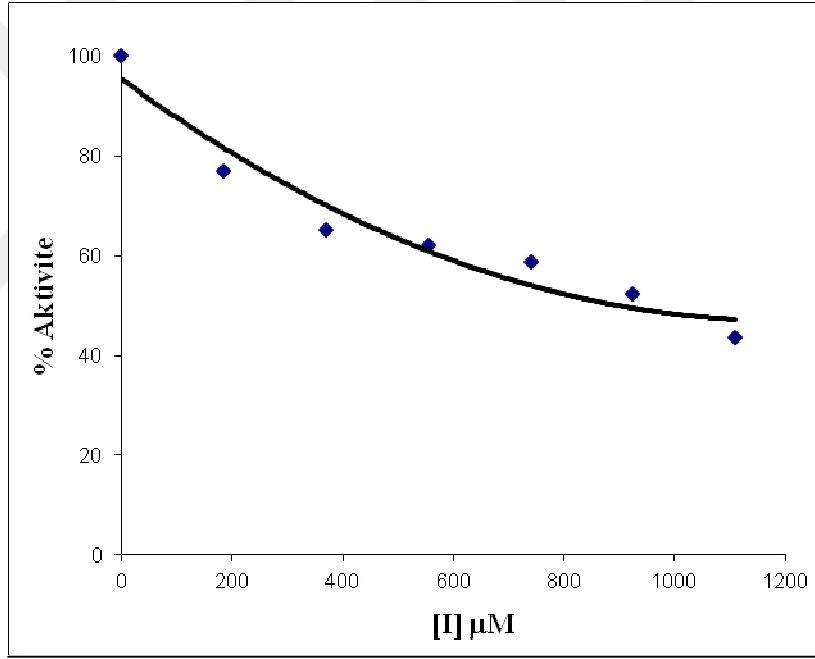
İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin inhibisyon etkileri glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1 lik çözeltileri hazırlanarak enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA-I ve CA-II izoenzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümler sonucunda, sentezlenen bileşiklerin tamamının CA-I ve CA-II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği tespit edilmiştir. Bu bileşikler inhibisyon etkisi göstermemesinin yanında herhangi bir aktivatör etki de göstermemişlerdir.

5.3.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin inhibisyon etkileri glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1 lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde beş farklı inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Çizelge 5.1. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **(1)** bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

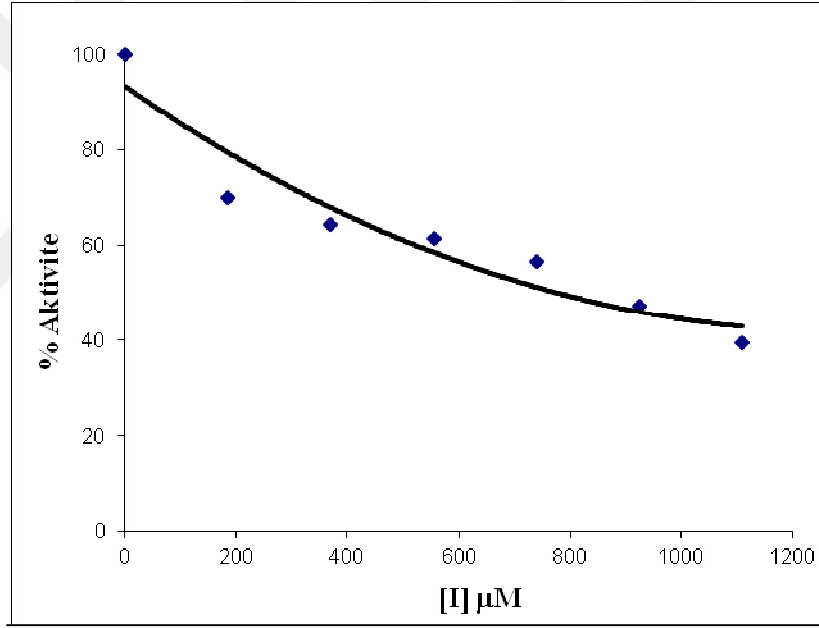
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
1	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	76,85	184,9
	1000	1300	100	200	400	65,28	369,9
	1000	1300	100	300	300	62,04	554,8
	1000	1300	100	400	200	58,8	739,8
	1000	1300	100	500	100	52,31	924,7
	1000	1300	100	600	-	43,52	1109,7



Şekil 5.3. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.2. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **(1)** bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

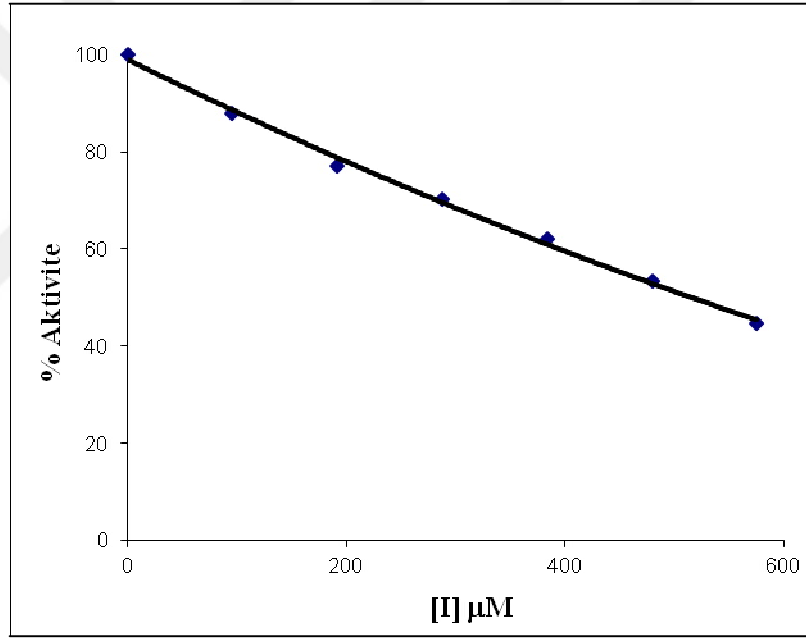
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
1	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	70	184,9
	1000	1300	100	200	400	64,28	369,9
	1000	1300	100	300	300	61,43	554,8
	1000	1300	100	400	200	56,7	739,8
	1000	1300	100	500	100	47,14	924,7
	1000	1300	100	600	-	39,52	1109,7



Şekil 5.4. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **(1)** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.1. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (2) bileşiminin CA-I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

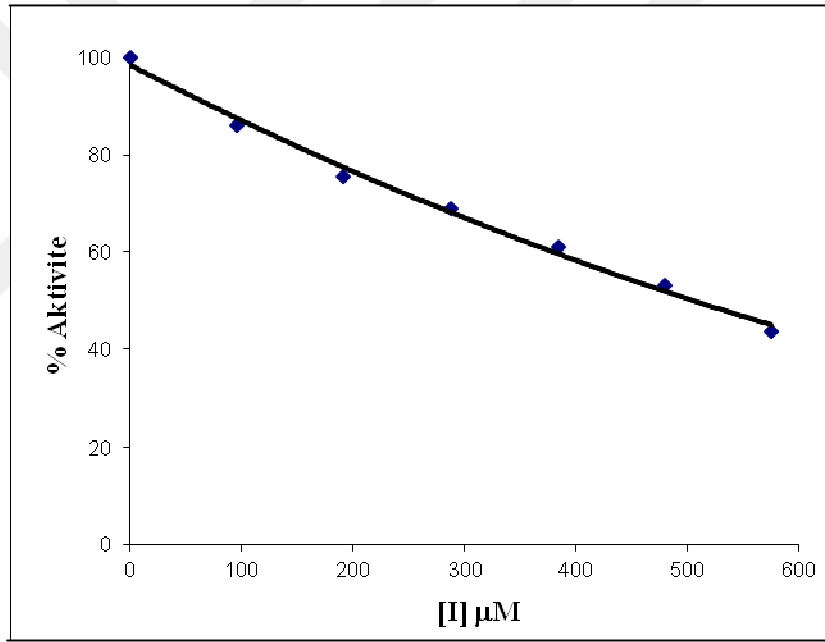
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
2	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	87,84	65,96
	1000	1300	100	200	400	77,03	191,93
	1000	1300	100	300	300	70,27	287,9
	1000	1300	100	400	200	62,16	383,86
	1000	1300	100	500	100	53,4	479,82
	1000	1300	100	600	-	44,6	575,79



Şekil 5.5. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.2. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (2) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

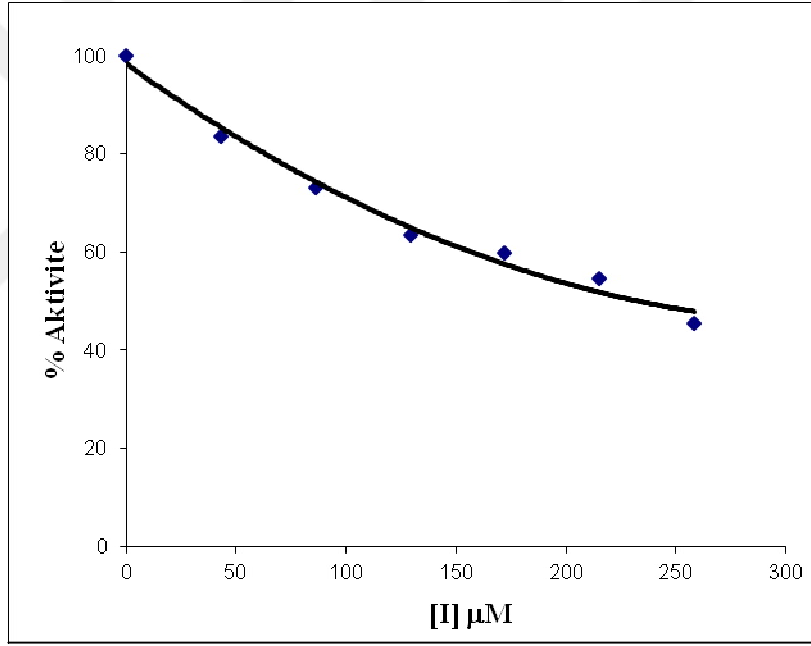
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
2	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	86,1	96
	1000	1300	100	200	400	75,5	191,9
	1000	1300	100	300	300	68,9	287,9
	1000	1300	100	400	200	60,9	383,8
	1000	1300	100	500	100	53	479,8
	1000	1300	100	600	-	43,7	575,8



Şekil 5.6. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.3. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **(3)** bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

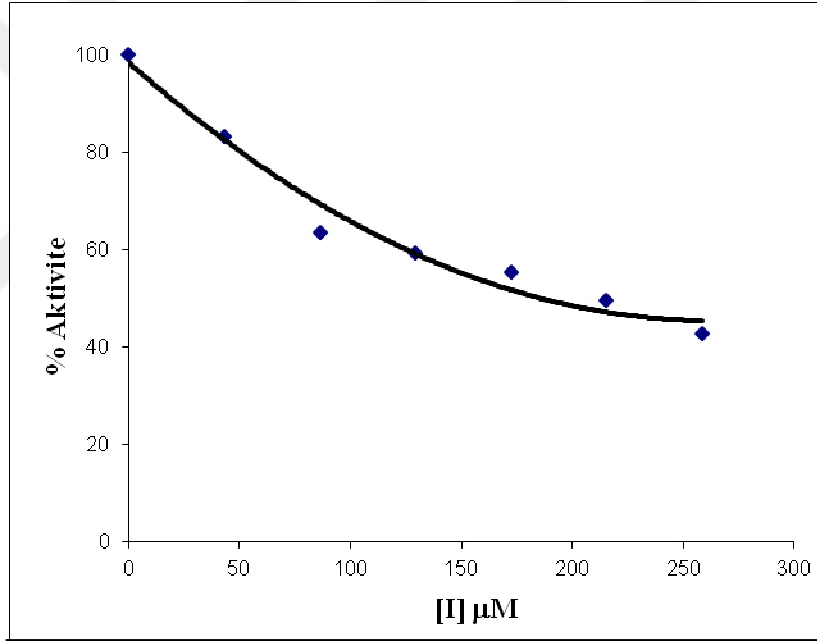
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	% Aktivite	[I] (µM)
3	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	83,6	43
	1000	1300	100	200	400	73,1	86,1
	1000	1300	100	300	300	63,4	129,2
	1000	1300	100	400	200	59,7	172,2
	1000	1300	100	500	100	54,5	215,3
	1000	1300	100	600	-	45,5	258,3



Şekil 5.7. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **(3)** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.4. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **(3)** bileşiminin CA-II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

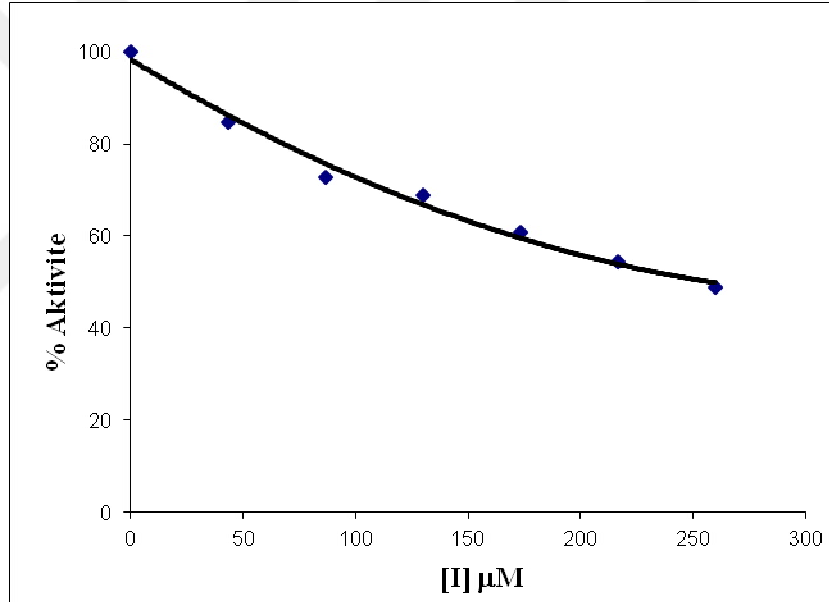
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
3	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	83,2	43
	1000	1300	100	200	400	63,6	86,1
	1000	1300	100	300	300	59,4	129,2
	1000	1300	100	400	200	55,2	172,2
	1000	1300	100	500	100	49,6	215,3
	1000	1300	100	600	-	42,7	258,3



Şekil 5.8. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **(3)** bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.5. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (4) bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

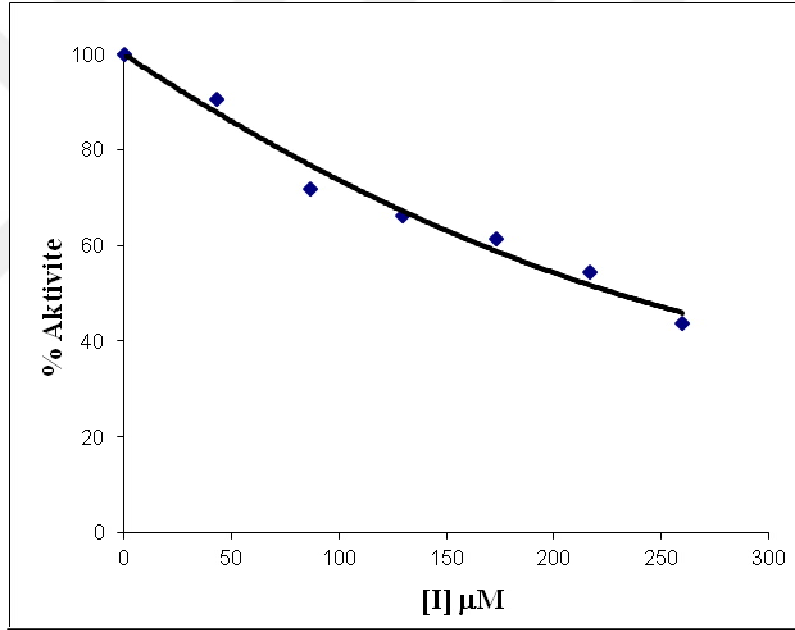
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
4	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	84,8	43,3
	1000	1300	100	200	400	72,8	86,6
	1000	1300	100	300	300	68,8	130
	1000	1300	100	400	200	60,8	173,3
	1000	1300	100	500	100	54,4	216,6
	1000	1300	100	600	-	48,8	260



Şekil 5.9. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (4) bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.6. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (4) bileşiminin CA-II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

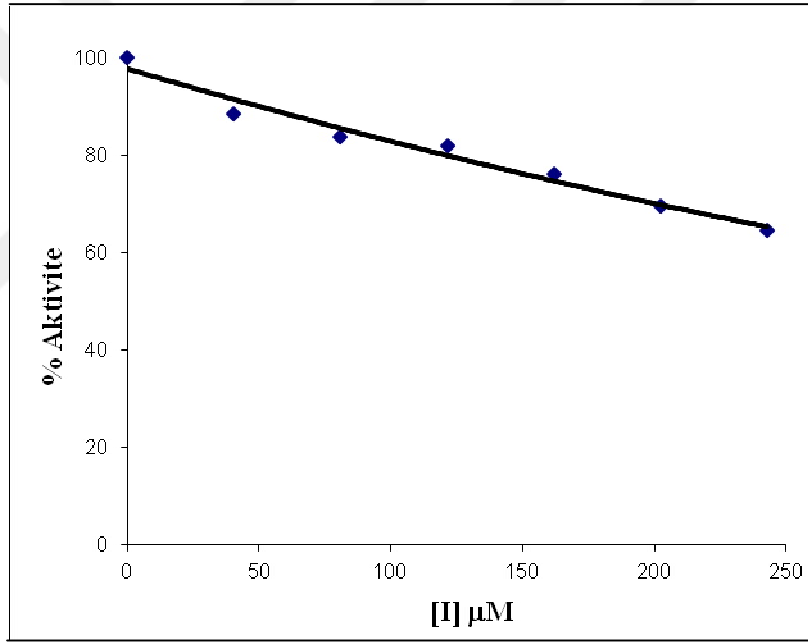
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
4	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	90,6	43,3
	1000	1300	100	200	400	71,9	86,6
	1000	1300	100	300	300	66,2	130
	1000	1300	100	400	200	61,2	173,3
	1000	1300	100	500	100	54,4	216,6
	1000	1300	100	600	-	43,7	260



Şekil 5.10. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (4) bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.7. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (**5**) bileşiminin CA-I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

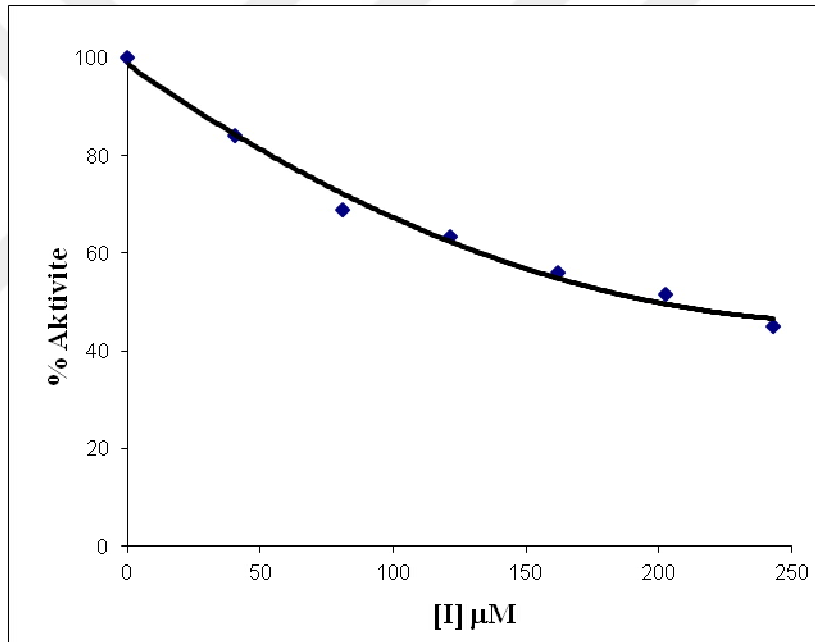
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
5	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	88,4	40,5
	1000	1300	100	200	400	83,9	80,9
	1000	1300	100	300	300	82	121,4
	1000	1300	100	400	200	76,1	161,9
	1000	1300	100	500	100	69,7	202,3
	1000	1300	100	600	-	64,5	242,8



Şekil 5.11.CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (**5**) bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.8. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **(5)** bileşiminin CA-II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

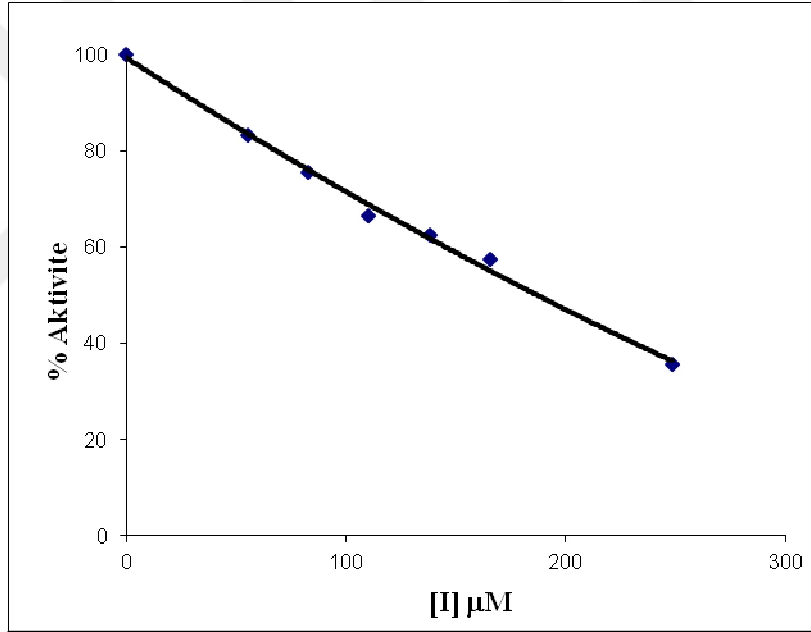
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
5	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	84	40,5
	1000	1300	100	200	400	69	80,9
	1000	1300	100	300	300	63,5	121,4
	1000	1300	100	400	200	56	161,9
	1000	1300	100	500	100	51,5	202,3
	1000	1300	100	600	-	45	242,8



Şekil 5.12. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **(5)** bileşiminin etkisi.

Çizelge 5.9. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla **(6)** bileşiğinin CA-I izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

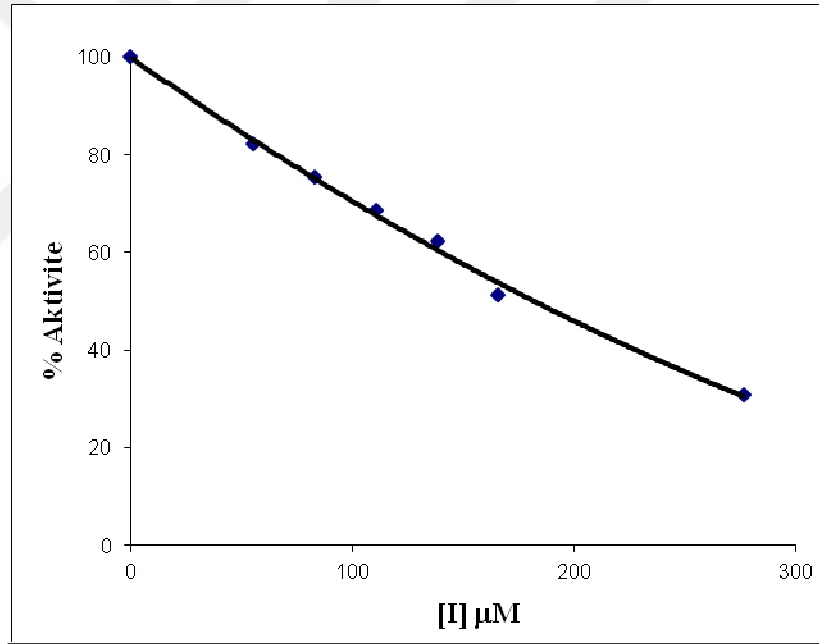
İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
6	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	83,22	55,25
	1000	1300	100	200	400	75,48	82,87
	1000	1300	100	300	300	66,45	110
	1000	1300	100	400	200	62,58	138
	1000	1300	100	500	100	57,42	165,7
	1000	1300	100	600	-	35,48	248,6



Şekil 5.13. CA-I izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine **(6)** bileşiğinin etkisi.

Çizelge 5.10. Esteraz aktivitesi ölçüm yoluyla (6) bileşiğinin CA-II izoenzimi üzerindeki *in vitro* inhibisyon etkisini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

İnhibitör	Substrat (µL)	Tris-SO ₄ Tamponu (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Saf Su (µL)	%Aktivite	[I] (µM)
6	1000	1300	100	-	600	100	0
	1000	1300	100	100	500	82,28	55,25
	1000	1300	100	200	400	75,43	82,87
	1000	1300	100	300	300	68,57	110
	1000	1300	100	400	200	62,28	138
	1000	1300	100	500	100	51,43	165,7
	1000	1300	100	600	-	30,86	276,25



Şekil 5.14. CA-II izoenziminin esteraz aktivitesi üzerine (6) bileşiğinin etkisi

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz E.C. 4.2.1.1), pek çok dokuda pH düzenleyici olarak karakterize edilen ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran bir metaloenzimdir (Gözükara, 1997). İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi; canlılarda CO_2 'in hidratasyonu ve HCO_3^{-} 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.

Hastalıkların tedavi ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu elde edilmiştir.

Glokom hastalığı tedavisinde asetazolamid uzun yıllar kullanılmıştır. Daha sonra 1995 yılında dorzolamid ve 1999 yılında da brinzolamid kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçlar tedavide etkili ilaçlardır. Fakat bu ilaçların birçok yan etkisi olmasından dolayı yeni ilaçlar sentezlenmeye ihtiyaç duyulmuştur.

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen **1-6** karbonik anhidraz inhibitörlerinin insan karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Enzim aktivitesi tayini iki farklı yöntemle yapılmıştır. Bunlardan birincisi enzimin hidrataz aktivitesinin ölçümüdür. Bu yöntemde CO_2 'in su ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H_2CO_3 'in H^+ ve HCO_3^{-} iyonlarına ayrışarak ortamın pH'ını değiştirme süresi ölçülmektedir. Bu tayinde gözlenen inhibisyon türü yarışmalı inhibisyonudur. Çünkü substrat olan CO_2 molekülünün doğrudan, enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna bağlı olan OH grubuna bağlanmasıdır. Sülfonamid inhibitörleri de aynı bölgeye bağlanacağından inhibitörle substrat enzime bağlanma konusunda bir yarışma halindedir.

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

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede IC_{50} değerleri kullanılmaktadır. Yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin insan eritrositlerinden saflaştırılan CA-I ve CA-II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisi göstermediği gözlenmiştir. Aynı zamanda bu bileşikler hidrataz aktivitesi üzerinde aktivatör etki de göstermemiştir.

Aşağıdaki tabloda yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin CA-I ve CA-II izoenzimi için esteraz IC_{50} değerleri verilmiştir. Ayrıca kontrol grubu olarak asetazolamidin IC_{50} değerleri de verilmiştir.

Çizelge 6.1. *In vitro* inhibisyon çalışmalarından elde edilen esteraz IC_{50} değerleri.

İnhibitör	Esteraz IC_{50} (mM)	
	hCA I	hCA II
Asetazolamit	$4,33.10^{-3}$	$3,24.10^{-3}$
1	0,795	0,757
2	0,512	0,490
3	0,242	0,200
4	0,237	0,214
5	0,397	0,200
6	0,193	0,174

Tablodaki değerlere bakıldığında yeni sentezlenen **1-6** bileşiklerinin CA-I ve CA-II izoenzimi için kontrol bileşiği olan asetazolamitten daha zayıf inhibitörler olduğu görülür.

Yeni sentezlenen inhibitör **1-2** bileşiklerine bakıldığında ise; **2** bileşiğinin **1** bileşiğine göre daha güçlü inhibitör olduğu görülür. Burada **1** bileşiğine bağlanmış olan dipikolinat iyonunun inhibisyonu artırıcı yönde katkısı olmuş olabilir.

Metal kompleksleri olan **3-6** bileşikleri ise; başlangıç maddesi olan **1.** ve **2.** bileşikten daha güçlü inhibitör özelliği göstermiştir. Metal komplekslerinden inhibitör özelliği en güçlü olan **6** bileşiğidir. Bu durumun bileşiğin yapısındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü diğer metal komplekslerinde tamamlayıcı iyon olarak iki tane 2-amino-6-metoksi benzotiyazol varken **6** nolu komplekste bir tane tamamlayıcı iyon vardır. Bu da bileşikteki yapısal değişimlerin, inhibisyon etkileri üzerinde de değişikliklere sebep olabileceği ifadesini desteklemektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aghabozorg, H., Ghadermazi, M., Sheshmani, S., (2006), “A novel proton transfer compound: piperazinium oxalate monohydrate”, *Acta Cryst.*, E62, o3287-o3289 s.
- Aghabozorg, H., Sadrkhanlou, E., Shokrollahi, A., Ghaedi, M. ve Shamsipur, M., (2009), “Synthesis, characterization, crystal structures, and solution studies of Ni(II), Cu(II) and Zn(II) complexes obtained from pyridine-2,6-dicarboxylic acid and 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline”, *J Iranian Chem. Soc.*, 6(1), 55-70 s.
- Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., ve Edsall, J. T., (1966), Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137 s.
- Arslan, O., (2003), Biyomoleküler Teori ve Uygulamaları, 117s.
- Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Nalbantoğlu, B., (1997), Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 515 – 518 s.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., (1997), A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Tr. J. of Med. Sci.*, 27, 559 s.
- Bradford, M. M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 s.
- Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T., *Eur. J.* (1996), *Med. Chem.*, 31, 1001 s.
- Bulbul M., Saracoglu N., Kufrevioglu O.I., Ciftci M., (2002), Bile Acid Derivatives Of 5-Amino-1,3,4-Thiadiazole-2-Sulfonamide As New Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis And Investigation Of Inhibition Effects, *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 8, 2561-2567 s.
- Büyükkıdan, N., Yenikaya, C., Sarı, M., Keşli, R., İlkimen, H., Bülbül, M. ve Büyükgüngör O., (2012), “Synthesis, characterization and biological evaluation of novel Cu(II) complexes with proton transfer salt of 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 2-amino-4-methylpyridine”, *J. Coord. Chem.*, 64(19), 3353-3365 s.
- Büyükkıdan, N., Yenikaya, C., Sarı, M., Keşli, R., İlkimen, H., Bülbül, M. ve Büyükgüngör O., (2011), “Synthesis, characterization and biological evaluation of novel Cu(II) complexes with proton transfer salt of 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 2-amino-4-methylpyridine”, *J. Coord. Chem.*, 64(19), 3353-3365 s.
- Champe, P.C. ve Harvey, R.A., (1997), Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- Cuatrecasas, P., (1970), Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 s.
- Dikmen, N. ve Özgünen, T., (2004), Harper Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 298 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Ding, X., H., Cui L., F., Li Y., H., Wang S. ve Huang W., (2012), “Proton-transfer supramolecular salts resulting from 3,5-dinitrobenzoic acid and aminomethyl pyridine”, *New J. Chem.*, 36, 1884-1890 s.
- Eriksson, A.E., Jones, T.A., Lilijas, A., (2000), Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins* 4:274-282 s. (pdb code: 1CAC).
- Gilbert, H.F., (1992), *Basic Concepts in Biochemistry*. Mc Graw-Hill Inc., 81s.
- Gilmour, K.M., (2010), Perspectives on carbonic anhydrase, *Comp. Biochem. and Phy. Part A*, 157, 193-197s.
- Gözükara, E., (1997), *Enzimler, Biyokimya*, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara.
- Harper, H., (1975), *Enzymes. Review of physiological chemistry*. Californiyalıs Altos 15th Edition. P 126-172 s.
- Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., LaNoue, K.F. ve Lynch, C.J., (1996), Differentiation-dependent expression of CA and the role of carbonic anhydrase azozimes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEBJ*, 10, 481-490 s.
- Hewett-Emmett, D., (2000), In *The Carbonic Anhydrase-New Horizons*. BirkhauserVerlag, Basel, 29-78 s.
- Iverson, T.M., Alber, B.E., Kisker, C., Ferry, J.G., ve Rees, D.C., (2000), A Closer Look at the Active Site of γ -Class Carbonic Anhydrases: High Resolution Crystallographic Studies of the Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila*, *Biochemistry* 39,9222-9231 s.
- İlkimen H., Yenikaya C., Sarı M., Bülbül M., Aslan M. ve Süzen Y., (2013), Synthesis and characterization of some metal complexes of a proton transfer salt, and their inhibition studies on carbonic anhydrase isozymes and the evaluation of the results by statistical analysis , doi: 10.3109/14756366.2013.843176.
- İnan, Y. ve Gül, M., (2001), *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s.
- Jabusch, J.R., ve Deutsch, H.F., (1989), Lacolization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat, *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, 170 s.
- James B., (1993), Blood flow in the pathogenesis of glaucoma. *Current opinion inophthalmology*, 4:65-72 s.
- Kaiser, E.T., ve Lo, K.W., (1969), The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane, *J.Am. Chem. Soc.*, 91, 4912 s.
- Kasimogullari R., Bulbul M., Gunhan H., Guleryuz H., (2009), Effects Of New 5-Amino-1,3,4-Thiadiazole-2-Sulfonamide Derivatives On Human Carbonic Anhydrase Isozymes, *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 9, 3295-3301 s.
- Kaya M., Yıldırım Y., Çelik G. Y., (2011), Synthesis and antimicrobial activities of novel bisacridine-1,8-dione derivates, *Med Chem Res*, 20:293-299 s.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., (2004), *Biyokimya*, Aktif Yayınevi, 642 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kohn, J. ve Wilchek, M. A., (1978), Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Res. Com.*, 7, 14 s.
- Laemmli, D. K., (1970), Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680 s.
- Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H. ve Tashian, R. E., (1996), Expression of carbonic anhydrase of Mouse VII. in *Coli*. And demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 268-272 s.
- Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. ve Milanese, C., (1998), Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity. *J. Pharm. And Toxicol. Meth.*, 38, 169-172 s.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarino, J., Kivelä, A.J., Waheed, A., Sly, W.S. ve Parkkila, S., (2004), Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isoenzyme family, *J. Biol. Chem.*, 279, 2719-2727 s.
- Lesburg, C. A. ve Christianson, D. W., (1995), X-ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein-zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117 6368-6844 s.
- Lindskog, S., (1997), Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharma col. Ther.* 74, 1-20 s.
- MacDonald, J.C., Dorrestein, P.C., Pilley, M.M., Foote, M.M., Lundburg, J.L., Henning, R.W., Schultz, A.J. ve Manson, J.L., (2000), “Design of layered crystalline materials using coordination chemistry and hydrogen bonds”, *J Am. Chem. Soc.*, 122, 11692-11702 s.
- Maren, T. H. ve Conroy, C. W., (1993), A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 s.
- Maren, T. H., (1967), Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 s.
- Netland, P.A., (2008), *Glaucoma medical therapy*, Oxford University Press Inc., 290 s.
- Novo, M., Mosquera, M., Prieto, R., (1995), “Excited-State Behavior of 2-(4'-Pyridyl)benzimidazole in Aqueous Solution: Proton-Transfer Processes and Dual Fluorescence”, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99 (40), pp 14726–14732 s.
- Pocker, Y. ve Janjic, N., (1989), Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 s.
- Pocker, Y., ve Sarkanen, S., (1979), Carbonic anhydrase: Structure, Catalytic Versatility and inhibition, *Advances in Enzymology*, Interscience, New York, 49, 149 s.
- Rickli, E.E., Ghazanfar, S.A., Gibbons, B.H., Edsall, J.T., (1964), Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes, *J. Biol. Chem.*, 239, 1065-1078 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ritch R., Shields MB., Krupin T., (1996), Chronic open angle glaucoma: treatment In: The glaucomas. Ritch R, Shields MB, Krupin T, eds. Sec edition. St Louis : Mosby, 1507-17 s.
- Scher, A. ve Dietsch, P., (1984), A 54 000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. In Biology and Chemistry of the carbonic anhydrase. Annals New York Acad. Sci., 429, 241 s.
- Sugrue, M.F., (2000), Progr. Ret. Eye Res.19, 87 s.
- Sly, W.S. ve Hu, P.Y., (1995), Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. Annu. Rev. Biochem, 67, 375-401 s.
- Smith, G., Wermuth U. D. ve Young, D. J., (2010), “Phenyl-ring rotational disorder in the two-dimensional hydrogen-bonded structure of the 1:1 proton-transfer salt of the diazo-dye precursor 4-(phenyldiazenyl)aniline (aniline yellow) with L-tartaric acid”, Acta Cryst., C66, o345-o348 s.
- Supuran, C.T. ve Scozzafava, A., (2000), Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1,3,4-thiadiazole-2 sulfonamide derivatives as antitumor agents, Eur. J. Med. Chem., 35, 867-874 s.
- Supuran, C. T. ve Scozzafava, A., (2001), Carbonic Anhydrase Inhibitors, Curr. Med. Chem., Italy, 1, 61-97 s.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A, Conway, J., (2004), “Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators (Taylor&Francis Medicinal Chemistry Series)”, CRC Press LLC Florida, USA, 5. 2-20 s.
- Supuran, C.T. ve Scozzafava, A., (2007), Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, Bioorg. and Med. Chem., 15, 4336-4350 s.
- Stams, T., Chen, Y., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis. D. ve Chistianson, D. W., (1998), Protein Sci., 7, 556 s.
- Telefoncu, A., (1986), Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayını, İzmir, 59 s.
- Temizkan, G. ve Arda, N. (2004), Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Van Slyke, D. O. ve Hawkins, J. A., (1930), Studies of gas and electrolyte equilibria in blood. XVI. The evaluation of carbon dioxide from blood and buffer solutions. J. Biol. Chem., 80, 265 s.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S. ve Edsall, J. T., (1967), Esterase activities of human carbonic anhydrase. J. Biol. Chem., 242, 4221 s.
- Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., İlkimen, H., Çelik, H. ve Büyükgüngör, O., (2010), “Synthesis, characterization and antiglaucoma activity of a novel proton transfer compound and a mixed-ligand Zn(II) complex”, Bioorg. Med. Chem., 18(2), 930-938 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yenikaya, C., Sarı, M., Bülbül, M., İlkimen, H., Çınar, B. ve Büyükgüngör, O., (2011), “Synthesis and characterization of two novel proton transfer compounds and their inhibition studies on Carbonic Anhydrase isoenzymes”, J Inhi. Enzyme Med. Chem., 26(1), 104–114 s.

