

SÜLFOBENZOİK ASİT TÜREVLERİNİN
ANTİGLOKOM ETKİSİNİN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Hülya ÇELİK

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Mayıs - 2010

**SÜLFOBENZOİK ASİT TÜREVLERİNİN ANTİGLOKOM ETKİSİNİN KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

Hülya ÇELİK

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

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Mayıs – 2010

KABUL VE ONAY SAYFASI

Hülya ÇELİK'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Sülfobenzoik Asit Türevlerinin Antiglokom Etkisinin Karbonik Anhidraz Enzimleri Üzerinde İncelenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

27 / 05 / 2010

İmza:

Üye : Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurgün BÜYÜKKIDAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2010 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

SÜLFOBENZOİK ASİT TÜREVLERİNİN ANTİGLOKOM ETKİSİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ

Hülya ÇELİK

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2010

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Karbonik anhidraz (E.C. 4. 2. 1. 1), merkezinde Zn^{+2} bulunan bir metaloenzimdir. Omurgalılarda CO_2 , bu enzimin substratıdır. Hücreler ve hücreler arası sıvıda CO_2 ve H_2CO_3 dönüşümlerini katalizler. İnsan gözünde CA-II ve CA-IV izoenzimleri bulunur. CA-II izoenzimi glokom hastalığı tedavisinde kullanılmasından dolayı önemli bir enzimdir.

Bu çalışmada yeni bileşiklerin 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.

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin (1 ve 2) insan eritrosit CA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalanıldı. İnsan eritrosit CA'nın hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerinde 1, 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek I_{50} değerleri bulunmuştur. CO_2 -Hidrataz aktivitesine göre inhibisyon gösteren 1 ve 2 bileşiklerinin I_{50} değerleri (enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); insan eritrosit CA I için 0,26 ile 0,13 μM ve insan eritrosit CA II için 0,30 ile 0,15 μM arasında bulundu. Esteraz aktivitesine göre ise; insan eritrosit CA I için 0,32 μM ile 0,045 μM arasında insan eritrosit CA II için 0,29 μM ile 0,23 μM I_{50} değerleri bulundu.

Anahtar Kelimeler: Glokom, I_{50} Değerleri, Karbonik Anhidraz, Lasamid, Sülfonamidler.

THE INVESTIGATION OF ANTIGLAUCOMA EFFECTS OF SULFOBENZOIC ACID DERIVATIVES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ENZYME

Hülya ÇELİK

Chemistry, M. S. Thesis, 2010

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Carbonic anhydrase (E.C. 4. 2. 1. 1), is a metalloenzyme, located in the center Zn^{+2} . The substrate of this enzyme is CO_2 in vertebrate. This enzyme catalyzes conversion of CO_2 to H_2CO_3 at cells and intracellular fluid. The isoenzymes of human eye are CA-II and CA-IV. CA-II isoenzyme is very important for using treatment of glaucoma.

In this study, the inhibitory effects of the compounds were investigated on carbonic anhydrase enzyme.

Firstly, erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II) from human erythrocyte were separately purified by affinity chromatography.

Later, inhibition effects of these new compounds (1, 2) on human carbonic anhydrase enzymes (CA I and CA II) were investigated in vitro. In the studies, it was taken advantage of hydrates and esterase activities for determining of carbonic anhydrase activities. It was observed that compounds (1, 2) showed inhibition effect on human erythrocyte CA hydratase and esterase activity. I_{50} values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For CO_2 -hydratase activity of compound (1), (2) inhibition effect ranged from 0,26 to 0,13 μM for human erythrocyte CA I and 0,30 to 0,15 μM with I_{50} for human erythrocyte CA II (molarity of inhibitor producing a %50 inhibition of CA activity). As for esterase activity of p-nitrophenyl acetate, compounds (1), (2) had inhibition ranging from 0,32 to 0,045 μM for human erythrocyte CA I and 0,29 to 0,23 μM for human erythrocyte CA II with I_{50} .

Key Words: Glaucoma, I_{50} Values, Carbonic Anhydrase, Lasamide, Sulfonamides.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresince her konuda bana yardımcı olan, benden desteğini ve ilgisini esirgemeyen, kişiliğiyle ve bilgisiyle her zaman örnek alacağım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam da kullanmış olduğum **1** ve **2** no'lu bileşiklerin hazırlanmasında emeği geçen değerli Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz YENİKAYA'ya, çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm Kimya Bölümünün değerli öğretim elemanlarına, yüksek lisans arkadaşım Rabia AKKAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan ve beni her konuda destekleyen aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Hülya ÇELİK

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KARBONİK ANHİDRAZ (CA) ENZİMİ.....	6
2.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi.....	6
2.2. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları.....	7
2.3. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar.....	9
2.4. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri	10
2.5. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları.....	10
2.5.1. α -Karbonik anhidrazlar	11
2.5.2. β -Karbonik anhidrazlar.....	11
2.5.3. γ -Karbonik anhidrazlar	12
2.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	13
2.7. Karbonik Anhidraz Aktivitesi	14
2.8. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	15
2.9. Glokom Tedavisinde Kullanılan Sülfonamidler.....	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	23
3.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	24
3.4. Yöntemler.....	25
3.4.1. Protein tayini.....	25
3.4.1.1. Kalitatif protein tayini.....	25
3.4.1.2. Coomassie Blue yöntemi ile protein tayini.....	25
3.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini.....	26
3.4.2.1. CO ₂ -Hidrataz aktivitesi tayini.....	26
3.4.2.2. Esteraz aktivitesi tayini.....	26

İÇİNDEKİLER DİZİNİ (devamı)

	<u>Sayfa</u>
3.4.3. Afinite jelinin hazırlanması	27
3.4.3.1. Sepharose-4B Matrisi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı.....	27
3.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması.....	28
3.4.4.1. Hemolizat eldesi	28
3.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu	28
3.4.4.3. Diyaliz işlemi.....	28
3.5. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA I Ve CA II Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi.....	30
3.5.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	30
3.5.2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I Ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	30
3.5.3. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin K_i sabitleriyle bulunması	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. İnsan Eritrosit CA Enzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	32
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi	33
4.2.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi	33
4.2.2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	36
4.3. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K_i Sabitlerinin Bulunması	39
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İnsan HCA II'deki metal merkezin "doğrudan" ve "dolaylı" ligandları gösteren şematik görünümü.....	12
2.2. Karbonik anhidrazın katalizlediği CO ₂ -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi	13
2.3. İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri.....	16
2.4. Anyonik inhibitörler ve Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması	17
2.5. Glokom tedavisinde kullanılan bileşiklerin şekilleri.....	18
2.6. İndisulam bileşiğinin yapısı	20
2.7. Lasamide bileşiğinin yapısı.....	20
2.8. Furosemid bileşiğinin yapısı	21
3.1. Diyaliz işleminin uygulanması.....	29
4.1. Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.....	33
4.2. İnsan eritrosit CA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi	34
4.3. İnsan eritrosit CA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi	34
4.4. İnsan eritrosit CA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Hsba bileşiğinin etkisi	34
4.5. İnsan eritrosit CA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi	35
4.6. İnsan eritrosit CA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi	35
4.7. İnsan eritrosit CA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Hsba bileşiğinin etkisi.....	35
4.8. İnsan eritrosit CA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi	36
4.9. İnsan eritrosit CA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi	36
4.10. İnsan eritrosit CA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (Hsba) bileşiğinin etkisi	37
4.11. İnsan eritrosit CA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi.....	37
4.12. İnsan eritrosit CA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi.....	37
4.13. İnsan eritrosit CA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (Hsba) bileşiğinin etkisi.....	38
4.14. İnsan eritrosit CA-I enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	40
4.15. İnsan eritrosit CA-I enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	40
4.16. İnsan eritrosit CA-I enzimi üzerinde (Hsba) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....	41
4.17. İnsan eritrosit CA-II enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği	41
4.18. İnsan eritrosit CA-II enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği	42
4.19. İnsan eritrosit CA-II enzimi üzerinde (Hsba) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	9
4.1. Sentezlenen bileşiklerin HCA izoenzimlerinin in vitro CO ₂ -hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları	38
4.2. Sentezlenen bileşiklerin HCA izoenzimlerinin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları	39
4.3. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

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

Açıklama**Kısaltmalar**

CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
E. C	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ES	Enzim-substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
E. U	Enzim ünitesi
HCA-I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
HCA-II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
IOP	Yüksek göz içi basıncı
Tris	Trihidroksimetilaminometan

Açıklama

1. GİRİŞ

Enzimler, günümüzde biyokimya alanında en çok çalışılan konulardan biridir. Enzimlerin, sağlıktan endüstriyel konulara kadar çok sayıda geniş uygulama alanı vardır [1].

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en özel grubunu teşkil ederler [2]. Vücuttaki tüm reaksiyonlar enzimler tarafından yürütülürler. Enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyonda; enzimler substratları kullanışlı yollara seçici olarak kanalize ederler [3]. Enzimler genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı tip benzer reaksiyonları katalizler. Substratlara karşı spesifiklikleri ise oldukça yüksek ve kesindir [4].

Enzimlerin ürüne dönüştürdükleri maddelere substrat denir. Enzimlerin substratlara göre daha hacimli olmaları, kataliz olayına enzimin sınırlı bir alanının, yani aktif bölgesinin katıldığı kavramına yol açmıştır. Aktif bölgeler çoğu kez, enzimdeki yarıklara veya multienzimlerde alt birimler arasındaki ara kesit yüzeylerine yerleşmiştir. Substratlar yaklaştığı zaman katalitik noktalar, bu noktanın oldukça ötesine kadar uzanabilen konformasyon değişikliklerine uğrayabilir [5].

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.

Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^{15} ile 10^{20} kat daha hızlıdır. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir [3]. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda 1 mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biri de karbonik anhidrazdır (600.000 s^{-1}) [1].

Enzimlerin büyük bir kısmının etki gösterebilmesi için protein yapılı olmayan bir kofaktöre gereksinimi vardır. Kofaktör, koenzim adı verilen organik bir molekül veya metal iyonu olabilir. Enzim, kofaktörü ile beraber bulunuyor ise holoenzim, holoenzimin kofaktörsüz protein kısmına apoenzim denir. Kofaktör gerektiren enzimlerde; uygun kofaktör yoksa apoenzimin biyolojik aktivitesi yoktur [6]. Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere "prostetik grup" adı verilir [4].

Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları asit-baz katalizi, kovalent kataliz veya enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırır [6].

Enzimlerin reaksiyon hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla;

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

Bu etkenler enzim üzerine değişik oranlarda etki etmektedirler.

Enzimler üzerinde araştırılan önemli konulardan biri de enzim inhibisyonudur. Enzim inhibisyonu bir çok çalışmaya temel oluşturmuştur.

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem in vivo hem de in vitro olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaç ve zehirli bileşik, etkilerini bu yolla gerçekleştirirler [7]. İnhibitörler; hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir [4].

Bir enzimin katalitik etkisi birçok yolla değiştirilebilir. Bir protein olan enzim molekülü, denatüre edilirse; üç boyutlu yapısı bozulur ve bunun sonucunda enzimin katalitik etkisi kaybolur. Enzimin aktif bölgesini oluşturan fonksiyonel grupları bloke eden herhangi bir reaksiyon, enzim aktivitesini değiştirir veya yok eder. Bu tip bir inhibitör enzime katılınca enzimin orijinal aktivitesi tekrar kazanılmayacak bir şekilde değişikliğe uğrar.

Enzim inhibisyonu, dönüşümsüz (irreversible) inhibisyon ve dönüşümlü (reversible) inhibisyon olmak üzere iki grupta incelenir [6]. Dönüşümsüz inhibisyonda, inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Bu yüzden dönüşümsüz inhibitörlere ‘enzim inaktivatörleri’ de denir. Dönüşümsüz inhibisyonda V_{max} azalır, K_M ise değişmeden kalır.

Dönüşümlü inhibisyonda, 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) inhibisyonudur. 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. Bu, yarışmalı bir inhibitör varlığında $1/2 V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekeceği anlamına gelir. [S] yüksek olduğu zaman aktif bölgelerin tamamı substrat tarafından doldurularak, enzim tam kapasite ile çalışır [3, 4].

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda; inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon kaldırılamaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir: EI ve ESI [4].

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitör serbest enzime bağlanamaz, ES kompleksine bağlanır. Bunun için tek substratlı sistemlerde, yarı yarışmalı inhibisyona seyrek rastlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. ESI kompleksi ortamda sürekli olarak

var olacağından, yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla ES kompleksi ortamdaki sürekli çekildiğinden, enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşum dengesi daha fazla sağa kayar ve K_M değeri küçülür [8, 9].

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. Buraya kadar anlatılan yarışmasızla aynı gibi görünmesine karşın, EI kompleksinin substrata karşı afinitesi serbest enzime göre daha azdır [10].

İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır [4].

Enzim inhibisyonu gibi konuları ele alan çalışmalarda enzim saflığı çok önemlidir. Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok yapı taşıyı içeren ham bir hücre özütünden ayırmaktır [5]. Daha öncede belirttiğimiz gibi enzimler protein yapısında olduklarından dolayı protein saflaştırma yöntemleri enzimler içinde uygulanabilir. Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. 1000'in üzerinde enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Globuler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanılarak, saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Globuler proteinlerin bu özelliklerini şöyle sıralayabiliriz:

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

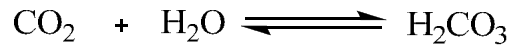
Enzimlerin, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, güvenilir ve doğru sonuç veren; spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi olan afinite kromatografisi yöntemidir ve bu yöntemde göre karbonik anhidraz enzimini saflaştırıp karakterizasyon incelenmesi yapılabilmektedir. Bu yöntemde; ligand, enzime son derece spesifik olduğundan enzime kolayca bağlanır. Diğer enzim ve moleküller ortama tutunamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzim kolonda kalır. Kolonda kalan enzim, uygun tamponlarla elue edilir [5].

Bazı enzimler için özel ünite tanımları vardır. Bunlardan çıkılarak spesifik aktivite hesaplanır. Spesifik aktivite (özgül aktivite) terimi; 1mg proteine karşılık gelen enzim ünitesi (E.U./ mg protein) olarak tarif edilir. Bu değer enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim saflaştırılması esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği anlaşılır [4].

2. KARBONİK ANHİDRAZ (CA) ENZİMİ

2.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) çinko içeren ve karbondioksitin tersinir hidratasyonunu katalize eden bir enzimdir [11]. Katalizlenen reaksiyon;



şeklinindedir.

Fakat H_2CO_3 kendiliğinden



şeklinde iyonlarına ayrışır.

Yapılan çalışmalarda; yukarıdaki hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarının kendiliğinden oluşum hızından çok daha hızlı olduğu görülmüştür [12]. Bu olaylarda, kanda var olan bir enzimin rol alabileceği düşünüldü. Daha sonra karbonik anhidraz enzimi Roughton ve Meldrum tarafından insan eritrositlerinde bulundu [13]. Birkaç yıl sonra karbonik anhidraz varlığı başka canlılarda ve başka dokularda da ortaya çıkarıldı. [14, 15, 16].

Genel olarak karbonik anhidraz enzimi metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanısıra, birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol almaktadır [17, 18]. Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla, tükrük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde kabuklu hayvanların kabuk yapısında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu da ispatlanmıştır. CA, sözü geçen canlı hücrelerin çoğunda; stoplazmada çözünmüş, bazende hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunmaktadır [19, 20, 21].

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. İzoenzimlerin aktiviteleri farklı; substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir [4]. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit sayısı ve sırasının farklı olması, her bir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir.

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 16 farklı CA izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre (CA-related proteins, CARP) belirlenmişlerdir [17,18]. Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır [17]. Bu izoenzimlerden CA, I, II, III, VII ve XIII olmak üzere beş tanesi sitozoliktir. CA-IV, CA-IX, CA XII ve CA XIV ise membrana bağlıdır. CA-VA ve VB mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır ve üç tanesi nonkataliktir (VIII, X, XI) [20].

2.2. Karbonik Anhidraz (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. Bu yolla çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO₂ ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO₂/HCO₃⁻ transportu gibi önemli fizyolojik olaylarda rol oynadıkları gibi; kemik erimesi, kireçlenme, tümör oluşumu ve diğer patolojik ve fizyolojik proseslerde de rol oynadıkları açıklanmıştır [22,23]. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinde bulunur. HCA-I izoenziminin turnover sayısı 2.5 x 10⁵ s⁻¹'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu HCA-II kadar açık değildir. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi bulunamamıştır [17, 24, 25].

HCA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25°C de 10⁶ 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 [11].

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi, glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Glokom hastalığı, anormal derecede yüksek göz içi basıncından ileri gelmekte (intraocular pressure, IOP) ve dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Humor aközün salgılanmasında, karbonik anhidraz enziminin uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile, silyer epitelinin salgı aktivitesi %25-30 oranında azalmaktadır [26].

Böbrek kortekslerinde ise membrana yapışık halde olan HCA-II izoenzimi ile Na^+ ve H_2O 'nun geri emilimi sağlanmaktadır. HCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da; kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da HCA-II izoenziminin kemik dokusu, böbrek ve beyin organları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır [27].

İskelet kasında CA enzimi olarak HCA-III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kırmızı kas dokusuna CA-III enzimi zayıf bağlı olup, doku kapilerine CO_2 'in difüzyonunu kolaylaştırıcı bir görev yapmaktadır [28]. Düşük aktiviteli bir izoenzimdir ve bu enzimin turnover sayısı $8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ dir. Sülfonamidlere karşı diğer CA izoenzimlerine oranla daha ilgisizdir. Kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olduğundan dolayı, büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Aynı zamanda bu izoenzimden yağ dokusunda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri gibi HCA-III de *p*-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Diğer yönden HCA-III izoenziminin fosfataz aktivitesi de vardır [29]. Son zamanlarda da fosfataz aktivitesinin, Cys-186 ve glutatyon arasındaki bir disülfid bağının formasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir [28, 30].

HCA-IV ve HCA-VI ise, iki sinyal sekuens izoenzimleri olup, sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. HCA-IV izoenzimi membrana bağlı bir enzimdir ve böbreklerin membranına bağlı olarak bulunduğu gibi, bazı epitel hücrelerin membranlarına bağlı olarak ve akciğerde kapiler hücrelerinin plazma yüzeylerine yerleşmiş olarak bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar; sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığını göstermiştir. Bu durum mitokondriyal CA enzimi olan HCA-IV'ün, sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu; sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak, üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanmaktadır. Bu enzim glikozilfosfatidil inositol bileşiğinin Ser-284'e bağlanmasıyla membrana tutunmaktadır. Bu bağlanma, bir 28 rezidülek C-terminal fragmenti tarafından gerçekleştirilir [31].

HCA-V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoil fosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, glukoneogenez ve ürogenizde rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipogenez olayında da etkili olduğu bildirilmiştir [32].

Tükrük bezinde CA enzimi olarak HCA-VI ve HCA-VII izoenzimi vardır. HCA-VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup,

tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır. HCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır [33].

HCA-VIII enzimi de sıçan beyninden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde keşfedilmiştir. İnsan cDNA homologlarının amino asit dizilişleri de tespit edilmiştir [34].

Karbonik anhidrazın insan, hayvan ve bitki dokularındaki dağılımı ve üstlendiği hayati görevlerden dolayı, son zamanlarda bu enzimin yapısı ve fonksiyonları hakkındaki çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalar sonucunda molekül yapısı, kataliz mekanizmaları, kimyasallarla etkileşimleri sonucu inhibitör ve aktivatör etkisi gösteren bileşikler hakkında önemli ilerlemeler sağlanmıştır [17].

2.3. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO₂'in hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Çizelge 2. 1) [17].

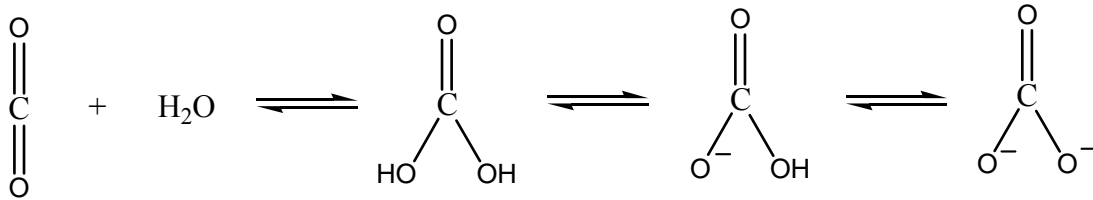
Çizelge 2.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

- (1) $O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
- (2) $O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
- (3) $HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
- (4) $RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
- (5) $RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
- (6) $RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
- (7) $ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
- (8) $ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$ (Ar = 2,4-dinitrofenil)
- (9) $PhCH_2OCOC(=O)Cl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
- (10) $RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R = Me; Ph)

2.4. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmada son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kayıp olmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [35].

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



Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzim de sitoplazmada çözülmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28000 dalton olup, 259 veya 260 amino asitten ibaret tek bir polipeptid zinciri halindedirler. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn^{+2} iyonu ihtiva etmektedir. Zn^{+2} iyonunun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar [36, 37].

Çalışmalar sonucunda üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzer oldukları bulunmuştur [38].

2.5. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

CA, varlığı bakımından incelenen bütün hayvanlarda ve fotosentez yapan organizmalarda ve aynı zamanda bazı fotosentetik olmayan bakterilerde bulunan yaygın bir enzimdir. α -CA, β -CA ve γ -CA olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilişkisiz üç farklı familyada varlığı tespit edilen CA'lar, şartıcı yeni buluşlardan biridir [39]. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine onların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdadır [22].

2.5.1. α -Karbonik anhidrazlar

İnsan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formlu bir sıçan CA-V'i ve E. coli'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bu izoenzim formlarının genel yapıları çok benzerdir. Moleküller neredeyse küresel, yaklaşık boyutları ise $5 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ 'tür. Molekülün kalan kısmına gevşek şekilde bağlı olan amino terminal bölge haricinde (yaklaşık 24 aminoasit), bu α -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir [40].

Molekülün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında, α -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer β şeritleri antiparalel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nispetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir [41].

Aktivite bölgesi, neredeyse molekülün merkezine uzanan büyük, koni biçimli bir oyukta bulunur. Çinko iyonu bu oyukun tabanına yakındır. Dördüncü ligandın H_2O veya OH^- olduğu tetrahedral geometrideki His-94, His-96 ve His-119'dan üç azot atomuna bağlıdır. Ligandlar proteindeki diğer gruplara hidrojen bağlarıyla tutunmuş ve bir "dolaylı ligand" kabuğu oluşturmuştur (Şekil 2.1) [40].

Metal iyonlu ligandlar ve dolaylı ligandların α -CA amino asit dizilişleri sabittir. Doğrudan ve dolaylı çinko ligandlarına ek olarak, sıralı bütün α -CA'larda 17 aminoasit rezidüsü kesin şekilde korunur. Bu rezidülerden bazıları katalitik aktivite açısından önem taşırken, diğerleri protein yapısının kararlılığında rol oynar. Esasen bilinen, bütün α -CA ailesi ve α -CA ile ilişkili proteinler içinde, sadece 10 aminoasit rezidüsü tamamen sabittir.

Bu rezidülerden bazılarının insan CA II'nin kararlılığı açısından önemi, bölgeye özel mutajenez ile test edilmiştir.

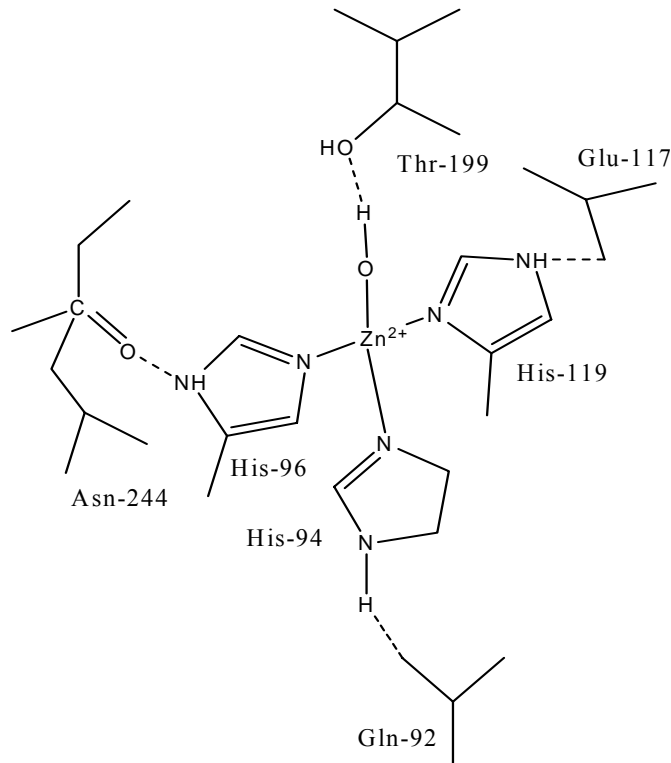
2.5.2. β -Karbonik anhidrazlar

Henüz hiçbir β -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu kuvvetle savunur. Mutasyonlar ve X-ray spektroskopisi absorpsiyon sonuçları; ıspanaktaki Zn (II) iyonu, α -CA'dakinin aksine bir Cys-His-Cys- H_2O grubuyla koordine olmuş bir küre şeklinde olduğunu göstermektedir [42].

2.5.3. γ -Karbonik anhidrazlar

Son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak γ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik molekül α -CA'lardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi vurgulamaktadır. Her bir ünite, her dönüş başına üç kısa iplikçik bulunan sol el β -heliks yapısının yedi dönüşü ile olmaktadır. Bunun sonucunda birbirinin yanında üç tane yassı β -şeridi meydana gelir. Heliksin karşılıklı bölmeleri de üçgen yapısındadır.

Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand olmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar. *M. thermophila* CA'sındaki ve insan CA-II'deki metal merkezli bu pozisyon önemli benzerlikler gösterir ve bu durumda katalitik fonksiyonların yakın olması da çinko bağılı bölgelerin benzer olmasından ileri gelmektedir [43].



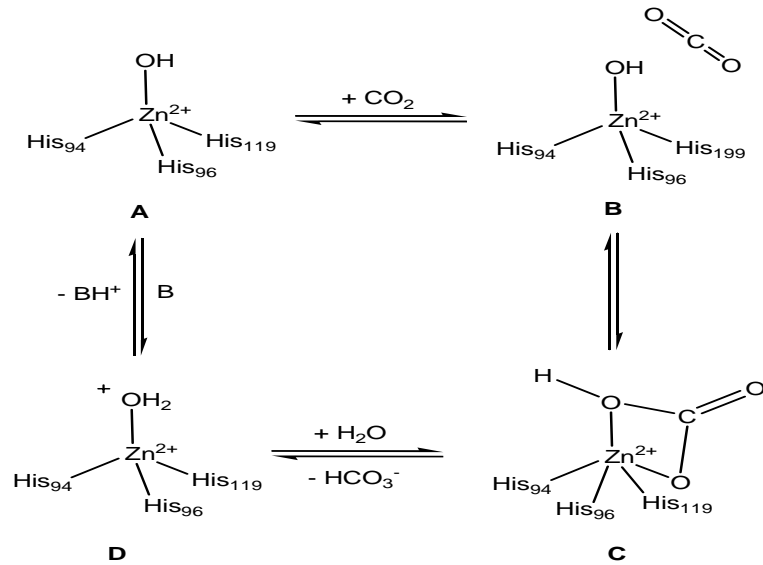
Şekil 2.1. İnsan HCA II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü

2.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Çalışmalar sonucunda, karbonik anhidraz enziminin yapısal olarak iki önemli özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bunlardan birincisi, aktif bölgede Zn^{+2} iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir.

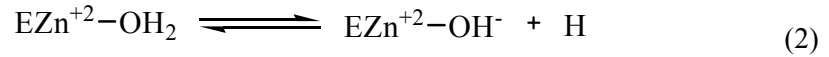
Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristalografisi çalışmaları metal iyonun, aktif bölümün 15 \AA^0 derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü/ hidroksit iyonu tarafından koordine edilmektedir. Çinko bağlı H_2O , Thr-199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu Glu-106'nın karboksilat grubu ile köprü halindedir. Bu bağlantılar çinko bağlı molekülün nükleofilisini artırır ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO_2 'e doğru hareket etmektedir [17].

Enzimin aktif formu; hidroksil grubunun çinkoya bağlı olduğu temel formdur (Şekil 2. 2-A). Bu güçlü nükleofil, CO_2 molekülü ile etkileşir (Şekil 2. 2-B). Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2. 2-C). Bu bikarbonat iyonu daha sonra su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Böylece Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır. Bu da enzimin asit formuna yol açar (Şekil 2. 2-D). Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [44].



Şekil 2.2. Karbonik anhidrazın katalizlediği CO_2 -hidratasyon reaksiyonunun mekanizmasının gösterilişi

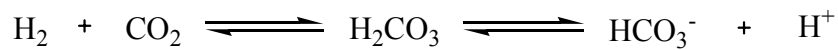
İşlem şematik olarak şöyle gösterilebilir:



Katalizdeki hızı sınırlayan basamak ikinci reaksiyondur. CA-II, CA-IV, CA-V, CA-VII ve CA-IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir [45].

2.7. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

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



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortama göre CO₂ gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO₂ gazı, kantitatif olarak manometrik metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂'in suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır [46].

İkinci olarak, ortamdaki H⁺ konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması CO₂'in suda çözünmesi ve kullanılan indikatörünün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da 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 [46, 47].

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO₂ hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır. Enzim birimi ise, enzimsiz CO₂-hidratasyon süre (t₀) 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 [47].

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [47, 48].

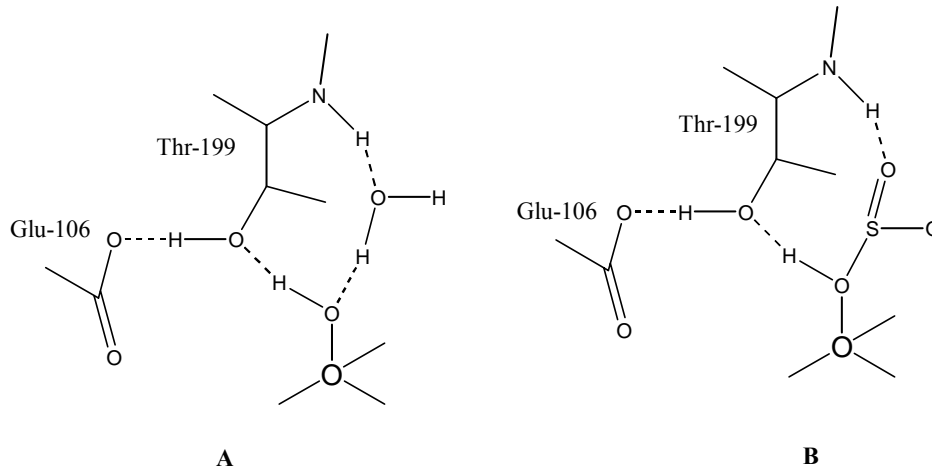
2.8. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki sınıfta incelenmektedir. Bunlardan birincisi metallere kompleks yapmış anyonlardır. Diğer grup ise, ya proteinsiz çinko ligandı tarafından süstitüe edilmesiyle enzimin Zn (II) iyonuna bağlanan veya genellikle trigonal-bipiramidal yapıda olan metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörlerdir. Sülfonamidlerin, CA-I izoenziminin Zn (II) iyonunun tetrahedral yapısına bağlanması çok önemlidir.

İnorganik anyon ve katyonların, CA enziminin inhibisyonu hakkında yapılan araştırmalarda, birçok tek değerlikli anyonların CA enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdikleri bulunmuştur. Genellikle tek değerlikli anyonlar CA enzimini inhibe eder, fakat kolay çözünen bu iyonların konsantrasyonları; çok küçük mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN^- ve 1 M'lık iyon konsantrasyonlarında inhibisyon gösteren F^- iyonunda olduğu gibi konsantrasyonlar, çok büyük farklılıklar gösterir [49].

Metal iyonuna anyonik inhibitörlerin bağlanması sonucu CO_2 hidratasyonunun katalizlenmesinde; katılan koordine olmuş OH^- iyonunun formasyonuna engel olduğu; pH'ya bağlı inhibisyon çalışmaları ve enzimle süstitüe olmuş Co^{+2} iyonunun optikal spektrum etkisi çalışmalarıyla gösterilmiştir. Co^{+2} bağlı spektrumlar; bazı anyonların, çinko bağlı çözücü molekülü kolayca yerinden çıkararak tetrahedral koordinasyonu sağlarken, diğer anyonların da pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduklarını açıklamaktadır [49].

Bir proton ligandına sahip olan inhibitörler, tetrahedral koordinasyon geometrisini bozmaksızın, metal bağlı çözücü molekülüyle yer değiştirirler. Örnek olarak HSO_3^- ve HS^- anyonları verilebilir. Hidrojen bağlı oksijen atomlarından biri, Thr-199'un NH grubuna bağlanırken, HSO_3^- iyonu da derinde olan su molekülüyle yer değiştirir. Üçüncü oksijen atomu, 0.31nm'lik bir bölgedeki çinko iyonuna doğru yönelir [50].



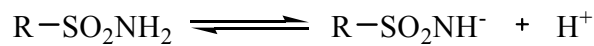
Şekil 2.3. İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri

(Hidrojen bağları ve tek ligandan metale bağ, kesik çizgilerle gösterilmiştir. Elektrik yükleri atılmıştır.)

A: İnhibe olmayan enzim B: Bisülfür

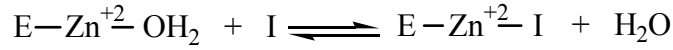
SO_4^{2-} gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhiye etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler [51]. Esasen, pH=6,0'da 2,4 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 'ın varlığında bile, insan CA-II izoenziminin kristal yapısında sülfat iyonunun bağlandığına dair hiçbir kanıt yoktur. Negatif yüklü iyon Glu-106'nın bağlanmasını önlemektedir [52].

Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.

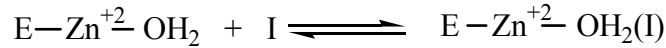


Sülfonamidler; hidrofilik bölgeye ilaveten, aromatik ve heterosiklik hidrofobik bölgelere sahiptirler. Sülfonamidlerde $\text{R-SO}_2\text{NH}_2$ 'deki N atomu; ilk olarak CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile iyonik bağlanır, ikinci olarak da hidrofobik etkileşimlerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur.

Nitekim süstitüe yada alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında; yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grup taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise; yalnızca hidrofobik bağlanmadan dolayı, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitörler değildir [17].

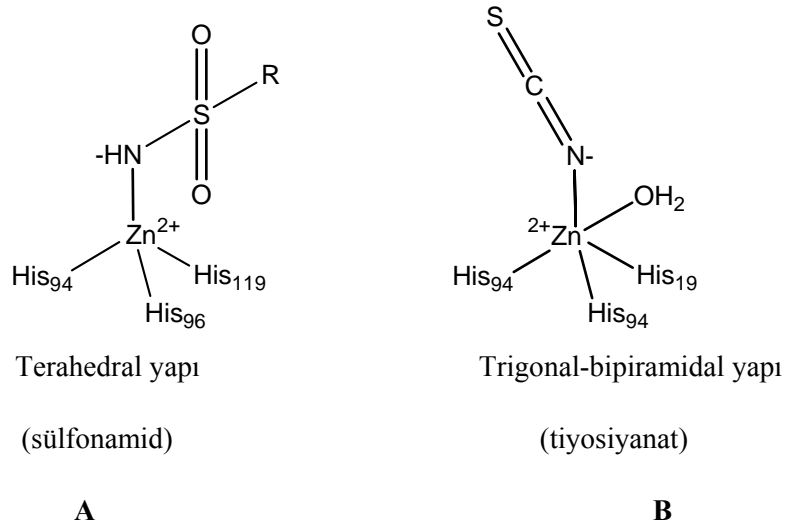


Tetrahedral yapı (süstitüsyon)



Trigonal-bipiramidal yapı (katılma)

Zn (II) iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn (II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 2. 4.A). Anyonlar ise hem metal iyonunun tetrahedral geometrisinde, hem de tiyosiyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipiramidal yapıda bağlanabilirler (şekil 2. 4.B) [45].



Şekil 2.4. Anyonik inhibitörler ve Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması

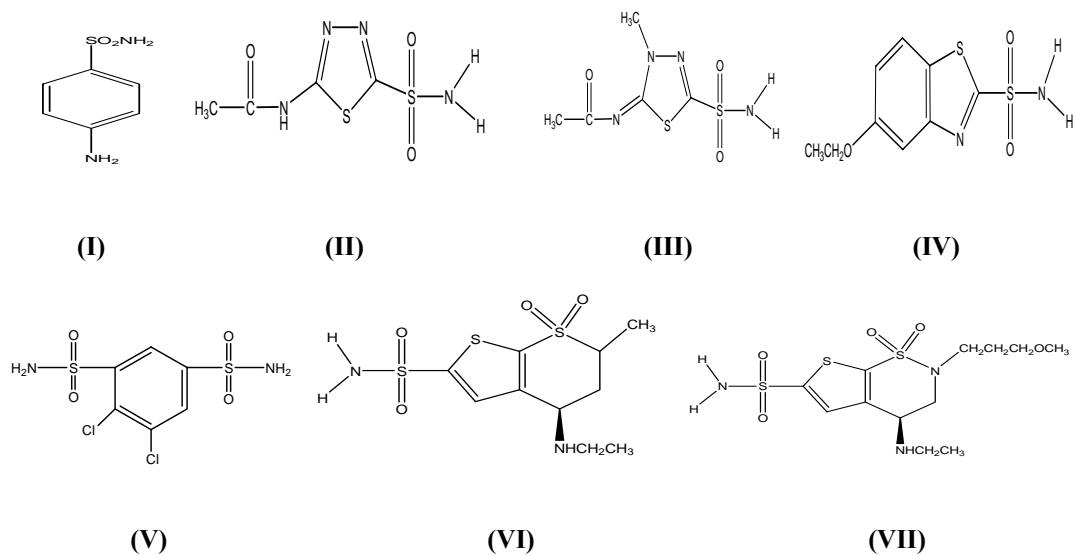
2.9. Glokom Tedavisinde Kullanılan Sülfonamidler

Glokom, retinadaki ganglion hücrelerin ölümü ile göz sinirlerinin bozulduğu ve görme kaybı ile sonuçlanan bir hastalıktır [53]. Glokom, Dünya’da ve ABD’de en çok görme bozukluğuna ve körlüğe sebep olan bir hastalıktır [54, 55, 56]. ABD 'de körlerin % 10-11'i bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir [57].

Glokom hastalığının gelişmesinde büyük bir risk faktörü olan yüksek göz içi basıncının oluşmasını engelleyen göz içi basıncı (intraocular pressure, IOP) 'nın düşürülmesi yöntemi, glokom hastalığı tedavisinde önemli bir yer almaktadır. Ve hastalığın fazla ilerlememiş durumları için uygulanabilen geçerli bir metottur [58, 59, 60, 61]. Glokom tedavisinin temel amacı optik sinir başı hasarını ve buna bağlı gelişen görme alanı kayıplarını önlemektir. Optik sinir hasarının gelişiminde göz içi basıncının artışının yanı sıra diğer bir çok faktörün rolü olmasına rağmen uygulanan tedavi yöntemlerinin büyük bir bölümü göz içi basıncını düşürmeye yöneliktir [62, 63]. Glokomda diğer risk faktörleri; yaş, soy, diyabet, sistemik hipertansiyon, çeşitli miyop hastalıkları ve kalıtım yolu ile aktarılması sıralanabilir.

Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyonu yolu ile glokomlu hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir [53]. Bu yüzden karbonik anhidraz inhibitörleri yüksek IOP'yi düşürmek için yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Çünkü göz içi sıvısının salgılanması silyer epitelyumda bulunan bir izoenzim olan CA-II tarafından HCO_3^- 'in üretimine bağlıdır [64].

Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri (I) 1940 yılında Mann ve Keilin sentezlemiştir. Glokom tedavisinde kullanılan sistemik bileşikler 4 çeşittir. Bu bileşikler asetazolamid (II), metazolamid (III), etokzolamid (IV) ve diklorfenamid (V) bileşikleridir. Bu bileşikler etkilerini, silyer epitel enzimlerini (HCA II ve HCA IV) inhibe ederek göz içi basıncının düşürülmesiyle gösterirler [65, 66].



Şekil 2.5. Glokom tedavisinde kullanılan bileşiklerin şekilleri

Sistemik CA inhibitörleri sülfonamid türevleridir. Asetazolamid ve metazolamid glokom tedavisinde uzun süredir kullanılmaktadır [67]. Metazolamid bileşiğinin etkisi diğer karbonik anhidraz inhibitörlerinden daha düşük ancak daha iyi tolere edilmektedir.

Sentetik CA inhibitörleri güçlü oküler hipotansif ajanlar olmalarına rağmen, bazen ölümcül sistemik ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımları azalmıştır. Sentetik CA inhibitörü kullanan 18,000 kişiden 1'inde aplastik anemi ortaya çıkmakta ve %50'si ölümlü sonuçlanmaktadır [68, 69, 70]. Çünkü bu reaksiyonlar doğada kendilerine has bir olaydır [68, 69]. Bundan dolayı hangi hastada gelişeceğini tahmin etmek mümkün değildir.

Diklorfenamid bileşiği, asetazolamid bileşiğinin yan etkilerinden daha düşük yan etkili inhibitör bulma çalışmaları sonucunda üretilmiştir. Ancak klinik çalışmalar ilacın asetazolamiden daha etkili olmadığını ve yan etkiler açısından da farkının bulunmadığını göstermiştir [67].

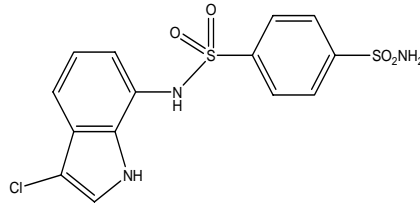
(II) ve (V) bileşikleri; mide, akciğer, böbrekler ve kandaki CA izoenzimlerini (CA I, CA II, CA IV, CA V ve CA VI), gözdeki CA izoenzimlerinden daha çok inhibe etmektedir. Bu da (II) ve (V) bileşiklerinin topikal olarak göze uygulanması gerektiğini ortaya koymuştur. Fakat (II) ve (V) bileşikleri gibi klinikte kullanılan ilaçların hiçbiri, suda çözünürlük problemlerinden dolayı etkili konsantrasyonları sağlanmadığından henüz damla haline getirilmemiş ve ağızdan alınmaktadır.

Bu yüzden yüksek IOP'yi düşürürken, CA izoenzimlerinin inhibe olmaması için, göze lokal uygulanabilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmuştur [71]. Bu sebepten dolayı ilk kez ilaç olarak kullanılmak üzere dorzolamid (VI) bileşiği sentezlenmiş ve 1995'te kliniklerde kullanılmıştır [72]. İkinci olarak da, yapı olarak dorzolamide benzeyen brinzolamid (VII) bileşiği sentezlenmiş ve 1999'da kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Bu iki ilaç (VI) ve (VII), daha önceden ilaç olarak kullanılan bileşiklerle karşılaştırıldığında; daha az yan etkisi olmakla birlikte, lokal olarak uygulanması sebebiyle gözde yalnızca istenilen CA izoenzimlerini inhibe etmektedir.

Son yıllardaki çalışmalarda ise (VI) ve (VII) bileşiklerinin de; göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur [66, 73].

Sülfonamidler, glokomda kullanılmasının yanında kanser tedavisinde, antiepileptikler ajan olarak veya nörolojik hastalıkların tedavisinde de kullanılırlar.

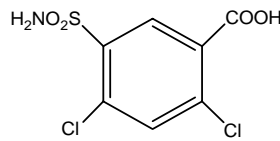
Sülfonamid türevi olan ve CA inhibitörü olarak kullanılan bir diğer bileşik ise indisulam'dır. Bu bileşik daha çok antikanser ajanı olarak kanser tedavisinde yeni ilaç olarak kullanılmaktadır [74, 75, 76].



Şekil 2.6. İndisulam bileşiğinin yapısı

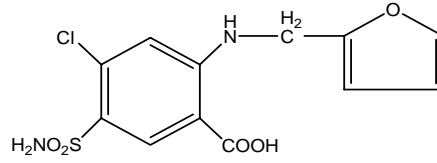
ArSO_2NH_2 'nin bir tipi olan süstitüe olmamış aromatik sülfonamidler, CA'nın güçlü inhibitörleridir. Böyle bir bileşiğin inhibisyon potansiyeli, sülfonamid grubunun N atomunun süstitüsyonuyla çok büyük oranda azaltılır. Güçlü bir yapı-aktivite korelasyonunun başlaması, kısa zamanda bazı değerli ilaçların sentezlenmesine sebep olmuştur.

Sülfamoil benzoik asit, sülfamoil diüretiklerin ve antihipertansiflerin bir bölümüdür. Bir sülfonamid türevi olan lasamid (2,4-diklor-5-sülfamoil benzoik asit), hem diüretik (antihipertansif) hem de antiviral ilaçların yanı sıra furosemid (4-klor-2-furfurilamin-5-sülfamoil-benzoik asit) sentezinde kullanılan öncü aktif ilaç maddesidir [77, 78].



Şekil 2.7. Lasamid bileşiğinin yapısı

Furosemid (4-klor-2-furfurilamin-5-sülfamoil-benzoik asit), lasamid ile furfurilaminin kondanse edilmesiyle oluşur [77, 78]. Furosemid, idrar söktürücü, hipertansiyon, anafilaktik şok, ödem, böbrek hastalıkları, kalp yetmezliği ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [79, 80]. Furosemid, yüksek diüretik etkisi, sıcaklıkla kolay ayrışması ve suda az çözünme özelliklerine sahip bir bileşiktir [81, 82].

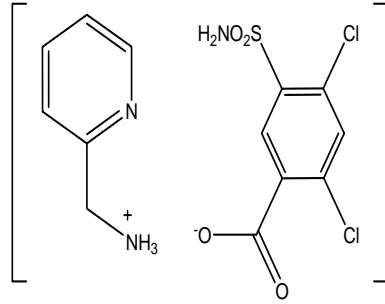


Şekil 2.8. Furosemid bileşiğinin yapısı

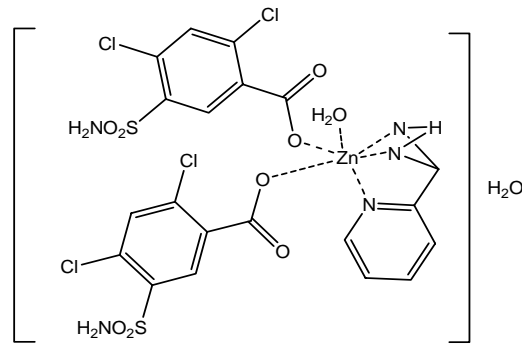
Lasamid, 270,09 molekül ağırlığına sahip beyaz kristal bir tozdur. Lasamid, gözleri, solunum sistemini ve cildi rahatsız ediyor, fakat Organik Sentez Ltd. Araştırma Enstitüsü Ekoloji, Toksikoloji ve Analitik merkezleri tarafından yapılan akut toksisite testleri temelinde tehlikeli bir madde olarak bulunmamıştır [83]. Lasamid, üretim sürecinde alerjik rinit ve astım gibi tehlikeli bir yol açabilecek gibi görünüyordu olmasına rağmen tümör hücrelerinin kemosenesitif ve nükleer reseptörü olması büyük ilgi uyandırdı [83, 84].

CA izoenzimleri, aromatik ve heterosiklik sülfonamidlerin yanı sıra inorganik metal kompleks anyonlar tarafından birçok önemli fizyolojik ve fizyo-patolojik fonksiyonları inhibe edilir. Ana sülfonamide kıyasla metal kompleksli sülfonamidler 10-100 kat daha güçlü inhibitörlerdir. Çinko (Zn) veya bakır (Cu) metali ile oluşturulan sülfonamid kompleksleri, çok iyi IOP düşürücü olarak bulundu ve glokom hastalığında kullanılan ilaçlarda sentezleri yapılmıştır [85].

Bu çalışmada; karbonik anhidraz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve daha önce sentezlenen bileşiklerin (piridin-2-ilmetanaminyum 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoat (1) ve bis(2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoat)(2-aminometilpiridin) aquaçinko(II) monohidrat (2)); glokom tedavisinde rolü olan HCA-II üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çıkış maddeleri olan 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoik asit (Hsba) ve 2-aminometilpiridin (amp) bileşikleriyle de çalışılacaktır. Bunun yanı sıra CA-I enzimi ile inhibisyon çalışmaları yapıp CA-II ile karşılaştırılacaktır. Ayrıca bu bileşiklerden inhibisyon etkisi gösterenlerin % aktivite- [I] grafikleri yardımıyla I₅₀ değerlerinin (%50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu) bulunması ve inhibisyon gösterenlerin de grafikler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin formülleri;

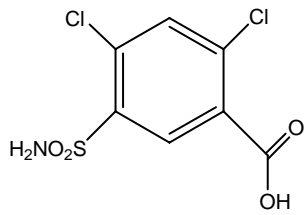


(1) piridin-2-ilmetanaminium 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoat

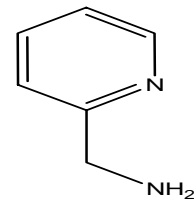


(2) bis(2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoat)(2-aminometilpiridin)aquaçinko(II) monohidrat

Çıkış maddelerinin formülleri ise;



(Hsba) 2,4-diklor-5-sülfamoilbenzoik asit



(amp) 2-aminometilpiridin

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışması için kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, trihidroksi metil aminometan (Tris), siyanojen bromür, sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, tiyonil klorür, piridin, N,N'-metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250 ve R-250 E., sodyum hidroksit ve karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

3.2. 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: UV-1700 Mod. Shimadzu Mar. + AKS

pH metre: Schott Instruments / Lab850

Peristaltik pompa: Ismater MS-4/8 Reglo digital 4 kanallı 8 tekerli

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Heidolp

Hassas terazi: Ohaus – Adventurer

Kronometre: Hanhard, Electronische Digital-Stoppuhr Germany

Otomatik Pipetler: Biohit Proline

Mağnetik karıştırıcı: Heidolp MR 3001

Çalkalayıcı: GFL

3.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

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

1. 0,05 M Tris-SO₄, pH=7,4 (esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon):

6,055 g tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N H₂SO₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

2. 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon):

16,8 g NaHCO₃, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

3. 0,0025 M veronal tamponu;

5,15 g sodyum barbitalın 900 mL suda çözülüp, pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

4. 25mM Tris-HCl/0,1 M Na₂SO₄, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon):

3,0275 g tris ve 14,2 g Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

5. 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon):

3,0275 g tris ve 3,124 g Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülüp, 1 N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

6. İzoenzimlerin elüsyonu için gerekli çözeltiler;

0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄, pH=5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenzimi ve BCA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti):

9,187 g NaClO₄ ve 2,09 g NaCH₃COO.H₂O, 120 mL destile su ile çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

0,025 M Na₂HPO₄ /1 M NaCl , pH=6,3 (kolona tutunmuş HCA-I izoenzimi elüsyonu için kullanılan çözelti)

7. CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti):

0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

8. Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):

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. Boyama çözeltisi (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.

10. Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti):

%10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

11. Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti):

%50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

12. İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen 1 ve 2 bileşikleri ile çıkış maddesi olarak kullanılan Hsba ve amp bileşiklerinin %1'lik çözeltisi; herbir bileşikten 5'er mg alınıp 5 mL suda çözülerek hazırlandı.

3.4. Yöntemler

3.4.1. Protein tayini

3.4.1.1. Kalitatif protein tayini

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

3.4.1.2. Coomassie Blue yöntemi ile 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. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [86].

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

3.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

3.4.2.1. CO₂-Hidrataz aktivitesi tayini

Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da, pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na₂CO₃+0,1 M NaHCO₃) yararlanıldı [87,88]. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c 'ye bölünmesi ile belirlendi.

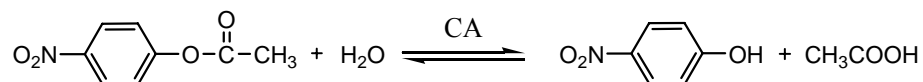
Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,1mL brom timol çözeltisi, 0,5 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymuş CO₂ çözeltileri konuldu. pH'metreden pH'ın 6,3 civarına düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t_0). 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.

$$\text{Yani; } \quad \text{EU} = (t_0 - t_c) / t_c$$

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

3.4.2.2. Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin HCA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte 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 [63,65]. Bu dalga boylarındaki *p*-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvarz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından 3 dakika sonra 25°C'de 348 nm'de absorbansı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle; 3 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'lık olup, daha derişğini hazırlamak esterin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi [89]. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı [90].

3.4.3. Afinite jelinin hazırlanması

3.4.3.1. Sepharose-4B Matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, 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 [90].

Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması: 20 mL Sepharose-4B, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi ve eşit hacimde destile su ile birleştirildi. Buz banyosu içerisinde karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna, 4 g toz haline getirilmiş CNBr eklendi. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile 11'e çıkarıldı ve reaksiyon boyunca bu pH değişmeyinceye kadar devam edildi. Karışım buchner hunisine aktararak süzüldü. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile yıkandı ve bir behere alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon 4°C'de 2 saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat bu sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen

tirozin, 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 [91, 92, 93].

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 [94].

3.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

3.4.4.1. Hemolizat eldesi

Kullanılacak kan, antikoagulanlı kan torbalarına alındıktan sonra 4 °C'de muhafaza edildi ve en çok 2 gün içerisinde kullanıldı. Eritrositleri ayırmak için kan 10 ml'lik tüplere konuldu ve 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrıldı. Sonra altta kalan eritrositler %0,9 luk NaCl çözeltisi ile birkaç defa yıkayıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositlerin hacimlerinin 1,5 misli 0 °C'deki saf su ile hemoliz edildi. Hemoliz edilen eritrositler bir araya toplanarak hemolizin tam gerçekleşmesi için yarım saat süreyle karıştırıldı. Hücre zarlarının ayrılması için hemolizat 4 °C'de 20.000 rpm'de yarım saat süreyle santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin dipine çöken hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatlice alındı. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH'sı katı Tris ile 8,7'ye getirildi. Böylece hemolizat kolona tatbik edilecek duruma geldi.

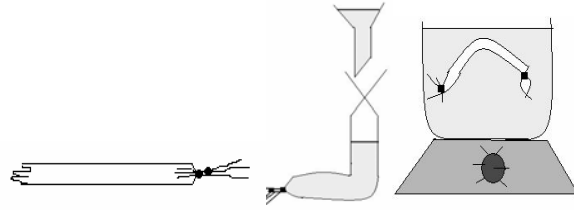
3.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

İşlemlerden geçen hemolizat kolona tatbik edilir. Tatbik işlemi bittikten sonra yıkama tamponu ilave edilir. Yıkama işlemi kanın kırmızı rengi kolondan tamamen gidinceye kadar ve yıkama tamponuna karşı 280 nm de 0,05 değerine ulaşıncaya kadar devam edilir. Bu değere ulaşıldığında sırasıyla CA-I ve CA-II enzimlerinin elüsyon çözeltileri kolondan geçirilir. Elüsyon her tüp için 5 ml şeklindedir. Elüsyondan alınan her tüpün 280 nm de absorbansına bakılır. Elüsyondan alınan tüplerin absorbansı belli bir yükselme ve düşme gerçekleştikten sonra elüsyon bitirilir. Ve elde edilen enzimlere diyaliz işlemi uygulanır.

3.4.4.3. Diyaliz işlemi

Biyolojik moleküllerin ayrımında kullanılan en eski yöntemlerden biri diyalizdir. Bu teknik seyreltik bir çözeltideki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanır. Bu

teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları 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 kadar devam eder. Dengeye ise çalışılan hacime bağlı olarak, genellikle 4-6 saatte ulaşılır. Dengeye ulaşıldıktan sonra, eğer dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Böylece, istenilen ayırım tamamlanmaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir [95].



Şekil 3.1. Diyaliz işleminin uygulanması

a) diyaliz torbasının hazırlanması, b) enzim çözeltisinin konulması, c) diyalize bırakılma

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (sellofan, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. Diyaliz 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 ortamdan uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf şekilde bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortadan kaldırmak mümkündür. Çalışmamızda elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına doldurulmuş ve 4 °C'da diyaliz tamponu kullanılarak diyaliz işlemi yapılmıştır. 24 saat boyunca işleme devam edilmiş ve her 8 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilmiştir. Diyaliz işlemleri sonucu elde edilen enzim artık kısmen saf hale getirilmiştir. Elde edilen bu enzim çözeltisi, yapacağımız diğer işlemlerde kullanılmak üzere 3'er mililitrelik tüplere konmuş ve -20 °C'da derin dondurucuda depolanmıştır [95].

3.5. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA I Ve CA II Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

3.5.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrositlerinden elde edilen CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde **Hsba, amp** ile yeni sentezlenen **1 ve 2** no'lu bileşiklerin 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 enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin % aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

3.5.2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I Ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde **Hsba, amp** ile yeni sentezlenen **1 ve 2** no'lu bileşiklerin 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, I_{50} 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 ise $0,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbans değerinin 5'e bölümü ile ortamdaki *p*-nitrofenol (*p*-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir [96].

$$p\text{-Nitrofenol konsantrasyonu} = A (O. D) / 5 \times 10^3 \text{ M}$$

$$p\text{-Nitrofenol konsantrasyonu} = A (O. D) / 5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre; 1 dakikada oluşan *p*-nitrofenol miktarını bulmak için 3'e bölünür. Toplam hacim 3 mL olduğundan

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

bulunur.

3.5.3. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin K_i sabitleriyle bulunması

K_i değerlerini bulmak için; insan eritrositlerinden afinite kromotografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde **Hsba**, **amp** ile yeni sentezlenen **1** ve **2** no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Esteraz aktivitesi için yukarıda belirtildiği gibi;

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

değeri, V (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver Burk grafiklerini çizmek için bu değerler $1/V$ değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonları $[S]$, grafikte kullanmak için $1/[S]$ değerlerine dönüştürüldü. Bu değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün CA I ve CA II enzimleri için ayrı ayrı Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden, K_M ve V_{max} değerleri bulundu. Bu değerler yarışmasız inhibitörler için kullanılan eşitlikte yerine konularak K_i değerleri hesaplandı.

$$V_{max}^i = \frac{V_{max}}{1 + [I] / K_i}$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İnsan Eritrosit CA Enzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

İnsan kanından elde edilen hemolizatlar kolona direk olarak tatbik edildi. Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işleminden sonra HCA-I, 0,025 M Na₂HPO₄ /1 M NaCl, (pH=6,3) tamponu ile HCA-II; 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH=5,6) tamponuyla elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesine bakıldı.

İnsan kanından saflaştırılan HCA enzimi için coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Enzimlerin aktivite ölçümü 1 mM substrat konsantrasyonunda ve 100 µL enzim çözeltisi ile yapılmıştır. Protein tayinleri ise, 100 µL enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Hemolizatlarda ise aktivite ve protein miktarı ölçümünde; her bir hemolizattan 1 mL alınıp, 10 mL'ye seyreltilmiş ve bundan 100 µL alınarak ölçümler yapılmıştır.

İnsan kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 0,48 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 54,3 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 54,3/0,48 = 113,13$$

olarak bulundu.

HCA-I ve HCA-II için coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi deneyleri yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltileri için mL'deki protein miktarı HCA-I için 0,34 mg ve mL'deki enzim ünitesi 102,5 EU olarak bulundu. Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 100 kat seyreltme yapıldığından aktivitesi HCA-I için 10250 EU/mL olarak bulundu. HCA-II için ml'deki protein miktarı 0,4 mg ve ml'deki enzim ünitesi 440 EU olarak bulundu. 100 kat seyreltme de hesaplamaya katıldığında HCA-II için 44000 EU/ml olarak bulunur. Buna göre;

$$\text{HCA-I için spesifik aktivite (SA)} = 10250/0,34 = 30147$$

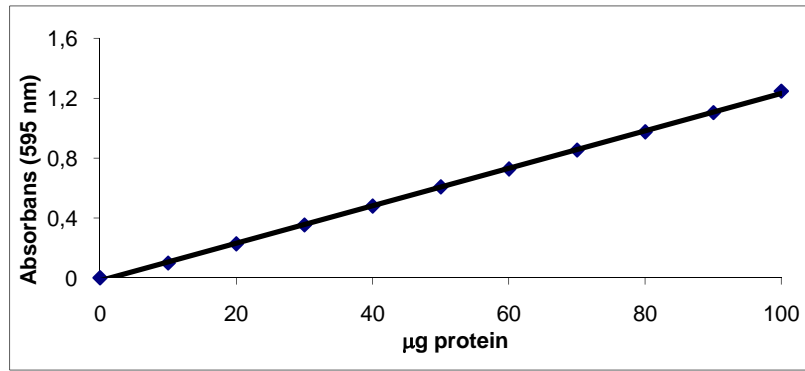
$$\text{HCA-II için spesifik aktivite (SA)} = 44000/0,4 = 110000$$

Bu değerlere göre, hemolizatın doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

$$\text{HCA-I enzimi, } 30147/113,13 = 266,5 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

$$\text{HCA-II enzimi, } 110000/113,13 = 972,33 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde önceden yapılan çalışmalar sonucunda hazırlanan standart grafikten yararlanıldı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerlerinden faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları bulundu (şekil 4.1).

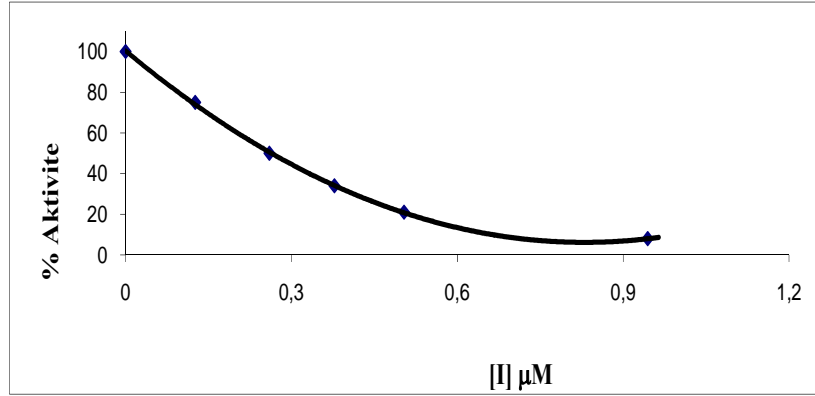


Şekil 4.1. Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik

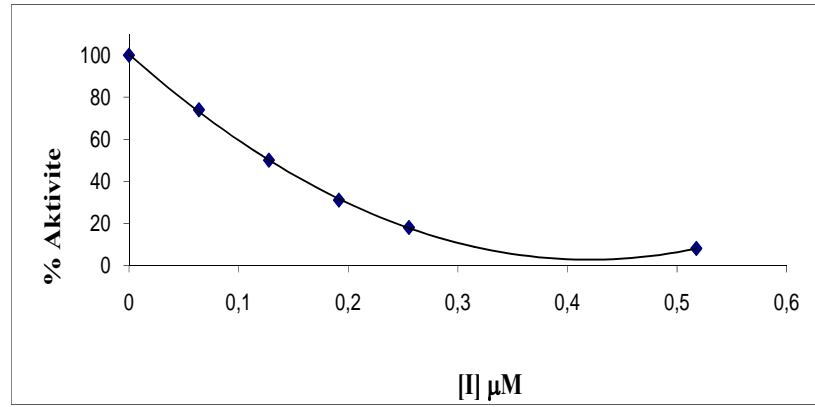
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi

4.2.1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi

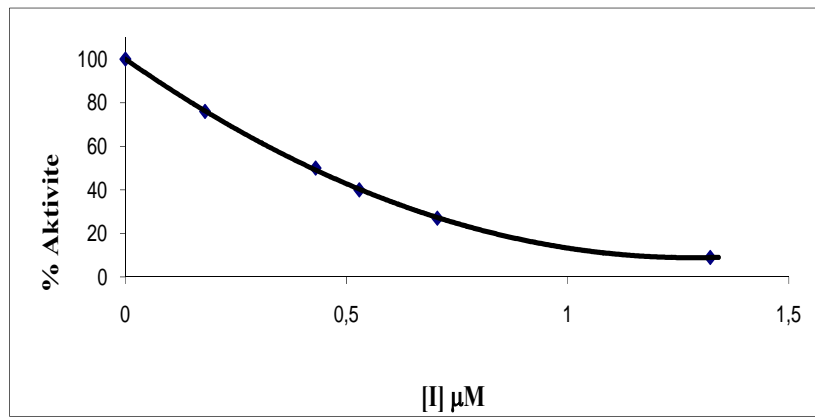
İnsan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde Hsba, amp ile yeni sentezlenen 1 ve 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek I_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4.2 mL).



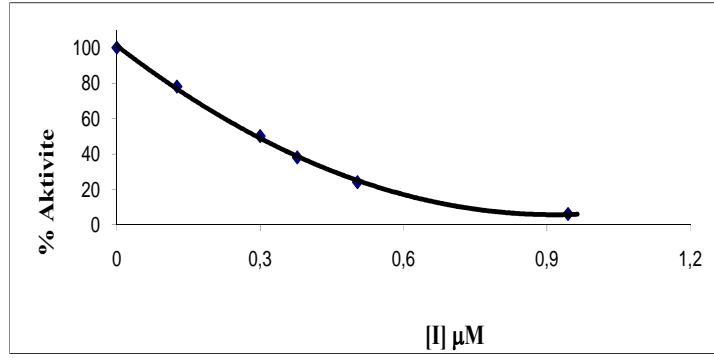
Şekil 4.2. İnsan eritrosit CA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi



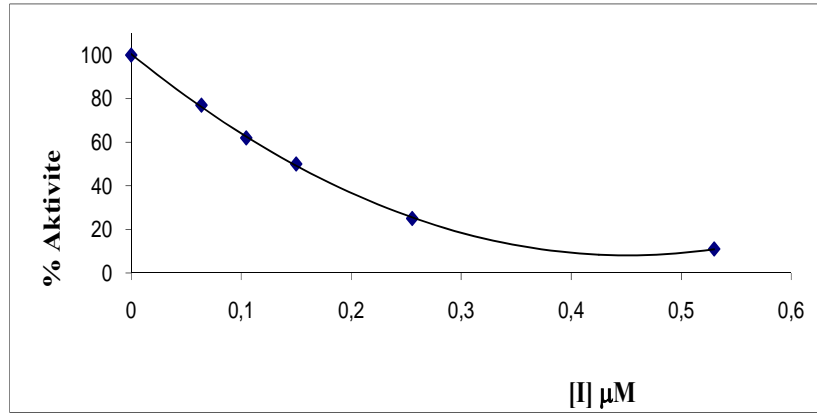
Şekil 4.3. İnsan eritrosit CA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi



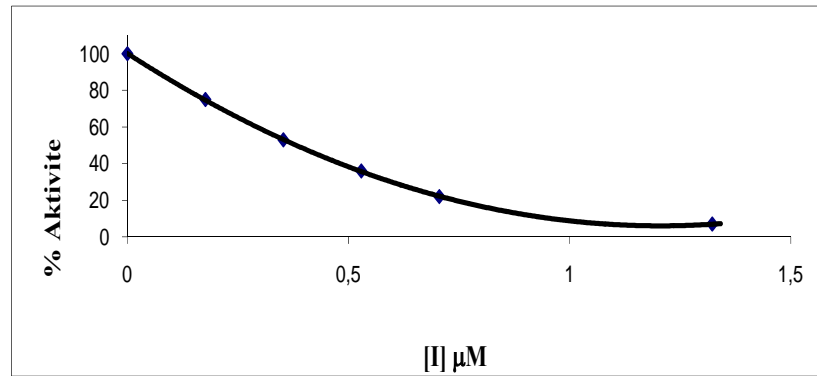
Şekil 4.4. İnsan eritrosit CA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine **Hsba** bileşiğinin etkisi



Şekil 4.5. İnsan eritrosit CA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi



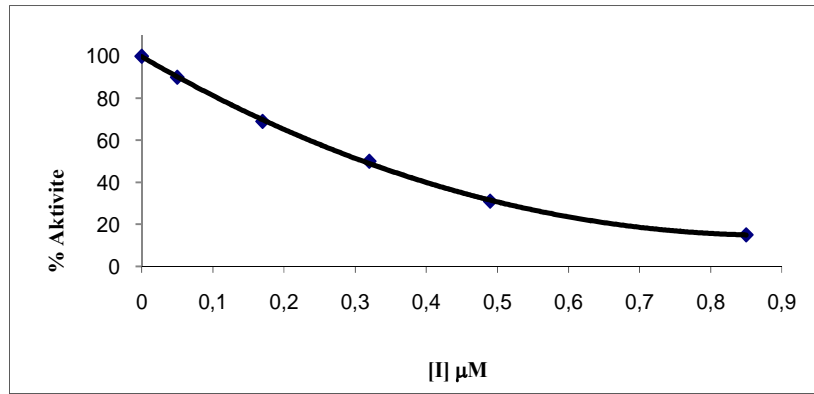
Şekil 4.6. İnsan eritrosit CA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi



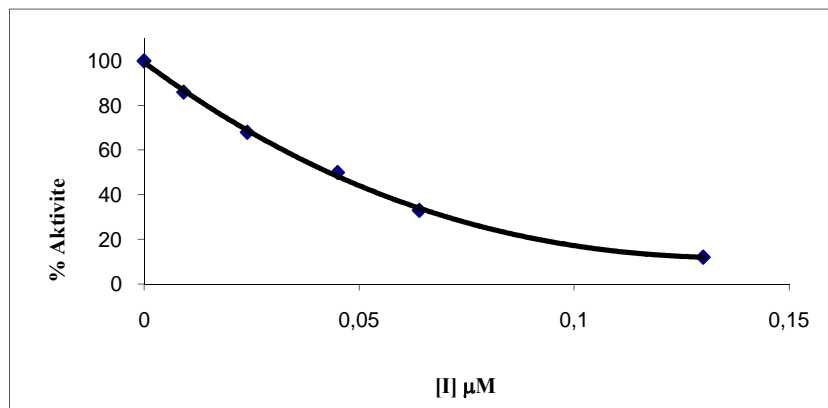
Şekil 4.7. İnsan eritrosit CA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Hsba bileşiğinin etkisi

4.2.2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin in vitro olarak incelenmesi

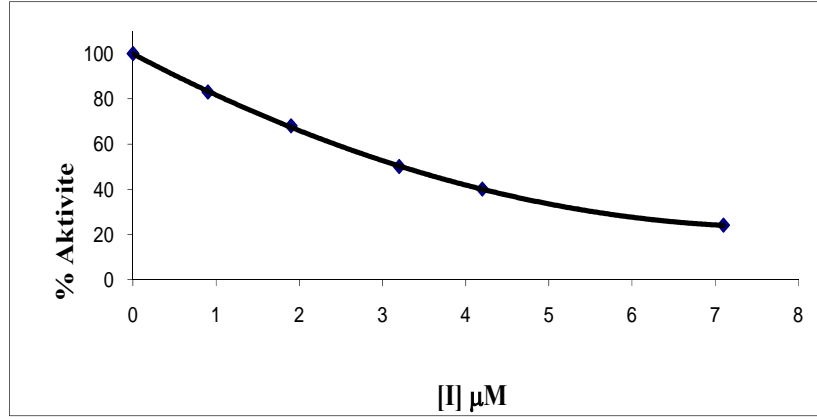
HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde Hsba, amp ile yeni sentezlenen 1 ve 2 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla insan kanından elde edilen HCA izoenzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir.



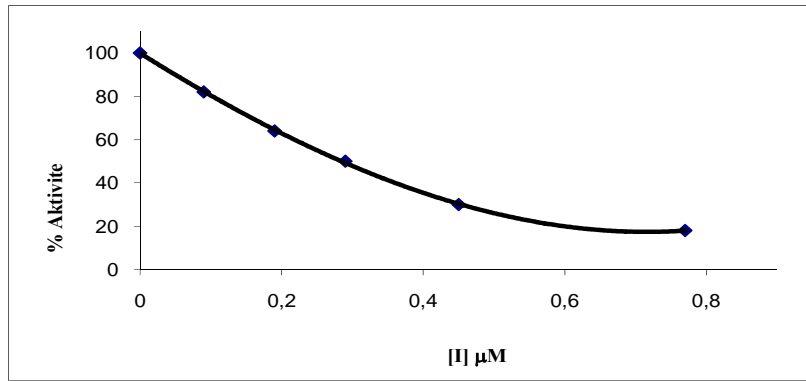
Şekil 4.8. İnsan eritrosit CA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi



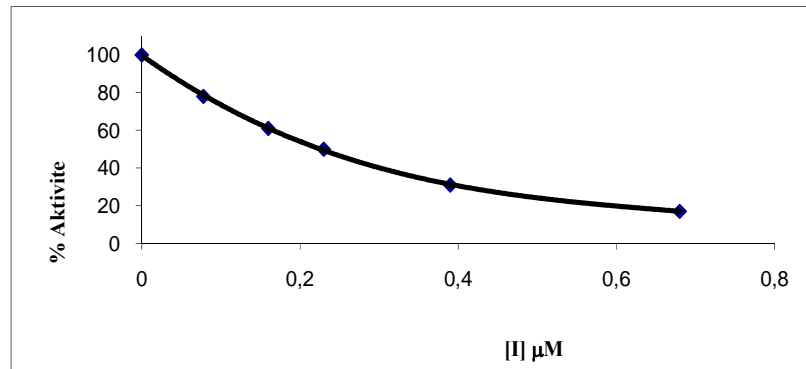
Şekil 4.9. İnsan eritrosit CA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi



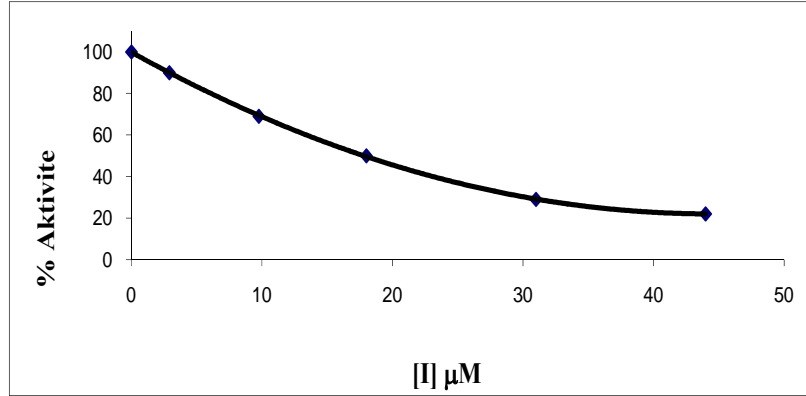
Şekil 4.10. İnsan eritrosit CA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (Hsba) bileşiğinin etkisi



Şekil 4.11. İnsan eritrosit CA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (1) bileşiğinin etkisi



Şekil 4.12. İnsan eritrosit CA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (2) bileşiğinin etkisi



Şekil 4.13. İnsan eritrosit CA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (**Hsba**) bileşiğinin etkisi

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin CO₂ hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, ve 4.7'deki grafiklerden hesaplanan I₅₀ değerleri toplu olarak Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin HCA izoenzimlerinin in vitro CO₂-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

Hidrat az I ₅₀ (µM)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
Hsba	0,43	0,38
1	0,26	0,30
2	0,13	0,15

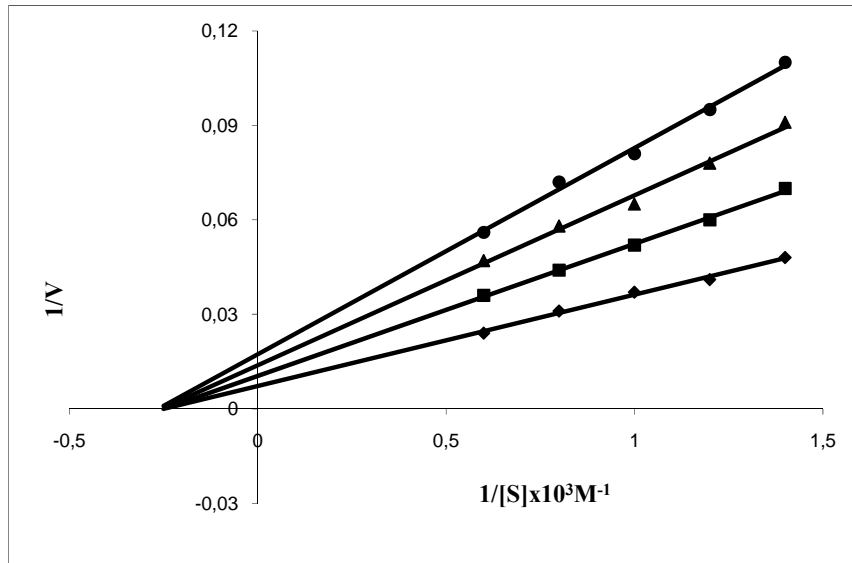
Sentezlenen inhibitörlerin eritrosit HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13'deki grafiklerden) hesaplanan I₅₀ değerleri toplu olarak Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen bileşiklerin HCA izoenzimlerinin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

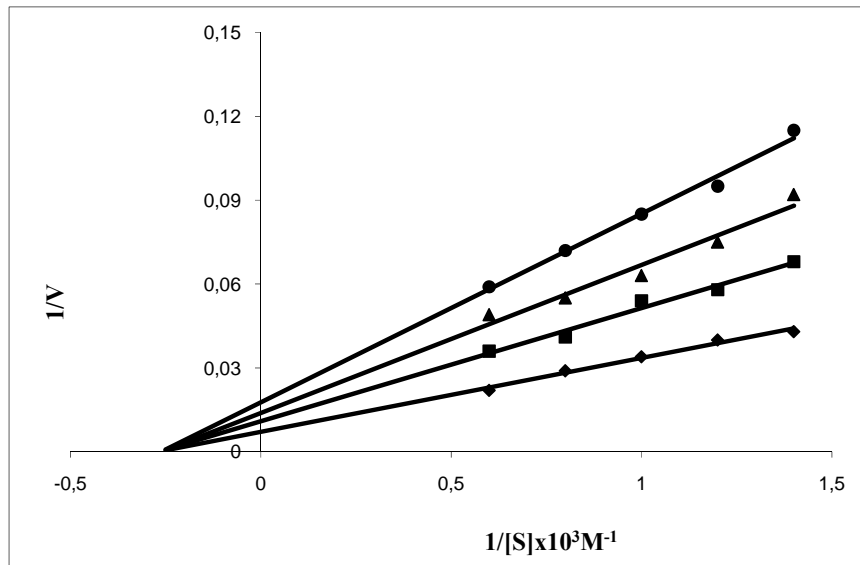
Esteraz I ₅₀ (µM)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
Hsba	3,2	18,0
1	0,32	0,29
2	0,045	0,23

4.3. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K_i Sabitlerinin Bulunması

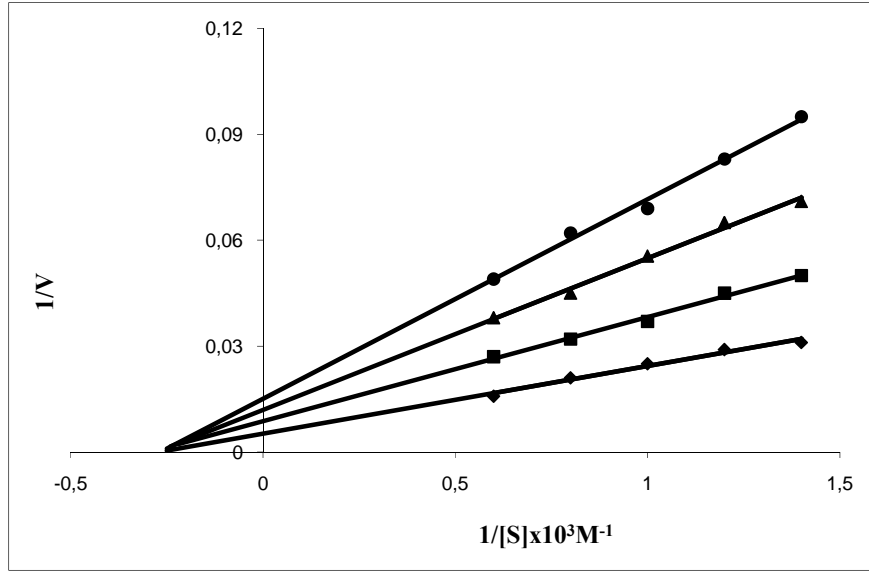
İnhibitör çalışmaları için sentezlenen 1 ve 2 no'lu bileşikler ile çıkış maddeleri olan Hsba ve amp bileşikleri kullanıldı. Bunun için inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla 3. 5. 2 ve 3. 5. 3 bölümlerinde anlatıldığı şekilde hazırlanan 3 mM'lık p-nitrofenilasetat çözeltisinden istenilen konsantrasyonu sağlayacak şekilde tüplere 5 farklı miktarda ilave edildi. Bütün tüplerin toplam hacmi 1,9 mL olacak şekilde saf su veya inhibitör çözeltisi eklendi. Daha sonra her tüpe 1 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) ve 0.1 mL enzim ilave edilip, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 348 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü. Kullanılan çözelti miktarları ve buna karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları çizelgede verilmektedir. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda değişik substrat konsantrasyonlarında 348 nm'de ölçülen absorbans değerleri, kullanılan aktivite birimi (reaksiyon hızı) µmol/dakika cinsinden bölüm 3. 5. 2'de belirtildiği şekilde bulundu. Bütün inhibitörler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak; 1/V-1/S değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı.



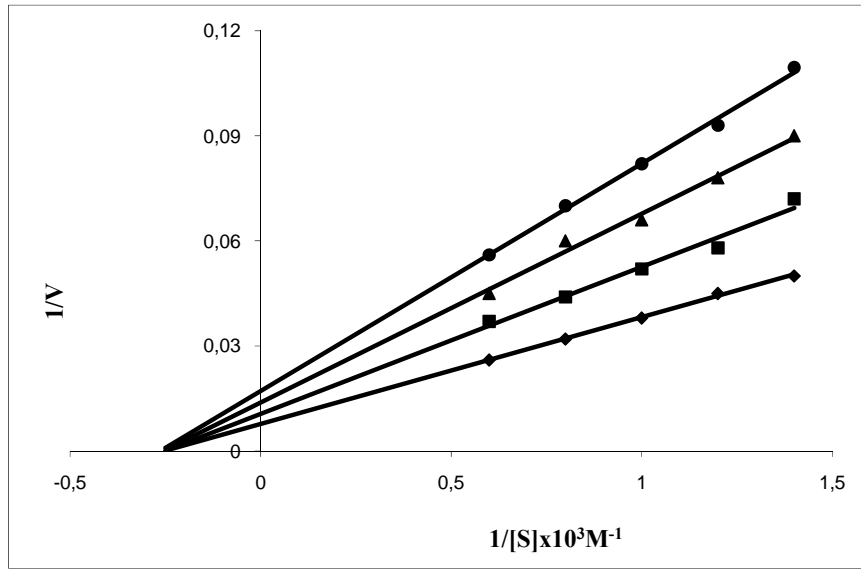
Şekil 4.14. İnsan eritrosit CA-I enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



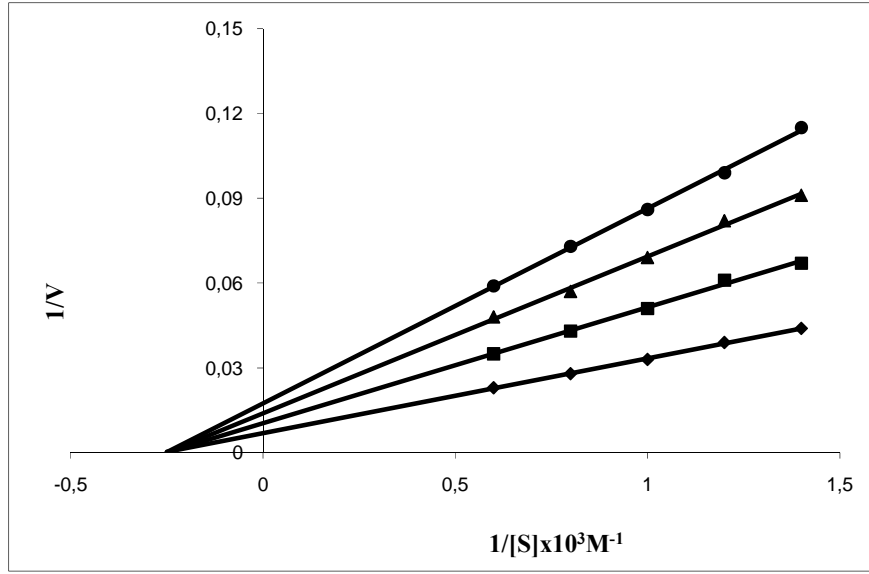
Şekil 4.15. İnsan eritrosit CA-I enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



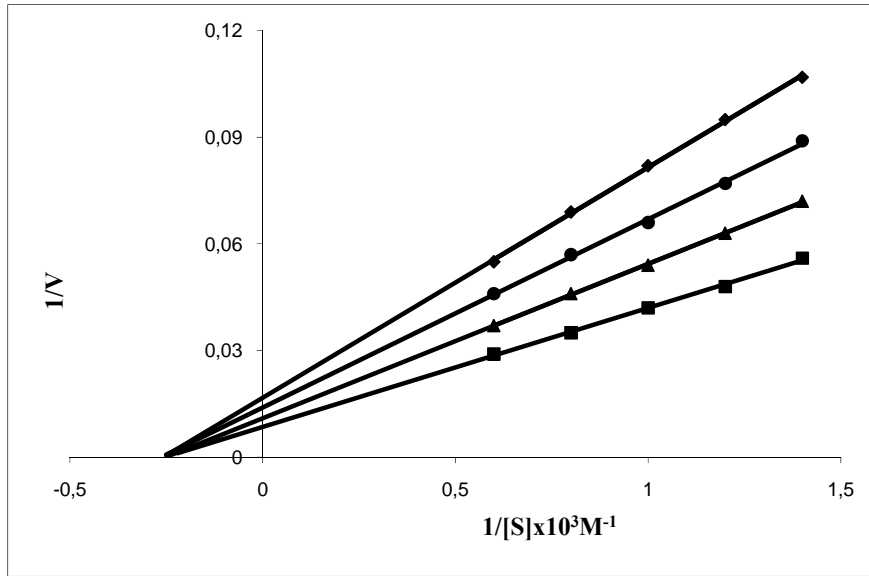
Şekil 4.16. İnsan eritrosit CA-I enzimi üzerinde (Hsba) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.17. İnsan eritrosit CA-II enzimi üzerinde (1) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.18. İnsan eritrosit CA-II enzimi üzerinde (2) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.19. İnsan eritrosit CA-II enzimi üzerinde (Hsba) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.3. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

HCA-I İÇİN SONUÇLAR				
İnhibitör	[I] (M)	K_i (M)	Ortalama K_i (M)	İnhibisyon Türü
Hsba	$2,67. 10^{-6}$	$3,96. 10^{-6}$	$7,71. 10^{-6}$	Yarışmasız
	$6,67. 10^{-6}$	$5,17. 10^{-6}$		
	$2,67. 10^{-5}$	$1,40. 10^{-5}$		
1	$4,75. 10^{-8}$	$1,07. 10^{-7}$	$2,53. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$1,90. 10^{-7}$	$2,08. 10^{-7}$		
	$6,18. 10^{-7}$	$4,41. 10^{-7}$		
2	$2,46. 10^{-8}$	$3,60. 10^{-8}$	$5,79. 10^{-8}$	Yarışmasız
	$9,87. 10^{-8}$	$6,90. 10^{-8}$		
	$1,48. 10^{-7}$	$6,87. 10^{-8}$		
HCA-II İÇİN SONUÇLAR				
İnhibitör	[I] (M)	K_i (M)	Ortalama K_i (M)	İnhibisyon Türü
Hsba	$6,67. 10^{-7}$	$1,22. 10^{-6}$	$2,28. 10^{-5}$	Yarışmasız
	$4. 10^{-6}$	$1,08. 10^{-5}$		
	$1,33. 10^{-5}$	$5,64. 10^{-5}$		
1	$4,76. 10^{-8}$	$1,11. 10^{-7}$	$2,15. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$9,52. 10^{-8}$	$1,04. 10^{-7}$		
	$5,71. 10^{-7}$	$4,30. 10^{-7}$		
2	$1,48. 10^{-7}$	$2,46. 10^{-7}$	$2,43. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$2,46. 10^{-7}$	$1,88. 10^{-7}$		
	$5,92. 10^{-7}$	$2,96. 10^{-7}$		

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidrolizaz E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimidir [10]. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda CO_2 'in hidrasyon ve HCO_3^{-} 'in dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.

CA'nın bol miktarda bulunduğu dokulardan biri gözdür. Gözde büyük oranda lens, silyer epitel ve korneada CA enzimleri bulunmaktadır. CA'nın buradaki önemi, glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Dönüşümsüz körlüğe sebep olan glokom, anormal derecede yüksek göz içi basıncıyla (intraocular pressure, IOP) ortaya çıkmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Humor aközün salgılanmasında, karbonik anhidraz enziminin uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile; silyer epitelinin salgı aktivitesi %25-30 oranında azalmaktadır. Bu sebepten dolayı CA inhibitörleri altmış yıldır glokom tedavisinde kullanılmaktadır [66].

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. Bunun için sülfonamid türevi olan Hsba (2,4-diklor-5-sülfamoil benzoik asit) bileşiği ile amp (2-aminometilpiridin) bileşiği arasında meydana gelen reaksiyonlar sonucunda yeni CA inhibitörleri sentezlendi.

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen (1) ve (2) bileşikleri ile çıkış maddesi olarak kullanılan Hsba ve amp bileşiklerinin insan karbonik anhidraz enzimi (HCA I ve HCA II) üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Enzim aktivitesi tayini için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birincisi hidrataz aktivitesidir. Bu yöntemle CO_2 'nin H_2O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H_2CO_3 'ün H^+ ve HCO_3^{-} iyonlarına ayrışarak ortamın pH' sını değiştirme süresi ölçülmektedir. Bu aktivite tayininde yarışmalı inhibisyon türü gözlenmektedir. Bunun nedeni karbondioksit molekülü direkt Zn^{+2} 'ye bağlı OH grubuna bağlanmaktadır. Sülfonamid inhibitörleri de aynı bölgeye bağlanacağından inhibitörle substrat enzime bağlanma konusunda yarış halindedir. İkinci yöntem ise esteraz aktivitesi ölçümüdür. Bu yöntemin esası karbonik anhidraz enziminin ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır. CA

enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede I_{50} değerleri kullanılmaktadır. İnsan CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (1) ve (2) no'lu bileşikler ile çıkış maddesi olarak kullanılan Hsba ve amp'nin 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 HCA enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı.

Sentezlenen (1) ve (2) no'lu bileşikler ile çıkış maddesi olarak kullanılan Hsba ve amp'nin HCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda çizilen %Aktivite-[I] μM grafiklerinden bulunan I_{50} değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

Hidrataz I_{50} (μM)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
Hsba	0,43	0,38
amp	Inhibisyon yok	Inhibisyon yok
1	0,26	0,30
2	0,13	0,15

HCA enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde (1), (2) no'lu bileşikler ile çıkış maddeleri olan Hsba ve amp'nin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildi. Daha sonra inhibisyon gösteren bileşikler için; insan kanından saflaştırılan eritrosit HCA enzimi için, beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı.

Sentezlenen (1), (2) no'lu bileşikler ile çıkış maddeleri olan Hsba ve amp'nin HCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi in vitro esteraz aktivite ölçümleri sonucu çizilen %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen I_{50} değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

Esteraz I_{50} (μM)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
Hsba	3,2	18,0
amp	Inhibisyon yok	Inhibisyon yok
1	0,32	0,29
2	0,045	0,23

Çalışmalar sonucunda (1) ve (2) no'lu bileşiklerin HCA-II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri (sırasıyla 0,30 ve 0,15 μM) olarak bulunmuştur. HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri ise (sırasıyla 0,26 ve 0,13 μM) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimi üzerinde (1) ve (2) no'lu bileşiklerin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilir aday inhibitörler olduğunu teyid etmektedir. (1) ve (2) no'lu bileşiklerin HCA-II esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri (sırasıyla 0,29 ve 0,23 μM) olarak bulunmuştur. HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri ise (sırasıyla 0,32 ve 0,045 μM) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimi üzerinde (1) ve (2) no'lu bileşiklerin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilir aday inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin çizelge 4.7'deki sonuçlara göre HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, (1) bileşiği için ($K_i = 2,53 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) ve (2) bileşiği için ($K_i = 5,79 \cdot 10^{-8}$)'dir. HCA-II üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde ise (1) bileşiği için ($K_i = 2,15 \cdot 10^{-7}$) ve (2) bileşiği için ($K_i = 2,43 \cdot 10^{-7}$)'dir.

Bu değerlere göre (1) ve (2) bileşikleri çıkış maddelerine göre HCA enzimleri üzerinde daha iyi inhibisyon etkilerine sahiptirler ve glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday bileşiklerdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Harper, H., Enzymes. Review of physiological chemistry. Californiyalos Altos 15th Edition. P 126-172, 1975.
- [2] Bingöl, G., Biyokimya. Güven Matbaası, 285, 1983.
- [3] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s, 1997.
- [4] Keha, E. E. ve Küfrelioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s., 2004.
- [5] Dikmen, N. ve Özgünen, T., Harper Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 928s., 2004.
- [6] İnan, Y. ve Gül, M., Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s., 2001.
- [7] Keha, E.E.ve Küfrelioğlu, Ö.İ., Biyokimya. Şafak Yayınları, Erzurum, 97-125, 2000.
- [8] Gilbert, H.F., Basic Concepts in Biochemistry. Mc Graw-Hill Inc., 81, 1992.
- [9] Telefoncu, A., Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayını, İzmir, 59, 1986.
- [10] Arslan, O., Biyomoleküler Teori ve Uygulamaları, 117 s., 2003.
- [11] Lindskog, S., Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. Pharma col. Ther.74, 1-20 p., 1997.
- [12] Van Slyke, D. O. and Hawkins, J. A., Studies of gas and electrolyte equilibria in blood. XVI. The evalutaion of carbon dioxide from blood and buffer solutions. J. Biol. Chem., 80, 265 p., 1930.
- [13] Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. W., Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. J. Physiol., 80, 113 p., 1933.
- [14] Daveport, H. W., Wilhelmi, A.E., Renal carbonic anhydrase Proc. Soc. Exp. Biol. Med.48, 53, 1941.
- [15] Daveport, H. W., Carbonic anhydrase in tissues other than blood. Physiol. Rev. 26, 560 p., 1946.
- [16] Common, R. H., The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct. J. Agric. Sci., 31, 412 p., 1941.
- [17] Supuran, C.T and Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors. Curr. Med.Chem., 1, 61-97, Italy, 2001.
- [18] Chegwiddden, W.R., Dodgson, S.J. and Spencer, I.M., In The Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 343-363, 2000.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [19] Maren, T. H., Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p., 1967.
- [20] Pocker, Y. and Sarkanen, S., Carbonic anhydrase; Structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in Enzymology*, 49, 149, 1979.
- [21] Pocker, Y., Joan, S. Y., Plant carbonic anhydrase. Hydrase activity and its reversible inhibition *Biochem.*, 13, 5116, 1974.
- [22] Hewett-Emmett, D., In *The Carbonic Anhydrase-New Horizons*. BirkhauserVerlag, Basel, 29-78, 2000.
- [23] Sugrue, M.F., *Progr. Ret. Eye Res.*19, 87, 2000.
- [24] Ren, X and Lindskog, S., Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase I. *Biochim. Biophys. Acta.*,1120, 81-86, 1992.
- [25] Sly, W.S. and Hu, P.Y., Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*,67, 375-401, 1995.
- [26] Renzi, G., Scozzafava, A. And Supuran, C.T., Carbonic Anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incorporating Secondary Amine Moieties. *Bioorg. Med. Chem.*, Italy,10, 673-676, 2000.
- [27] Maren, T.H., Conroy, C.W., Wynns, G.C. and Godman, D.R., Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, USA, 280, 98-104, 1997.
- [28] Cabiscol. E. and Levine. R.L., The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA,93, 4170-4174, 1996.
- [29] Engberg, P. et al., Purification and some properties of carbonic anhydrase from bovine skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 241,628-638, 1985.
- [30] Spicer, S. S.; Ge, Z. H., Tashian, R. E., Hazen-Martin, D.J. and Schulte, B.A., Comparative distribution of carbonic anhydrase isozymes III and II in rodent tissues. *Am. J. Anat.*,187, 55-64, 1990.
- [31] Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L. and Sly, W.S., Carbonic anhydrase IV: role of removal of C-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme activity. *Arch.Biochem.Biophys.*,320, 315-322, 1995.
- [32] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K. F. and Lynch,C. J., Differentiation-dependent expression of CA and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB J*,10, 481-490, 1996.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [33] Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C. H. and Tashian, R. E., Expression of carbonic anhydrase of mouse VII in E.Coli and demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 226, 268-272, 1996.
- [34] Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B. H. and Lindskog, S., Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Lett.*, 398, 322-325, 1996.
- [35] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 p., 1989.
- [36] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137 p., 1966.
- [37] Scher, A. and Dietsch, P., 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, 1984.
- [38] Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Goodman, m., On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and II. *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, volume 7: *Molecular Structure and Regulation*, 79, 100, Alan R. Liss Inc. New York, 1983.
- [39] Hewett-Emmett, D. and Tashian, R. E., Functional diversity, concervation, and convergence in the evulation of α , β and γ carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.* 5:50-77, 1996.
- [40] Lesburg, C. A. and Christianson, D. W., X – ray crystallaographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117 6368-6844 p., 1995.
- [41] Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipis, P. J., Silverman, D. N. and Christianson, D. W., Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase. V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92, 10949 – 10953 p., 1995.
- [42] Björkbacka, H., Johansson, I. M. , Skarfstad, E. and Formsan, C., The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochem*, in press, 1997.
- [43] Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G. and Rees, D. C., A left handed β -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*. *EMBO J* 15; 2323-2330 p., 1996.
- [44] Stams, T., Chen, Y., Boriack – Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P. and Christianson, D. W., *Protein Sci.*, 7, 556 p., 1998.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [45] Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001 p., 1996.
- [46] Maren, T. H. and Conroy, C. W., A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p., 1993.
- [47] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p., 1998.
- [48] Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., Esterease activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221 p., 1967.
- [49] Lindskog, S., Carbonic anhydrase. In *Advances in horganik Biochem.*, 4, 115-170. Liljas. A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue. Y., Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p., 1982-1984.
- [50] Mangani, S. and Hakansson, K., Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions. *Eur. J. Biochem.* 210: 867-871 p., 1992.
- [51] Simonsson, I. and Lindskog, S., The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.* 123 : 29-36 p., 1982.
- [52] Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. and Liljas, A., Structure of native and apo carbonic anhydrase II. *J. Mol. Biol.* 227 : 1192-1204 p., 1992.
- [53] Flammer J, Orgu" I S, Costa VP, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.*; 21:359—93, 2002.
- [54] Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC, et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.*; 122(4):477—85, 2004.
- [55] Friedman DS, Wolfs RC, O'Colmain BJ, et al. Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States. *Arch Ophthalmol.*;122(4):532-8, 2004.
- [56] Shaarawy T, Flammer J, Haefliger IO. Reducing intraocular pressure: is surgery better than drugs? *Eye.*;18(12):1215-24, 2004.
- [57] Chiou, C. Y., *Biochem. Pharm.*, 30, 103 p., 1981.
- [58] Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, et al. The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.*;120(6):701--13, discussion 829-30, 2002.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [59] Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, et al. Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. *Ophthalmology.*; 108(11):1943-53, 2001.
- [60] Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, et al. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol.*; 120(10):1268-79, 2002.
- [61] Leske MC, Heijl A, Hussein M, et al. Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol.*; 121(1):48-56, 2003.
- [62] Ritch R., Shields MB, Krupin T. Chronic open angle glaucoma: treatment. In: *The glaucomas.* Ritch R., Shields MB, Krupin T, eds. Sec edition. St Louis: Mosby, 1507-17, 1996.
- [63] James B. Blood flow in the pathogenesis of glaucoma. *Current opinion in ophthalmology*, 4:65-72,1993.
- [64] Rassam SM, Patel V, Kohner EM. The effect of acetazolamide on the retinal circulation. *Eye.*; 7:697-702, 1993.
- [65] Maren, T. H., Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p., 1967.
- [66] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1, 3, 4 – thiadiazole – 2 sulfonamide derivatives as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 867 – 874 p., 2000.
- [67] Taşkesen, M., Glokom tedavisinde kullanılan yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi. Yüksek lisans tezi, Harran Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, 2002.
- [68] Shapiro S, Fraunfelder FT. Acetazolamide and aplastic anemia. *Am. J Ophthalmol.* 113:328-330, 1992.
- [69] Fraunfelder FT, Meyer SM, Bagby GC Jr, Dreis MW. Hematologic reactions to carbonic anhydrase inhibitors. *Am. J Ophthalmol.* 100:79-81, 1985.
- [70] Keisu M, Wiholm BE, Ost A, Mortimer O. Acetazolamide-associated aplastic anaemia. *J Intern Med.* 228:627-632, 1990.
- [71] Maren, T. H. and Janskowska, L., Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. *Cur. Eye. Res.*, 4, 399 p., 1985.
- [72] Sugrue, M. F., The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, 363-376 p., 1996.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [73] Conroy, C. W., Sulfonamides do not reach the retina in therapeutic amounts after topical application to the cornea. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 13, 465 – 472 p., 1997.
- [74] Scozzafava, A.; Owa, T.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C.T. Anticancer and antiviral sulfonamides. *Curr. Med. Chem.*, 10, 925-953, 2003.
- [75] Pastorekova, S.; Casini, A; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Pastorek, J.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: The first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 869-873, 2004.
- [76] Pastorekova, S.; Pastorek, J. Cancer-related carbonic anhydrase isozymes. In *Carbonic anhydrase - Its inhibitors and activators*; Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J., Eds.; CRC Press: Florida, USA, pp. 253-280, 2004.
- [77] V. V. Avidon, M.G. Pleshakov, *Pharm. Chem. J.* 3, 144, 1969.
- [78] A. Lebedev, L.I. Mironova, M.G. Pleshakov, A.K. Matveeva, I.A. Timokhina, *Pharm. Chem. J.* 697, 19, 1985.
- [79] J. B. Puschett, *Am. J. Med. Sci.* 31, 1, 2000.
- [80] Y.T. Su, H.I. Chang, S.K. Shyue, S.L. Hsu, *Biochem. Pharmacol.* 70, 229, 2005.
- [81] M. A. F. Gadalla and A. A. Ismail, *Pharmazie*, 36, 553, 1981.
- [82] W. A. Ritschell, A. Menon, and A. Sakr, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 13, 629, 1991.
- [83] P. Klusáčková, J. Lebedová, D. Pelclová, K. Šalandová, Z. Šenholdová, T. Navrátil, *Scand. J. Work Environ. Health* 74, 33, 2007.
- [84] P. C. Brooks, D. Morais, L. Liebes, D. Rodrigues, WO/2005/070024.
- [85] Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 13. Complex-type mechanism-based inhibitors. *Rev Roum Chim*, 37:849–855, 1992.
- [86] Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 p., 1976.
- [87] Maren, C. H., A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26 p., 1960.
- [88] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., Development and pharmacological characterization of carbonic anhydrase activity. *J. Pharm. And Toxicol. Meth.*, 38, 169-172 p., 1998.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [89] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137 p., 1966.
- [90] Kohn, J. and Wilchek, M. A., Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 7, 14 p., 1978.
- [91] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Tr. J. of Med. Sci.*, 27, 559 p., 1997.
- [92] Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoğlu, B., Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 515 – 518 p., 1997.
- [93] Laemmli, D. K., Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680 p., 1970.
- [94] Cuatrecasas, P., Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 p., 1970.
- [95] Temizkan, G. ve Arda, N., Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri, 2004.
- [96] Tozlu, İ., Eritrositlerinden Afinitite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van, 1997.