

5-AMİNO-1, 3, 4-TİYADİAZOL TÜREVLERİNİN
İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE
İNİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hülya GÜLERYÜZ

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Şubat-2009

5-AMİNO-1, 3, 4-TİYADİAZOL TÜREVLERİNİN
İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE
İNİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hülya GÜLERYÜZ

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

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Şubat-2009

KABUL VE ONAY SAYFASI

Hülya GÜLERYÜZ' ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “5-Amino-1, 3, 4-Tiyadiazol Türevlerinin İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ / 2009

İmza:

Üye :

Üye :

Üye :

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2009 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr.Atalay KÜÇÜKBURSA
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

5-AMİNO-1, 3, 4-TİYADİAZOL TÜREVLERİNİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hülya GÜLERYÜZ

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2009

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

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

Bu amaçla önce insan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I, HCA-II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırıldı.

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin (11, 12, 13) insan eritrosit HCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalanıldı. HCA'nın hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerinde 11, 12, 13 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 11, 12 ve 13 bileşiklerinin I_{50} değerleri (enzimli reaksiyon süresini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); HCA-II için $0,8 \cdot 10^{-7}$ ile $1,09 \cdot 10^{-7}$ M arasında bulundu. p-Nitrofenil asetatı hidroliz aktivitesi olan esteraz aktivitesine göre ise; HCA-II için $1,0 \cdot 10^{-7}$ ile $3,2 \cdot 10^{-7}$ M arasında I_{50} değerleri bulundu.

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

**THE INVESTIGATION OF THE INHIBITION EFFECTS OF 5 – AMINO -1, 3, 4-
THIADIAZOLE DERIVATIVES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ENZYME**

Hülya GÜLERYÜZ

Chemistry, M. S. Thesis, 2009

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

In this study, new carbonic anhydrase inhibitors's effects on carbonic anhydrase enzyme as candidates for treatment of glaucoma were investigated.

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

Later, inhibition effects of these new compounds (11, 12, 13) on human carbonic anhydrase enzymes (HCA) 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 (11, 12, 13) compounds show inhibition effect on HCA hydratase and esterase activity. I_{50} values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For CO_2 -hydratase activity compounds of (11), (12), (13)inhibition effect ranged from $0,8 \cdot 10^{-7}$ to $1,09 \cdot 10^{-7}$ M for HCA-II with I_{50} (molarity of inhibitor producing a %50 inhibition of CA activity).As for esterase activity of p-nitrophenyl acetate, (11), (12), (13) compounds had inhibition ranging from $1,0 \cdot 10^{-7}$ to $3,2 \cdot 10^{-7}$ M for HCA-II with I_{50} .

Key Words: Glaucoma, I_{50} Values, Carbonic Anhydrase, 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 desteğini ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm, Kimya Bölümünün değerli öğretim elemanlarına , yüksek lisans arkadaşlarıma, analizlerin yapımı sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Erhan Başer'e, Haris Akbaş'a, Başak Gökçe'ye, Barış Seçkin Arslan'a, Samet Mert'e ve Hatice Günhan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca hayatım boyunca yanımda olup beni her zaman destekleyen, bugünlere gelmem için her türlü fedakarlığı yapan canım aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışmam Tübitak Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

Hülya GÜLERYÜZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
2.1 Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi.....	7
2.2 CA Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları.....	8
2.3 Karbonik Anhidraz Enzimlerinin 3 Boyutlu Yapıları.....	10
2.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması.....	12
2.5 Karbonik Anhidraz Aktivitesi.....	14
2.6 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	15
2.7 Glokom Hastalığı.....	18
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

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4 Yöntemler.....	26
3.4.1 Protein Tayini.....	26
3.4.1.1. Kalitatif Protein Tayini.....	26
3.4.1.2. Coomassie Blue Yöntemi ile Protein Tayini.....	26
3.4.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini.....	26
3.4.2.1. CO ₂ -Hidrat az Aktivitesi Tayini.....	26
3.4.2.2. Esteraz Aktivitesi Tayini.....	27
3.4.3 Afinite jelinin hazırlanışı.....	28
3.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması.....	30
3.4.4.1 Hemolizat eldesi.....	30
3.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu.....	22
3.4.4.3. Diyaliz işlemi.....	30
3.4.5 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimlerin saflığının kontrolü saflaştırılması.....	31
3.5. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi.....	33
3.5.1 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA enziminin hidrat az aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	33
3.5.2 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....	33
3.5.3. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkilerinin K _i sabitleriyle bulunması.....	34
4 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	35
4.1 HCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen HCA Enziminin SDS-Poliakrilamid jel Elektroforezi Sonuçları.....	37
4.3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi.....	37
4.3.1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi.....	37
4.3.2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin in vitro olarak incelenmesi.....	42
4.4 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K_i Sabitlerinin bulunması.....	47
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	55
6. KAYNAKLAR.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	Safılaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu.....	5
1.2	Ligand ile matris arasında uzantı kolunun şematik gösterimi.....	5
2.1	İnsan CA-II'deki metal merkezin "doğrudan" ve "dolaylı" ligandları gösteren şematik görünümü.....	11
2.2	İnsan CA-II'nin 3 boyutlu yapısının şematik gösterimi.....	12
2.3	Karbonik anhidrazın katalizlediği CO ₂ -hidrataz reaksiyonunun mekanizmasının gösterilişi.....	13
2.4	İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri.....	16
2.5	Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması.....	17
3.1	Afinite jelinin hazırlanması.....	29
3.2	Diyaliz işleminin uygulanması.....	31
4.1	İnsan eritrositlerinden elde edilen HCA enziminin elüsyonunda; (.) 280 nm'de elde edilen absorbans değerleri.....	35
4.2	Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.....	36
4.3	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerini SDS-poliakrilamid jel elektroforazi fotoğrafı.....	37
4.4	HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 11 bileşiğinin etkisi.....	39
4.5	HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 12 bileşiğinin etkisi.....	39
4.6	HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 13 bileşiğinin etkisi.....	39
4.7	HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 11 bileşiğinin etkisi.....	41
4.8	HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 12 bileşiğinin etkisi.....	41
4.9	HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 13 bileşiğinin etkisi.....	41
4.10	HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 11 bileşiğinin etkisi.....	43
4.11	HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 12 bileşiğinin etkisi.....	43
4.12	HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 13 bileşiğinin etkisi.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ(devamı)

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
4.13	HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 11 bileşiğinin etkisi.....	45
4.14	HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 12 bileşiğinin etkisi.....	45
4.15	HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 13 bileşiğinin etkisi.....	45
4.16	HCA-I enzimi üzerinde 11 bileşiğinin Lineweaver.....	48
4.17	HCA-I enzimi üzerinde 12 bileşiğinin Lineweaver.....	49
4.18	HCA-I enzimi üzerinde 13 bileşiğinin Lineweaver.....	50
4.19	HCA-II enzimi üzerinde 11 bileşiğinin Lineweaver.....	51
4.20	HCA-II enzimi üzerinde 12 bileşiğinin Lineweaver.....	52
4.21	HCA-II enzimi üzerinde 13 bileşiğinin Lineweaver.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı ve işlevi.....	9
4.1 HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	38
4.2 HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	40
4.3 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	42
4.4 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..	44
4.5 Sentezlenen bileşiklerin HCA enziminin in vitro CO ₂ -hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....	46
4.6 Sentezlenen bileşiklerin HCA enziminin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....	46
4.7 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 11 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	48
4.8 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 12 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	49
4.9 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 13 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	50
4.10 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 11 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	51
4.11 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 12 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	52
4.12 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 13 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkisi ve K _i elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	53
4.13 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları.....	54

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

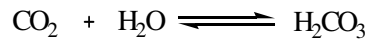
1.GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir [1]. Vücuttaki tüm reaksiyonlar enzimler tarafından yürütülürler. Enerji açısından mümkün olan birçok biyolojik reaksiyonda; enzimler reaktanları kullanışlı yollara seçici olarak kanalize ederler. [2] Enzimlerin substratlara spesifiklikleri bunların en önemli nitelikleridir [3].

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 yakınlaştığı zaman katalitik noktalar, bu noktanın oldukça ötesine kadar uzanabilen konformasyon değişikliklerine uğrayabilir [3].

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.[2] Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Karbonik anhidraz, enzimlerin en yüksek turnover sayısına sahip olanları arasındadır (600.000 s^{-1}). Yani bir karbonik anhidraz molekülü tarafından



reaksiyonu 1/600.000 saniyede, yani 1,7 mikro saniye de gerçekleştirilmektedir [2].

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. Uygun kofaktör olmadığında apoenzimin biyolojik aktivitesi yoktur [4]. Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere “prostetik grup” adı verilir [1]. Kolaylıkla difüze olan koenzimler, üretim ve tüketim noktaları arasında mekik dokuyarak sürekli tekrar döngüye giren hidrojen (FADH), hidrür (H) taşıyıcıları veya açıl grupları

(koenzim A) ve metil grupları (folatlar) gibi kimyasal birim vazifesi görürler. Bu yüzden, bu koenzimler ikinci substratlar olarak hesaba katılabilirler [3].

Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları asit-baz katalizi, kovalent kataliz veya enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırır [4].

Bir doku ekstraktı veya diğer biyolojik sıvı örneğindeki bir enzimin miktarını ölçmek için, örnekteki enzim tarafından katalize edilen tepkimenin hızı ölçülür. Uygun koşullar altında tepkimenin ölçülen hızı var olan enzim miktarı ile orantılıdır. Bulunan molekül sayısı veya enzim kütlesi, aktivite birimi olan enzim üniteleri olarak ifade edilir [3].

25°C'da ve optimal şartlarda 1 mikromol substratı bir dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarına '1 enzim ünitesi' (EU) denilir. Ancak uluslar arası ölçü sistemine göre zaman birimi saniye, madde miktarı birimi mol olduğundan bu sistemde enzim aktivite birimi kataldır [1].

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

Enzim aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından 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 oluşturduğundan, önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler; hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir [1].

Bir enzimin katalitik etkisi birçok yolla değiştirilebilir. Bir protein olan enzim molekülü, denatüre edilirse; üç boyutlu yapısı bozulur ve bunun sonucu 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.

İnhibisyonlar; dönüşümlü (reversible) veya dönüşümsüz (irreversible) olabilir [4].

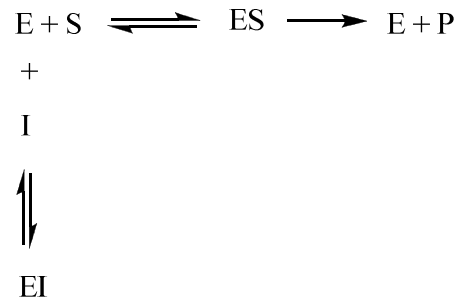
Dönüşümlü inhibisyonunda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir.

Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

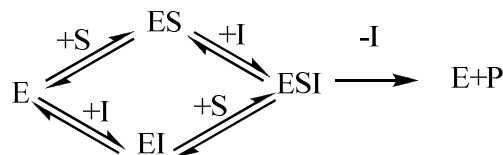
- i) Yarışmalı inhibisyon (kompetitif)
- ii) Yarışmasız inhibisyon (nonkompetitif)
- iii) Yarı yarışmalı inhibisyon (unkompetitif)
- iv) Karışık tip inhibisyon

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör; yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Yarışmalı inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş K_M 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. 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. Doğru eğiminin inhibisyondaki artışı, yarışmalı inhibitörün bağlanma kuvvetini gösterir. [1, 2].

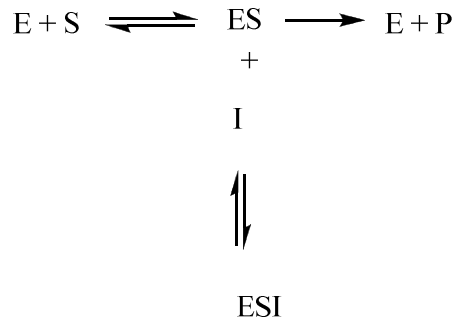
Katalitik noktaya geri dönüşümlü olarak bağlanan ve enzimin yarışmalı inhibitörleri olarak etki yapan substrat benzerleri tıbbi olarak önemli olan birçok ilacı kapsar [3].



Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat, enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini; enzimin turnover sayısını yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır [1]. Yarışmasız inhibisyon aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Buna göre inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} 'da düşer. Yarı yarışmalı inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda ender görülür; buna karşılık iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır [1].



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 [5].

Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur.

İnhibitörleri çok defa yarışmalı ve yarışmasız olmak üzere kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Gerçekte inhibisyon genellikle karışıktır [1].

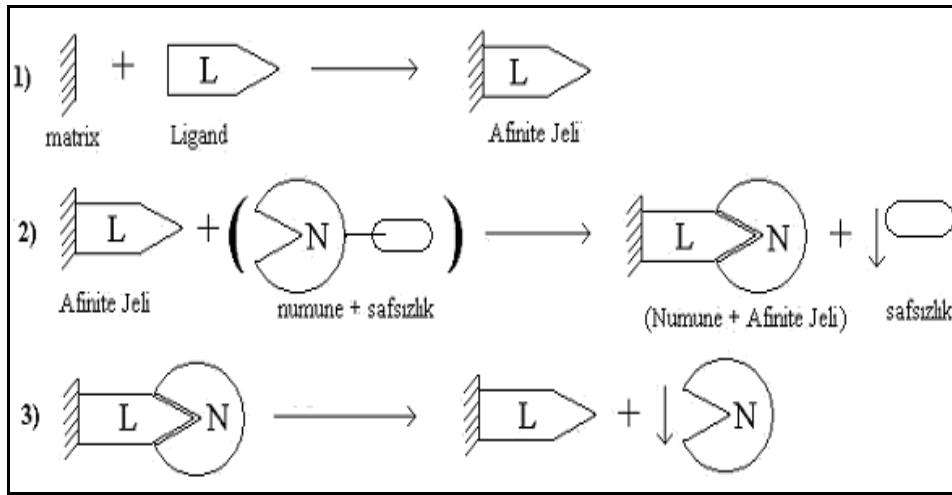
Enzim inhibisyonu gibi konuları ele alan çalışmalarda enzim saflığı çok önemlidir.

Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok yapı taşıyı içeren ham bir hücre özütünden ayırmaktır [3]. Saflaştırmada kullanılacak birçok yöntem olmasına rağmen bizim çalışmamız en verimli saflaştırma yöntemi spesifik ligandlar esasına dayanılarak yapılan afinite kromatografisidir.

Afinite kromatografisinin belirgin niteliği, özel bir protein veya küçük sayıda özel proteinleri karmaşık bir protein karışımından seçici olarak çekip almasıdır. Kullanılan yöntemde, saflaştırılması istenen enzim ile özgül olarak etkileşen sabit bir ligand kullanılır. Protein karışımı bu sabit ligandla karıştırıldığında, sadece ligandla etkileşime giren proteinler

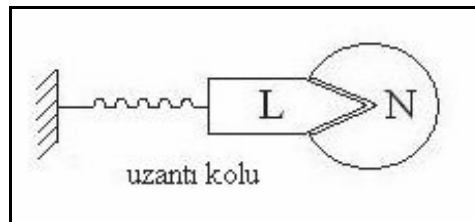
bağlanır. İstenmeyen proteinler kolondan ayrılır. Daha sonra istenilen proteinler, sabit ligand yıkandıktan sonra elue edilir. Afinite kromatografisi yöntemiyle yapılan saflaştırma çok mükemmel olup; çoğu kez, çok sayıda klasik yöntem serisinin uygulanmasından daha iyi sonuç verir [3].

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



Şekil 1.1. Saflaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu

Saflaştırılması istenen molekülün kolondaki liganda bağlanması, çoğu durumda matris ile ilgili molekül arasındaki sterik engelden dolayı zorlaşmakta ve kolon verimi düşmektedir. Bu problem, uygun uzantı kolu kullanılarak ortadan kaldırılabilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Ligand ile matris arasında uzantı kolunun şematik gösterimi

Sonuç olarak, proteinlerin aktive edilmiş matrislere bağlanmasındaki koşullar; proteinin denatürasyonuna veya inhibisyonuna neden olmamalıdır. Genelde bağlanma protein

molekölünün dış yüzeyindeki lizin rezidüleri, yada başka bir amin grubu ile olur. Bu grup; nükleofilik yani protonlanmamış halde bulunacağı yüksek bir değerde olmalı fakat inaktivasyona neden olacak kadar da yüksek olmamalıdır. Tüm bu özellikler göz önüne alınır, bir afinite kolonunun verimli olabilmesi için; matriksin iyi akış özelliklerine sahip, ligandı bağlama ve elüsyon işlemlerine dayanıklı, akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda olması gerekir. Ligandın ise adsorbe edeceği bileşiklerle uygun bir afinitesi olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolonun kapasitesi artar ve istenilen protein yüksek derecede saflaştırılmış olarak elde edilir [6].

Bazı enzimler için özel ünite tanımları vardır. Bunlardan birisi de spesifik aktivitedir. 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 [1].

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi

Karbonik anhidraz (karbonat hidroliyz, E.C. 4.2.1.1) çinko içeren ve karbondioksidin tersinir hidratasyonunu katalize eden bir enzimdir [7]. Katalizlenen reaksiyon;



Fakat H_2CO_3 kendiliğinden



şeklinde iyonlarına ayrışır.

Yapılan çalışmalarda; yukarıdaki hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarının kendiliğinden oluşum hızından çok daha hızlı olduğu görülmüştür [8]. Bu olaylarda, kanda var olan bir enzimin rol alabileceği düşünüldü. Daha sonra karbonik anhidraz enzimi Roughton ve Meldrum tarafından insan eritrositlerinde bulundu [9]. Birkaç yıl sonra karbonik anhidraz varlığı başka canlılarda ve başka dokularda da ortaya çıkarıldı. [10-12].

Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri belirlenmiştir. CA, sözü geçen canlı hücrelerin çoğunda; stoplazmada çözülmüş, bazende hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunmaktadır [13]

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. Izoenzimlerin aktiviteleri farklı; substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir [1]. Izoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit sayı ve sırasının farklı olması, herbir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir.

Izoenzimlere örnek karbonik anhidraz (CA) verilebilir. CA'nın birçok canlı türünde CO_2 'in hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen çok sayıda izoenzimi vardır. Bugüne kadar memeli hayvanlar için; eritrositlerde (CA-I ve CA-II), iskelet kasında (CA-III), insan böbreğinde (CA-IV), belirli dokuların mitokondrilerinde (CA-V), tükürük bezlerinde (CA-VI) ve sitozolde (CA-VII) karbonik anhidraz izoenzimleri

belirlenmiştir. Genelde tek polipeptid yapıya sahip olan bu izoenzimlerin yanında bitkilerde oligomerik yapıda CA izoenzimlerine rastlanmıştır [1].

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 15 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir [13]. Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır. [14] Bu izoenzimlerden CA, I, II, III ve VII olmak üzere dört tanesi sitozoliktir. CA-IV, CA-IX, CA XII ve CA XIV ise membrana bağlıdır. CA-V mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır [13].

2. 2 CA Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

Genel olarak insandaki CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucunda ortaya çıkarılmıştır. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinde bulunur. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonu; doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO_2 'i H_2CO_3 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3 'i CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi bulunamamıştır [14-16].

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın üzerinde en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10^6 s^{-1} olarak bulunmuştur. CA II'nin doku dağılımı geniştir ve pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunur. Osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini gösterir [7]. Çizelge 2.1'de CA II izoenziminin memelilerde doku dağılımı gösterilmiştir.

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

Glokom hastalığı sonucunda, yüksek göz içi basıncı görülmekte (intraocular pressure, IOP) ve hastalık dönüşümsüz körlüğe neden olmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Karbonik anhidraz enziminin humor aközün salgılanmasında uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile silyer epitelinin salgı aktivitesi %25–30 oranında azalmaktadır [17].

CA-III'ün turnover sayısı 8.10^3 s^{-1} 'dir. Düşük aktiviteli bir enzimdir. Diğer CA izoenzimlerine göre, sülfonamidlerin inhibisyonuna daha az hassastır. Başlıca çözünür protein olduğu ve CO_2 'in doku kılcal damarlarına difüzyonunu kolaylaştırmada rol oynadığı sanılmaktadır. Yavaş kasılan kırmızı kas liflerinde en çok bulunur. Ayrıca, yağ hücrelerinde de

bu izoenzimin konsantrasyonu yüksektir. CA-I ve CA-II gibi CA-III'te p-nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Öte yandan, CA-III'ün fosfataz aktivitesi gösterildiği bildirilmiştir [7].

Çizelge 2.1. CA II izoenziminin memelilerde doku dağılımı ve işlevi

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

HCA-IV ve HCA-VI izoenzimleri sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. HCA-IV membrana bağlıdır. Akciğerdeki ve bazı diğer organlardaki kılcal damarların endotel hücrelerinin plazma yüzeyinde ve ayrıca böbrek membranına bağlı bulunduğu gibi bazı epitel hücrelerinin membranına bağlı olarak bulunur.[18].

HCA-V, belirli dokuların mitokondrilerinin matrikslerinde bulunur. CA-V'in sırasıyla karbamoil fosfat sentetaz-I'e ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağlayarak ürogenez ve glukoneogenez de rol oynadığı ileri sürülmektedir. CA-V'in lipogenez olayında da rol oynaması mümkündür [19].

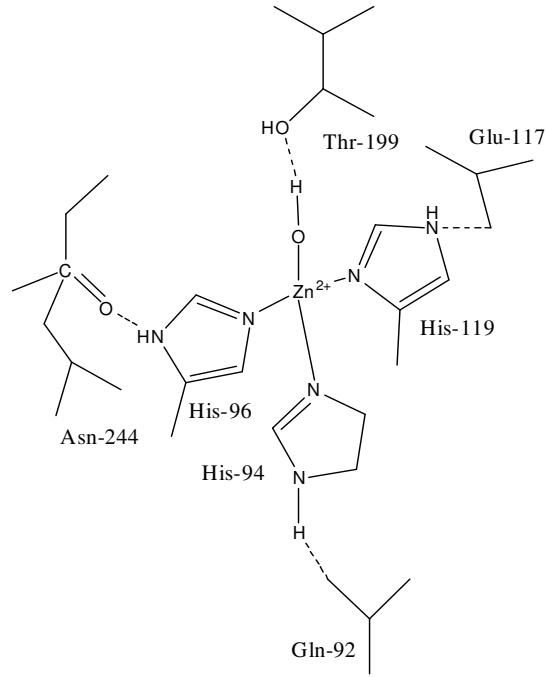
HCA-VI izoenzimi tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir ve insan tükürüğünden yalıtılmış olup, tükürüğün pH düzenlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. HCA-VII izoenzimi ise tükürükteki bikarbonatın salgılanmasında rol oynayabilir [20].

2.3 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 , β ve γ olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilişkisiz üç CA ailesinin varlığı şaşırı buluşlardan biridir [21]. Farklı CA ailelerinin temsilcilerinin arasında kayda değer sekans homolojileri bulunmaz ancak hepsi çinko enzimleridir [22-23].

İnsan CA-I ve CA-II'nin kristal yapısında, sığır CA-III'ünde, sıçan CA-V'inde ve E.coli'de bulunan CA'lar α -CA yapısındaki 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, bu α -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir. On iplikçik ve molekülü iki eş parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşan bölge, yapının ikinci bölgesidir. İki paralel iplik çifti haricinde, β şeritleri antiparaleldir. Molekülün yüzeyinde diğerlerine göre daha kısa olan heliksler bulunur [24].

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 [25].

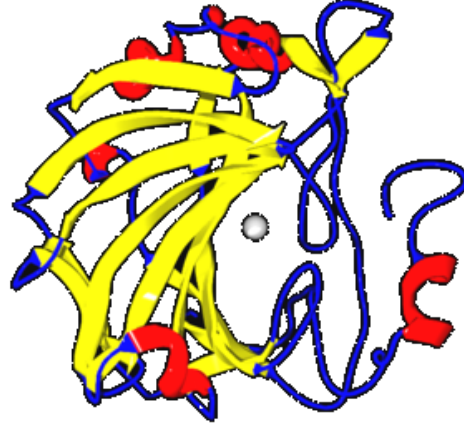


Şekil 2. 1 İnsan CA-II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü.

Henüz hiçbir β -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktametrik yapısında olduğunu kuvvetle savunur. X-ray absorpsiyon spektroskopisinden ve mutasyonlardan elde edilen kanıt, ıspanak enzimindeki çinko iyonunun α -CA'ların aksine Cys-His-Cys-H₂O grubuyla koordine olmuş olduğunu ortaya koyar [26].

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.

Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar. *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 bağlı bölgelerin benzer olduğuna işaret etmektedir [27].



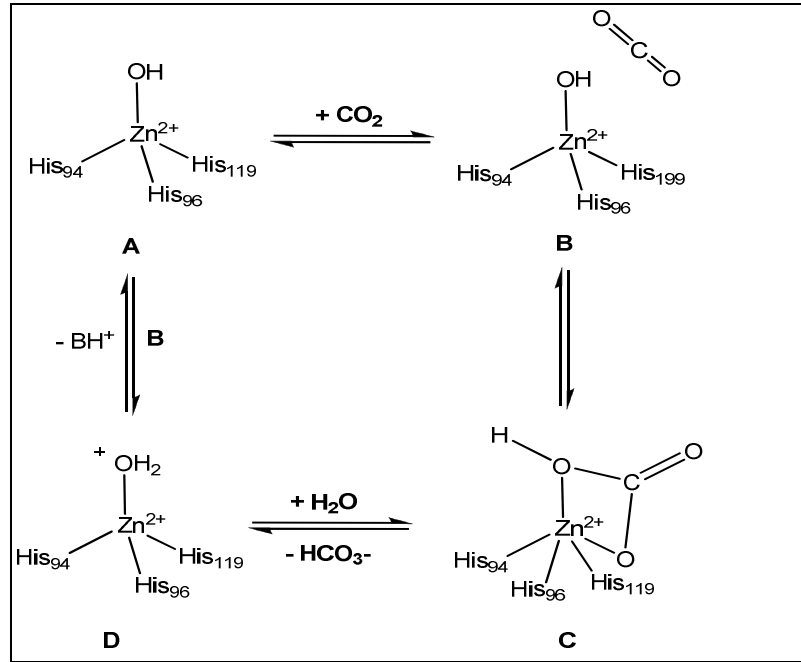
Şekil 2. 2. İnsan CA II'nin 3 boyutlu yapısının şematik gösterimi

2. 4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna göre CA enzimi, metabolizma için son derece önemli olmasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [28].

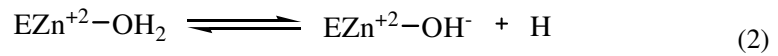
Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristallografisi çalışmaları metal iyonun, aktif bölümün 15 Å⁰ derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü/ hidroksit iyonu tarafından koordine edilmektedir. Çinko bağlı su, Thr-199'un hidroksil grubu ile hidrojen bağı ile bağlıdır. Bu Glu-106'nın karboksilat grubu ile köprü halindedir. Bu bağlantılar çinko bağlı molekülün nükleofilisini artırır ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO₂'e doğru hareket etmektedir.[14]

Enzimin aktif formu; hidroksil grubunun çinkoya bağlı olduğu temel formdur. (Şekil 2. 3-A). Bu güçlü nükleofil, CO₂ molekülü ile etkileşir (Şekil 2. 3-B). Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 2. 3-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. 3-D). Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [29].



Şekil 2. 3 Karbonik anhidrazın katalizlediği CO₂-hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.

İşlem şematik olarak şöyle gösterilebilir:

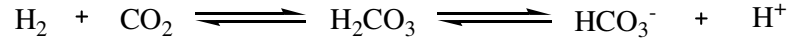


Katalizdeki hızı sınırlayan basamak ikinci reaksiyondur. CA-II, CA-IV, CA-V, CA-VII ve CA-IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir [30].

CA'daki metal iyon bağına ilişkin pek çok çalışma insan ve sığır izozim II ve insan izozim I üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çinko iyonunun belirli şelat maddelere karşı diyalizle bu izozimlerden atılabileceği bulgulanmıştır [31,32,33]. Ortaya çıkan izozimler aktif değildir; ancak çinkonun eklenmesiyle aktivite tamamen düzelmiştir. Başka bir çok metal iyonu apoenzime bağlanabilir, fakat sadece Co⁺² doğala benzer katalitik özelliklere sahip bir ürün verir [34,35,36].

2. 5 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 [37].

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 [37,38].

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 [38].

Enzimin esterase aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [38,39].

2. 6 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

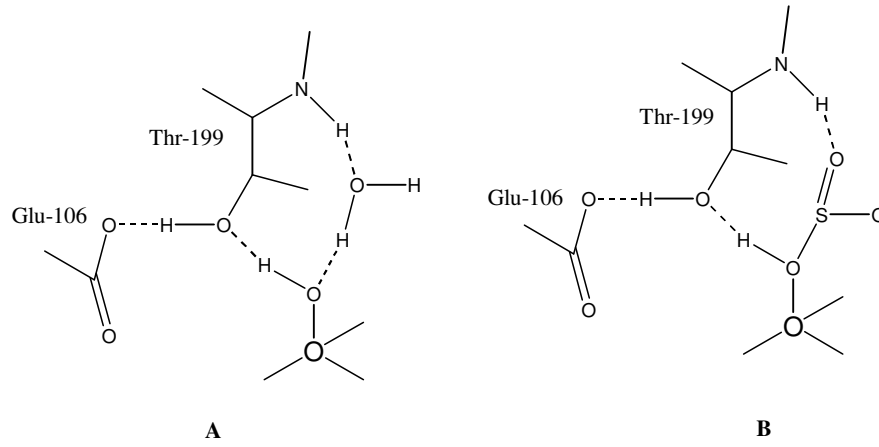
İnorganik anyon ve katyonlar bir de organik inhibitörler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir.

Çoğu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları: (sığır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN^- iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren F^- iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir [40].

İnhibisyonun pH bağımlılığına ve Co^{+2} 'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik CO_2 hidratasyonunda önemli bir rolü olan OH^- iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır. Co^{+2} ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağlı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir [40].

CA-II üzerine yapılan son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağ biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağlı H_2O veya OH^- iyonu içeren Glu-106 ve Thr-199 bulunduran indirekt liganddaki bir H bağlanma sistemidir. Glu-106 büyük olasılıkla iyonlaşmıştır ve bu nedenle, hidrojen bağlı Thr-199 ile bir alıcı görevi görmelidir. Sonuç olarak, Thr-199'un hidroksil grubunun, metal bağlı çözücüyle bağlanmasında bir H atomu alıcısı olduğu kabul edilmelidir. Ayrıca, çinkoya bağlı H_2O veya OH^- , hidrofobik bir cepte bulunan bir başka su molekülü ile bir hidrojen bağı oluşturur. Hidrojen, Thr-199'un peptit NH^+ 'ına bağlanır. Bu hidrojen bağı etkileşimlerinin, inhibitörlerin bağı üzerinde belirleyici etkisi olduğunu göstermektedir [41].

Protonlanmış bir ligand atomuna sahip olan inhibitörler, tetrahedral koordinasyon geometrisini bozmaksızın metale bağlı çözücü molekülün yerini alırlar ve Thr-199'un OH grubu ile hidrojen bağı kururlar. HSO_3^- ve HS^- iyonları buna örnek olarak verilebilir. HSO_3^- iyonu derinde olan su molekülü ile yer değiştirirken bir oksijen atomu Thr-199'un NH gurubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir [42].



Şekil 2. 4 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 inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler [43]. 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 [44].

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.

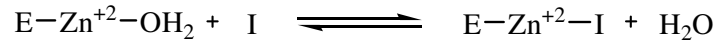


Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır [45,46].

Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grubu veya bir $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{OH})$ grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde, $(\text{R-SO}_2\text{NH}^-$ veya

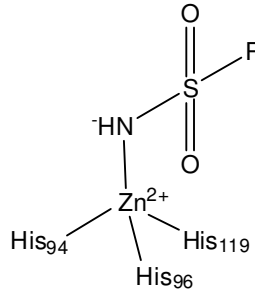
$R-SO_2N-OH^-$) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur [46,47].

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 değillerdir [14].



Tetrahedral yapı (süstitüsyon)

Zn (II) iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn (II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 2. 5.) [30].



Şekil 2. 5 Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması

2.7 Glokom Hastalığı

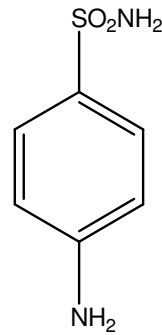
Göz hastalıkları içinde körlüğe en fazla glokom hastalığı neden olur (% 15-20) [48]. ABD' de körlerin %10-11 bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir [49]. Yine aynı ülkede beyazlarda en fazla körlük nedeni olan üçüncü hastalık olarak belirtilmiştir [50,51].

Glokom tedavisinin temel amacı optik sinir başı hasarını ve buna bağlı gelişen görme alanı kayıplarını önlemektir. Optik sinir hasarının gelişiminde göz içi basıncının artışı yanı sıra diğer bir çok faktörün rolü olmasına rağmen uygulanan tedavi yöntemlerinin büyük bir bölümü göz içi basıncını düşürmeye yöneliktir [52,53]

Glokomda diğer risk faktörleri; pozitif aile öyküsü, myopi, diabetes mellitus, kardiovasküler hastalık, ırk(zenciler yüksek risk grubunda), asimetrik optik disk çanaklaşması, optik diskte çanaklaşmanın büyük olması, erken nonspesifik görme alanı değişiklikleridir.

Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyonu yolu ile glokomlu hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir. Tedavi yaklaşımlarında en az yan etki oluşturacak, hasta için en az riskli ilaçlar seçmeye dikkat edilmelidir. Ayrıca seçilen ilacın fayda ve zarar oranı iyi hesaplanmalıdır.

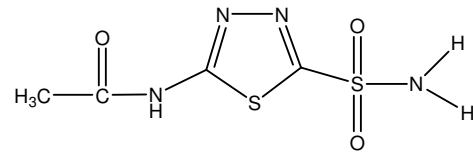
Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri (1) 1940'da sentezlenmiştir.



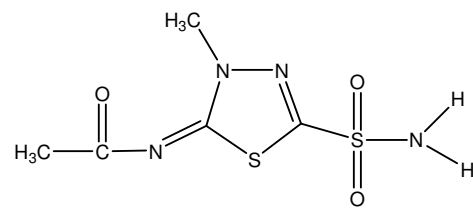
(1)

Glokom tedavisinde uzun zamandan beri 4 çeşit sistemik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler asetazolamid (2), metazolamid (3), etokzolamid (4) ve diklorfenamid (5) bileşikleridir [54,55]. Sistemik inhibitörler, yükselen göz içi basıncını (IOP) düşürmekte kullanılır. Bu inhibitörler, silyer epitel enzimlerini (CA-II ve CA-IV) inhibe etmesiyle, HCO_3^- oranında bir azalma sağlar. Bu yüzden humor aköz salgılanmasında %25-30 azalma sağladığından, bu inhibitörler glokom hastalığı

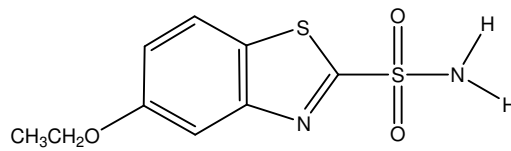
tedavisinde kullanılırlar. Fakat bu inhibisyon, gözden daha çok diğer dokulardaki CA enzimlerini etkilediğinden, oldukça büyük yan etkilere sahip olmaktadır [54,55].



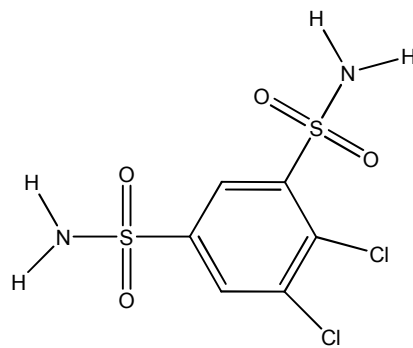
(2)



(3)



(4)



(5)

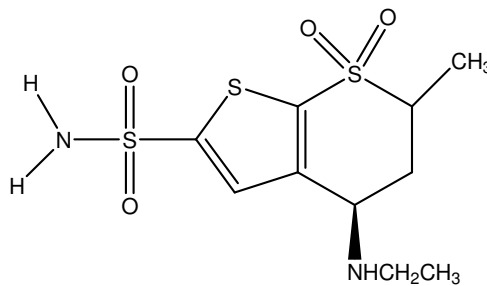
Asetazolamid, antimikrobiyal etkinliği olmayan sentetik sülfonamid türevidir. Mide-bağırsak kanalından kolaylıkla adsorbe edilirler. Asetazolamid ağızdan alınır, etkisi 1 saatte başlar 2-4 saatte maksimum olur ve 6-8 saatte biter [56]

Diklorfenamid bileşiği, asetazolamid bileşiğinin yan etkilerinden daha düşük yan etkili inhibitör bulma çalışmaları sonucunda üretilmiştir. Ancak klinik çalışmalar ilacın asetazolamidden daha etkili olmadığını ve yan etkiler açısından da farkının bulunmadığını göstermiştir [56].

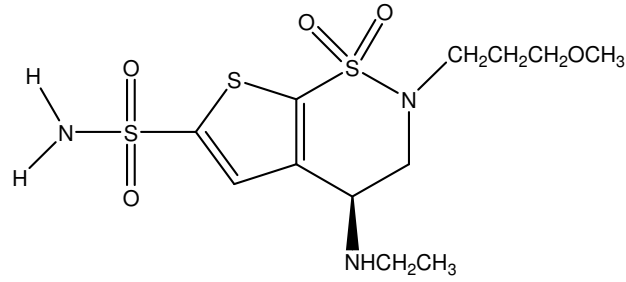
Metazolamid bileşiğinin etkisi diğer karbonik anhidraz inhibitörlerinden daha düşük ancak daha iyi tolere edilmektedir.

2 ve **5** bileşikleri; mide, akciğer, böbrekler ve kandaki CA izoenzimlerini (CA-I, CA-II, CA-IV, CA-V ve CA-VII), gözdeki CA izoenzimlerinden daha çok inhibe etmektedir [54,55]. Bu da **2** ve **5** bileşiklerinin topikal olarak göze uygulanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Fakat **2** ve **5** bileşikleri gibi klinikte kullanılan ilaçların hiçbiri, suda çözünlülük problemlerinden dolayı etkili konsantrasyonları sağlanamadığından henüz damla haline getirilememiş ve ağızdan alınmaktadır

Yüksek IOP'yi düşürürken, CA izoenzimlerinin inhibe olmaması için, göze lokal olarak uygulanabilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmuştur [57]. Bu sebepten dolayı ilk kez ilaç olarak kullanılmak üzere dorzolamid (**6**) bileşiği sentezlenmiş ve 1995'te kliniklerde kullanılmıştır [58]. İkinci olarak da, yapı olarak dorzolamide benzeyen brinzolamid (**7**) bileşiği sentezlenmiş ve 1999'da kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Böylece glokoma tedavisi için kullanılan 1-4 arası sistemik ilaçların arasına bu iki ilaç da katılmıştır. Bu iki ilaç (**6** ve **7**), daha önceden ilaç olarak kullanılan bileşiklerle karşılaştırıldığında; daha az yan etkisi olmakla birlikte, lokal olarak uygulanması sebebiyle gözde yalnızca istenilen CA izoenzimlerini inhibe etmektedir [55].



(6)



(7)

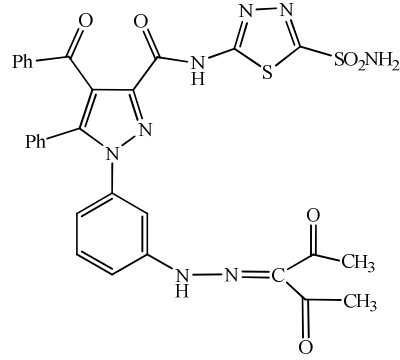
Son yıllardaki çalışmalarda ise **6** ve **7** bileşiklerinin de; göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur [59,14].

Özetle şimdiye kadar yapılan sentezler sonucu elde edilen bileşiklerin; enzimlere karşı yüksek aktivitede olması, yağ içindeki çözünürlüğünün istenilen seviyede olması, su ve yağ arasındaki çözünürlüğü dengede olması, göze uyumlu olması, yan etkilerinin olmaması en azından minimum seviyede olması, topikal (damla) olması gibi özelliklere sahip olması istenmiştir.

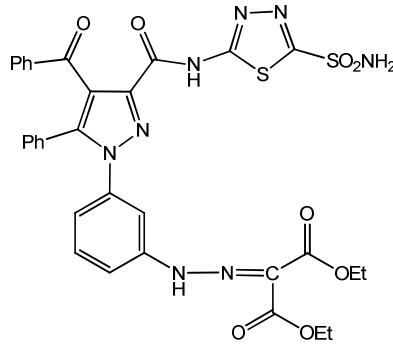
Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi, ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans belirlenmesinde (MRI) diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır [14].

Bu çalışmada; karbonik anhidraz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve daha önce sentezlenen bileşiklerin; glokom tedavisinde rolü olan HCA-II üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çıkış maddeleri olan 5-amino-1,3,4-tiyadiyazol-2-sülfonamid ve asetazolamid bileşikleri ile 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 I_{50} değerlerinin

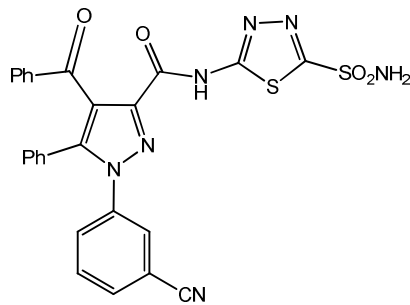
(%50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu) bulunması ve inhibisyon gösterenlerin de grafikler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen bileşiklerin formülleri;



(11) 4-Benzoil-1-(3-(2-(2,4-dioxopent-3-iliden)hidrazinil)fenil)-5-fenil-N-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-1H-pirazol-3-karboksamit



(12) Dietil 2-(2-(3-(4-benzoil-5-fenil-3-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)karbamoil)-1H-pirazol-1-il)fenil)hidrazono malonat



(13) 4-Benzoil-1-(3-siyano-fenil)-5-fenil-N-(5-sülfamoil-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-1H-pirazol-3-karboksamid

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 brilliant 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, Heidolph

Hassas terazi: Ohaus – Adventurer

Kronometre: Hanhard, Electronische Digital-Stoppuhr Germany

Otomatik Pipetler: Biohit Proline

Mağnetik karıştırıcı: Heidolph 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. SDS-Elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0,65 mL 1 M Tris-HCl (pH=6,8) 3 mL %1'lik SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacmin saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampona kullanmadan hemen önce, 950 µL numune tamponunda 50 µL olacak şekilde β-merkapto etanol ilave edildi.

8. SDS- Elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

1,5 g Tris ve 7,2 g glisin 50 mL suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 mL %1'lik SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

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

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

10. 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.

11. 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.

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

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

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

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

14. İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen 11, 12, 13 bileşiklerinin %1'lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5'er mg alınıp 1 mL etanolde çözüldükten sonra, hacimleri 5'er mL'ye tamamlandı.

15. %0,04'lük brom timol mavisi çözeltisi: 0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra, hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla 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 absorbans göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları 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 absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [60].

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 µL 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 hidratasyonu 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 [61,62]. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon 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 doygun 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 yöntemle 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 Esteraz aktivitesi tayini

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



348 nm'de *p*-nitro fenol ve *p*-nitro fenolat'ın her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir [53,54]. 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 sifıra 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 ester sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi [63]. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı [65].

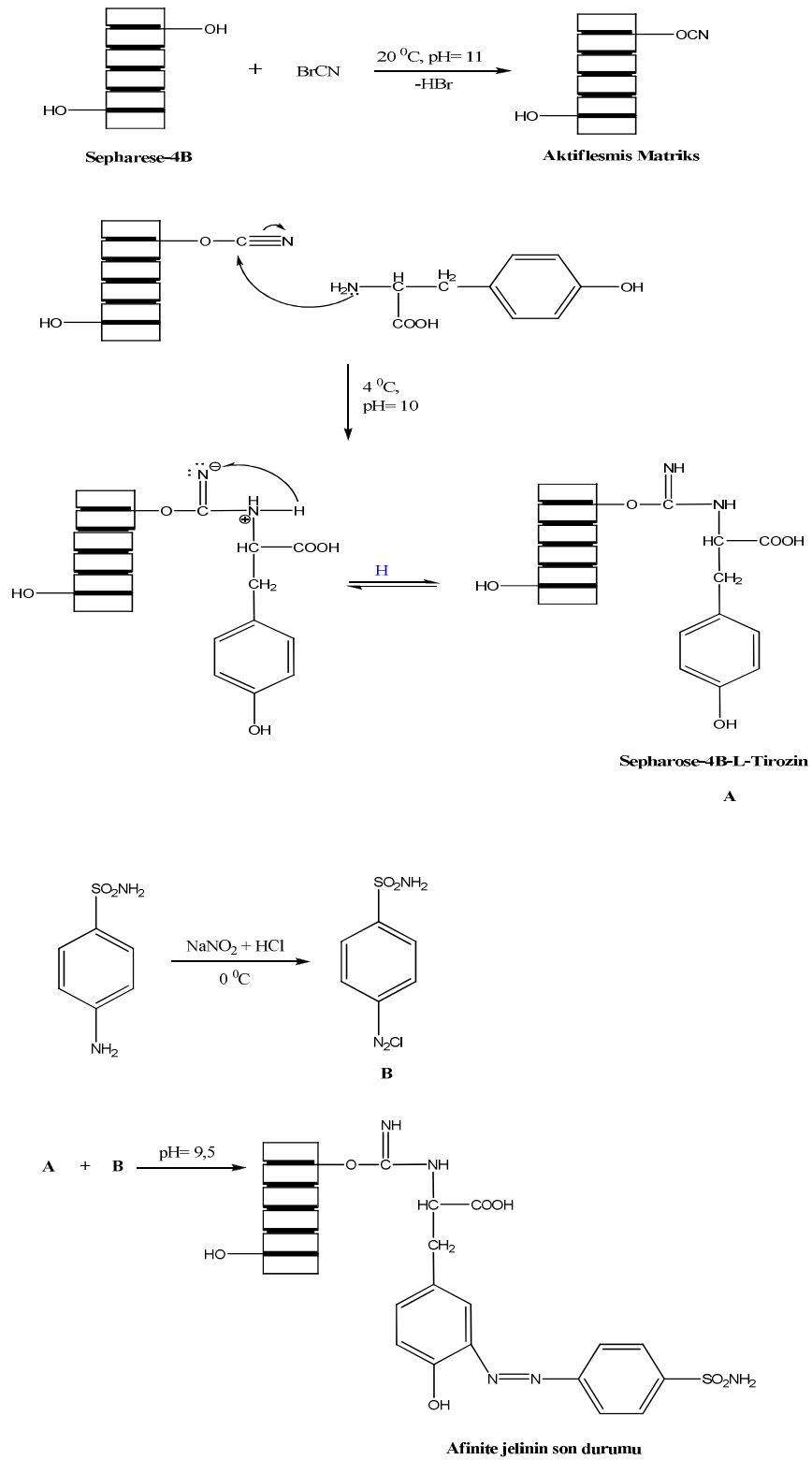
3. 4. 3. Afinite jelinin hazırlanması

3. 4. 3. 1 Sepharose-4B Matrisi üzerinde afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matrisi 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 [65].

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 içerisinde alındı [66-68].

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 [69,6]. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 3. 1 Afinite jelinin hazırlanması

3. 4. 4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

3. 4. 4. 1 Hemolizat eldesi

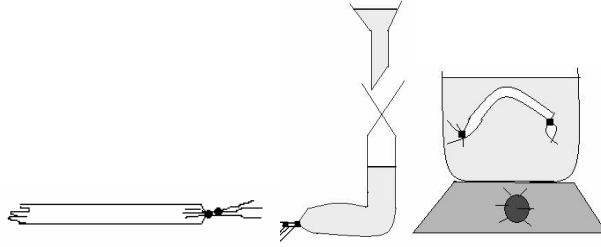
Kullanılacak kan, antikoagülanlı kan torbalarına alındıktan sonra 4 °C'de muhafaza edildi ve en çok 2 gün içerisinde kullanıldı. Eritrositleri ayırmak için kan 10 ml'lik tüplere konuldu ve 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde ayrıldı. 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 ayırımında 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 konsantrasyonunu 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 tamamlanıncaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir [70].



Şekil 3. 2 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 (selüloz, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zarın 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 ortamdaki 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 [70].

3. 4. 5. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzimlerin saflığının kontrolü

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra %3-10 kesikli, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli tarafından açıklandığı gibi yapılarak saflaştırılan enzimlerin saflık derecesi kontrol edildi.

Bunun için elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren aralık koyuculara vazelin ince tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine yerleştirildi ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözünmüş daha sonra 40-50 °C'ye soğutulmuş agar dökülerek kapatıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektör yardımıyla ilave edildi. Hava almamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar yaklaşık yarım saat bekletildi. Daha sonra yığılma jeli, üst düzeye

kadar ilave edildi. Üzerine tarak dikkatlice yerleştirildi. Tarağın üzerine nemli süzgeç kağıdı konularak bir gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak, plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan kuyular işaretlenerek; jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler kuyuların her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika kaynar su banyosunda inkiübe edildi. Numuneler soğutulurken, jeldeki kuyulara bir enjektörle tatbik edildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 voltta yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel sabitleştirme çözeltisinde (%50 izopropanol + %10 TCA + %40 saf su) 30-40 dakika bekletildi. Daha sonra fikse çözeltisinden çıkartılan jel, özel kabına konularak boyama çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklendi. 1,5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra boyama çözeltisinden çıkarılarak, yıkama çözeltisine alındı. Belirli zaman periyotlarında değiştirilme suretiyle jelin zemin rengi açıldı ve protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Mavi renge boyanan renksizleştirme çözeltisi, aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar kullanıldı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı: 15 mL 1 M Tris-HCl (pH=8,8), 10,66 mL %30'luk akril amid- %0,8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %1'lik-SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilen diamin) ve 11,94 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat [(NH₄S₂O₈ (PER)] ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığıma jeli hazırlaması sırasında; 1 M'lık Tris-HCl pH=6,8'den 1,24 mL %30'luk akril amid- %0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve saf sudan 7,36 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine taze hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edildi.

3. 5 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

3. 5. 1. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA enziminin hidrataz aktiviteyi üzerinde inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteyi üzerinde yeni sentezlenen 11, 12, 13 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glökom 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-I ve HCA-II enzimi 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 eritrosit HCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi

İnsan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteyi üzerinde yeni sentezlenen 11, 12, 13 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glökom 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 [57].

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

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

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

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

3. 5. 3. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkilerinin K_i sabitleriyle bulunması

K_i değerlerini bulmak için; insan eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 11, 12, 13 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;

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

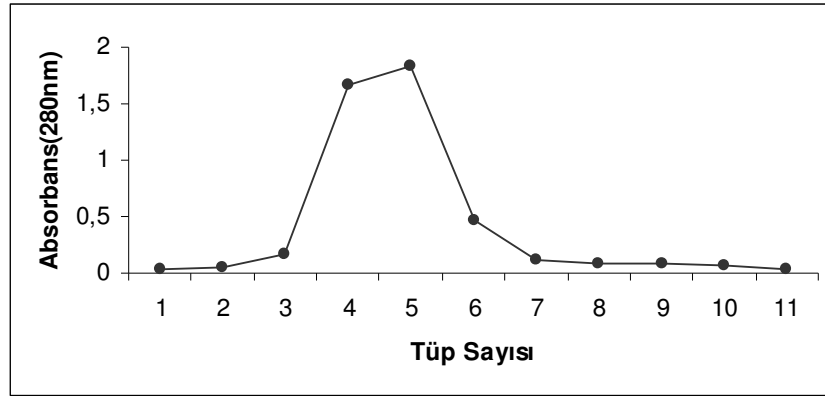
değeri, V (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver Burk grafiklerini çizmek için bu değerler $1/V$ değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonları $[S]$, grafikte kullanmak için $1/[S]$ değerlerine dönüştürüldü. Bu-değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün, insan eritrosit HCA enzimi 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 HCA Enziminin 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. Eliüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrat az aktivitesine bakıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 İnsan eritrositlerinden elde edilen HCA enziminin elüsyonunda; (•) 280 nm'de elde edilen absorbans değerleri

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 95 mg/mL ve hidrat az aktivitesi 1437 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 1437/95 = 15,12$$

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 0,37 mg ve mL'deki enzim ünitesi 60 EU olarak bulundu. Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 200 kat seyreltme yapıldığından aktivitesi HCA-I için 12000 EU/mL olarak bulundu. HCA-II için ml'deki protein miktarı 0,13 mg ve ml'deki enzim ünitesi 41,2 EU olarak bulundu. 200 kat seyreltme ile hesaplamaya katıldığında HCA-II için 8240 EU/ml olarak bulunur. Buna göre;

$$\text{HCA-I için spesifik aktivite (SA)} = 12000/0,37 = 32432$$

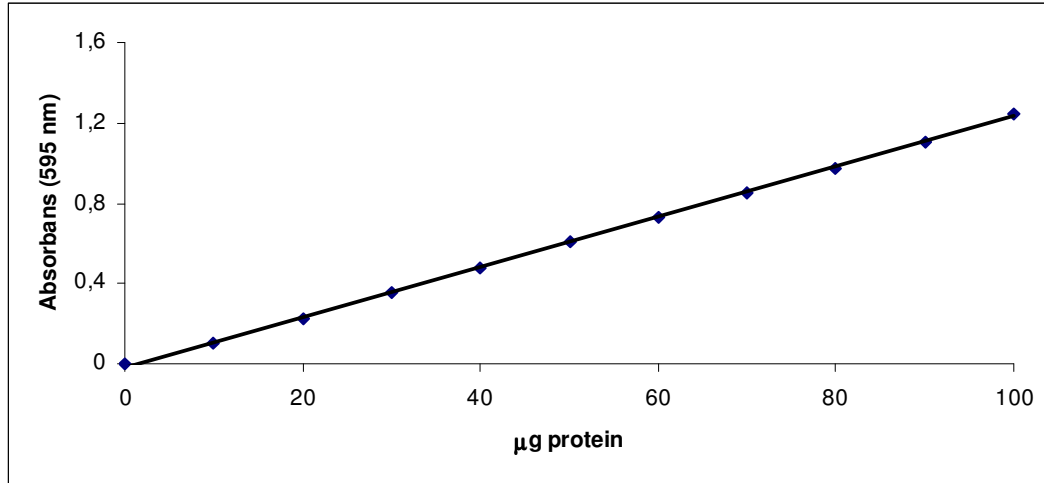
$$\text{HCA-II için spesifik aktivite (SA)} = 8240/0,13 = 63384$$

Bu değerlere göre, hemolizatin doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

$$\text{HCA-I enzimi, } 32432/15,12 = 2145 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

$$\text{HCA-II enzimi, } 63384/15,12 = 4192 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

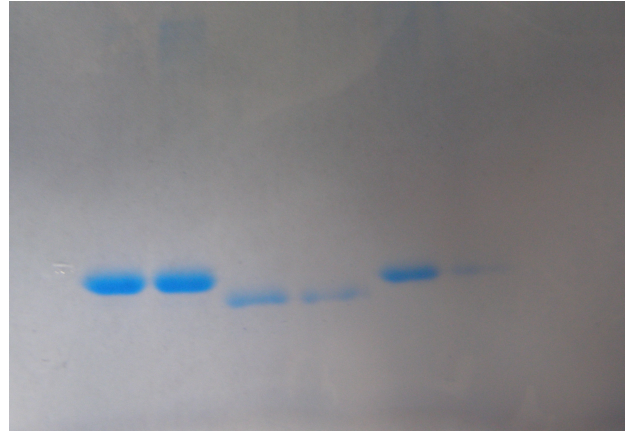
Kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem için önce standart bir eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbands değerlerinden faydalanarak, ölçülen absorbands değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları bulundu (şekil 4.2).



Şekil 4. 2 Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.

4. 2 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen HCA Enziminin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları

Afinite kolonundan saflaştırılan karbonik anhidraz enziminin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 3. 4. 5 'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine, insan kanından saflaştırılan enzim tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (şekil 4. 3).



Şekil 4. 3 Afinite kromotografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerini SDS-poliakrilamid jel elektrofrezine fotoğrafı (1.kanal: HCA-I, 2.kanal: BCA, 3.kanal: HCA-II)

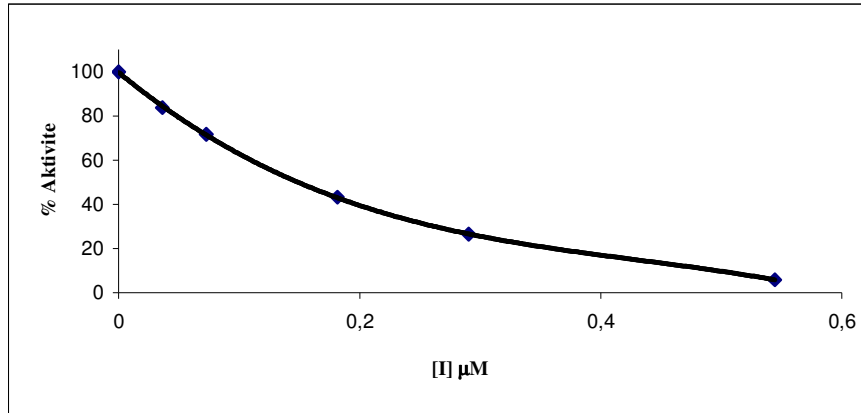
4. 3 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi

4. 3. 1. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi

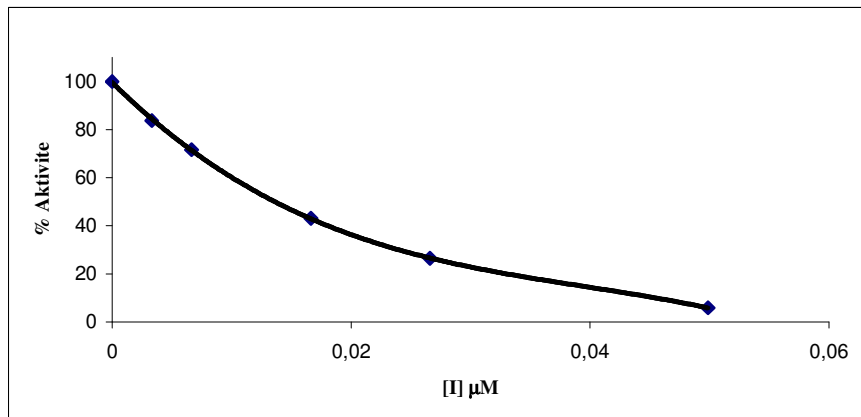
İnsan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen 11, 12, 13 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen HCA izoenzimleri 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).

Çizelge 4. 1 HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

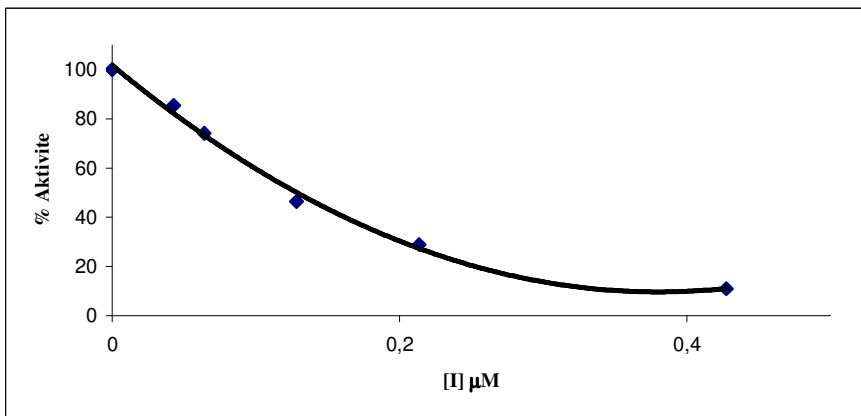
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO ₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] M
11	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	83,76	$3,63.10^{-8}$
	1	100	100	20	480	2,5	71,59	$7,25.10^{-8}$
	1	100	100	50	450	2,5	43,18	$1,81.10^{-7}$
	1	100	100	80	420	2,5	26,47	$2,90.10^{-7}$
	1	100	100	150	350	2,5	5,84	$5,44..10^{-7}$
12	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	83,76	$3,32.10^{-9}$
	1	100	100	20	480	2,5	71,59	$6,65.10^{-9}$
	1	100	100	50	450	2,5	43,18	$1,66.10^{-8}$
	1	100	100	80	420	2,5	26,47	$2,66.10^{-8}$
	1	100	100	150	350	2,5	5,84	$4,98.10^{-8}$
13	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	74,16	$4,27.10^{-8}$
	1	100	100	15	485	2,5	51,21	$6,41.10^{-8}$
	1	100	100	30	470	2,5	34,59	$1,28.10^{-7}$
	1	100	100	50	450	2,5	19,11	$2,13.10^{-7}$
	1	100	100	100	400	2,5	6,97	$4,27.10^{-7}$



Şekil 4. 4 HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (11) bileşiğinin etkisi



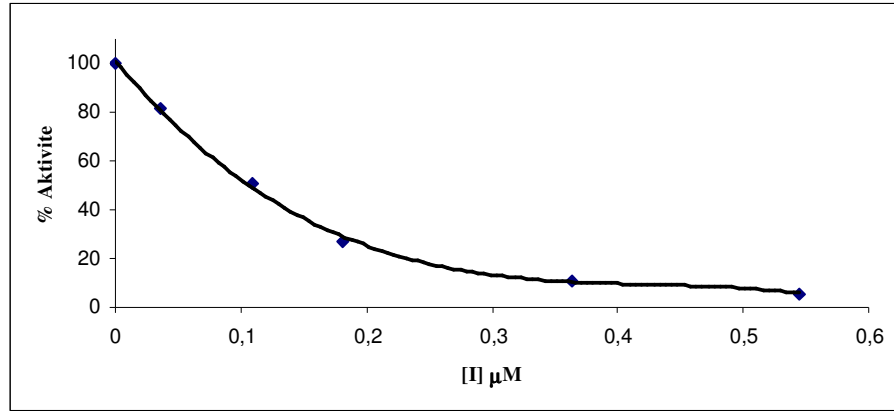
Şekil 4. 5 HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (12) bileşiğinin etkisi



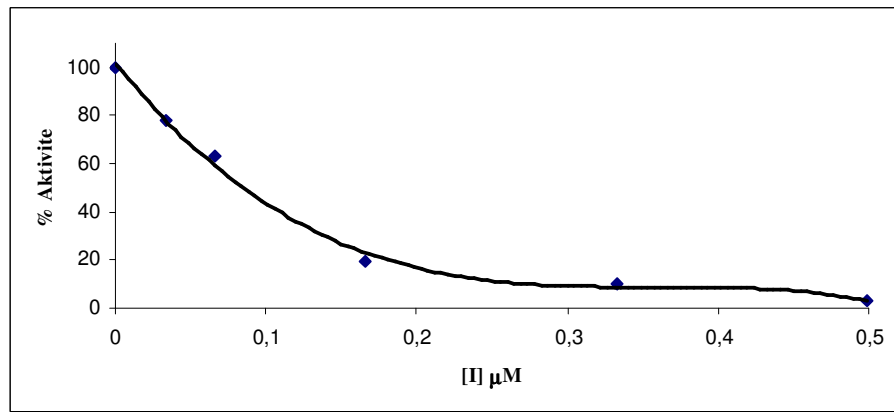
Şekil 4. 6 HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (13) bileşiğinin etkisi

Çizelge 4. 2 HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

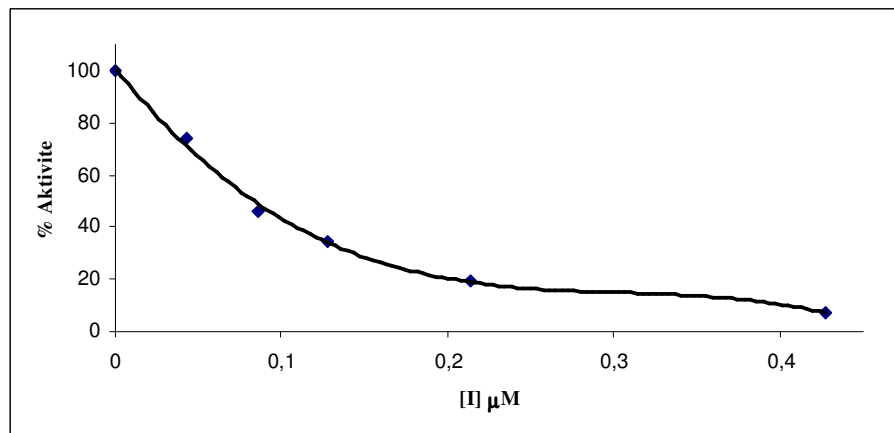
İnhibitör No	Veronal Tamponu (mL)	Brom Timol (µL)	Enzim (µL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µl)	Doygun CO₂ Çözeltisi (mL)	% Aktivite	[I] M
11	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	81,49	$0,36 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	30	470	2,5	50,61	$1,08 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	50	450	2,5	27,00	$1,81 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	100	400	2,5	11,11	$3,63 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	150	350	2,5	5,72	$5,44 \cdot 10^{-7}$
12	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	63,41	$3,32 \cdot 10^{-8}$
	1	100	100	20	480	2,5	45,12	$6,65 \cdot 10^{-8}$
	1	100	100	50	450	2,5	19,51	$1,66 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	100	400	2,5	10,19	$3,32 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	150	350	2,5	2,78	$4,98 \cdot 10^{-7}$
13	1	100	-	-	600	2,5	-	-
	1	100	100	-	500	2,5	100	0
	1	100	100	10	490	2,5	74,16	$4,27 \cdot 10^{-8}$
	1	100	100	20	480	2,5	51,21	$8,55 \cdot 10^{-8}$
	1	100	100	30	470	2,5	34,59	$1,28 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	50	450	2,5	19,11	$2,14 \cdot 10^{-7}$
	1	100	100	100	400	2,5	6,97	$4,27 \cdot 10^{-7}$



Şekil 4. 7 HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (11) bileşiğinin etkisi



Şekil 4. 8 HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (12) bileşiğinin etkisi



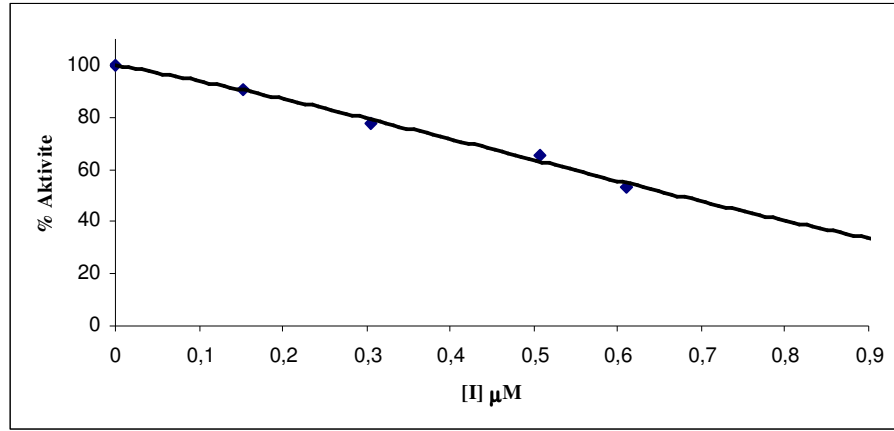
Şekil 4. 9.HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (13) bileşiğinin etkisi

4. 3. 2. Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin in vitro olarak incelenmesi

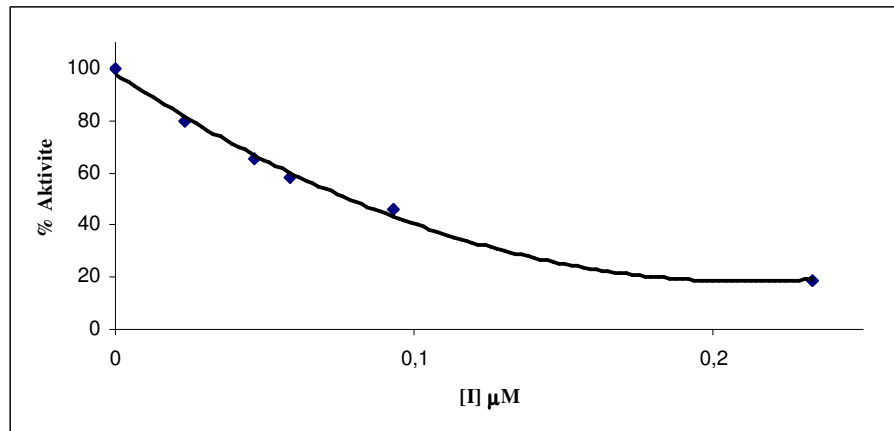
HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde 11, 12, 13 bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % l'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla insan kanından elde edilen HCA izoenzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir.

Çizelge 4. 3 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

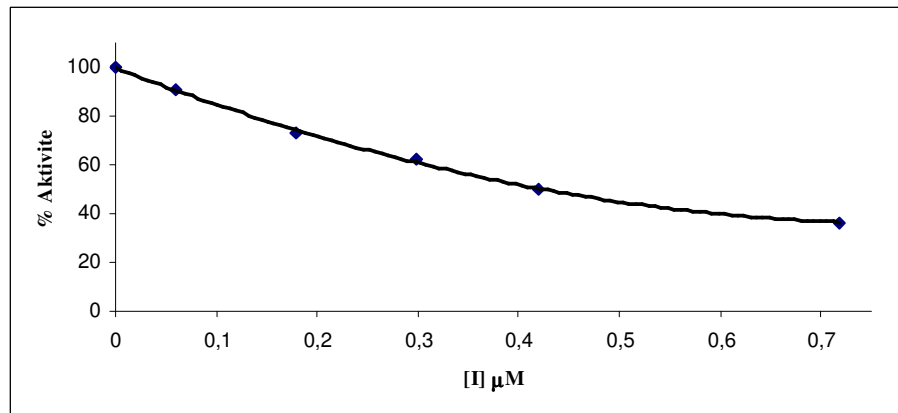
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampn (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] M
11	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	30	570	90,90	1,52.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	60	540	77,77	3,04.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	100	500	65,65	5,08.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	120	480	53,03	6,09.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	180	420	32,82	9,14.10 ⁻⁷
12	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	50	550	73,41	2,32.10 ⁻⁸
	1	1,3	0,1	100	500	65,19	4,65.10 ⁻⁸
	1	1,3	0,1	125	475	58,22	5,81.10 ⁻⁸
	1	1,3	0,1	200	400	46,20	9,31.10 ⁻⁸
	1	1,3	0,1	500	100	23,41	2,32.10 ⁻⁷
13	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	90,54	5,98.10 ⁻⁸
	1	1,3	0,1	30	570	72,97	1,79.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	50	550	62,16	2,99.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	70	530	50,00	4,18.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	120	480	36,48	7,18.10 ⁻⁷



Şekil 4. 10 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (11) bileşiğinin etkisi



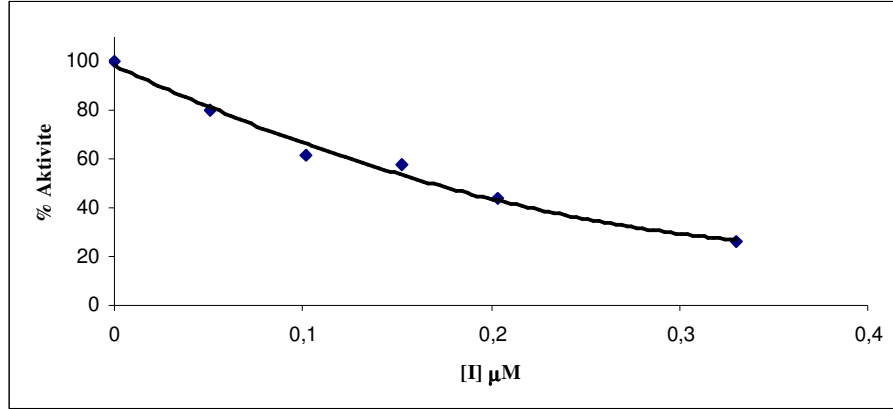
Şekil 4. 11 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (12) bileşiğinin etkisi



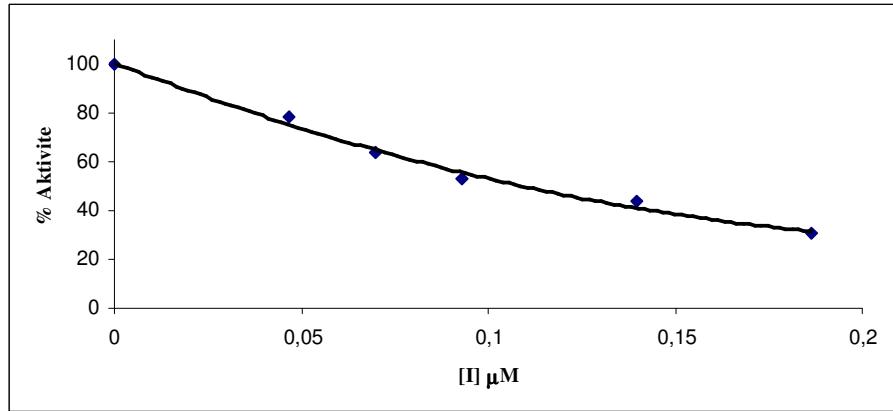
Şekil 4. 12 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine (13) bileşiğinin etkisi

Çizelge 4. 4 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 11, 12, 13 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

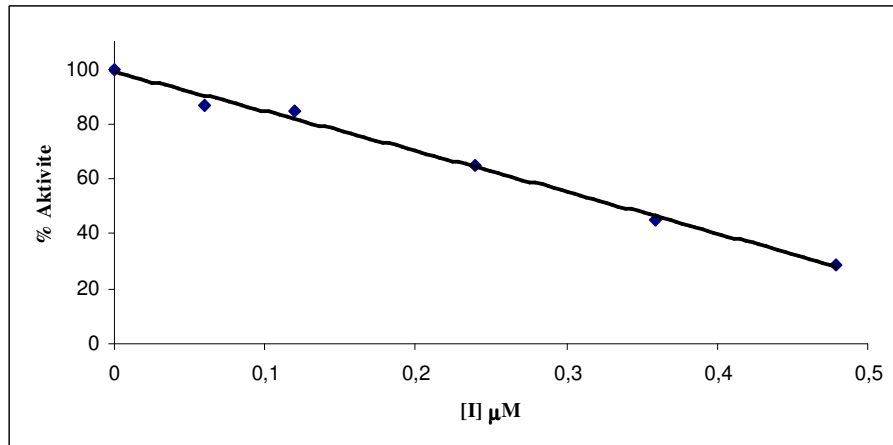
İnhibitör No	Substrat (mL)	SO ₄ Tris-Tampon (mL)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] M
11	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	68,69	0,51.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	20	580	61,73	1,02.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	30	570	57,39	1,52.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	40	560	43,47	2,03.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	65	535	26,08	3,30.10 ⁻⁷
12	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	78,18	0,46.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	15	585	63,63	0,69.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	20	580	52,72	0,93.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	30	570	43,63	1,40.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	40	560	30,91	1,86.10 ⁻⁷
13	1	1,3	0,1	-	600	100	0
	1	1,3	0,1	10	590	86,82	0,59.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	20	580	84,49	1,19.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	40	560	65,11	2,39.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	60	540	44,96	3,59.10 ⁻⁷
	1	1,3	0,1	80	520	28,68	4,78.10 ⁻⁷



Şekil 4. 13 HCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (11) bileşiğinin etkisi



Şekil 4. 14 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (12) bileşiğinin etkisi



Şekil 4. 15 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine (13) bileşiğinin etkisi

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA-II ve HCA-I izoenzimlerinin CO₂ hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, ve 4.9'daki grafiklerden hesaplanan I₅₀ değerleri toplu olarak çizelge 4. 5 verilmiştir.

Çizelge 4. 5 Sentezlenen bileşiklerin HCA izoenzimlerinin in vitro CO₂-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

Hidrataz I₅₀ (M)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
11	1,44.10 ⁻⁷	1,09.10 ⁻⁷
12	0,14.10 ⁻⁷	0,8.10 ⁻⁷
13	1,25.10 ⁻⁷	0,82.10 ⁻⁷

Sentezlenen inhibitörlerin eritrosit HCA izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15'deki grafiklerden) hesaplanan I₅₀ değerleri toplu olarak çizelge 4. 6'da verilmiştir.

Çizelge 4. 6 Sentezlenen bileşiklerin HCA izoenzimlerinin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

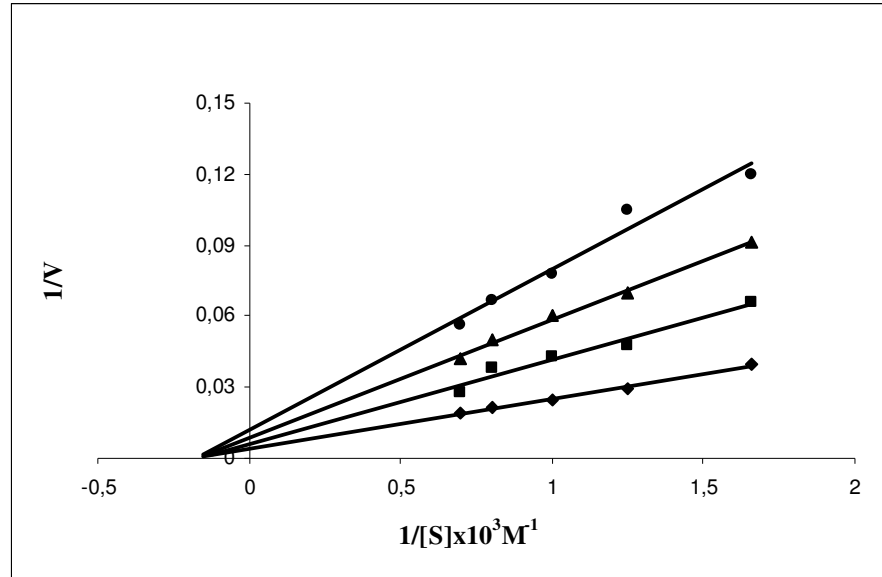
Esteraz I₅₀ (M)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
11	6,8. 10 ⁻⁷	1,8.10 ⁻⁷
12	0,85.10 ⁻⁷	1.10 ⁻⁷
13	4,19.10 ⁻⁷	3,2.10 ⁻⁷

4. 4 Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K_i Sabitlerinin Bulunması

İnhibitör çalışmaları için sentezlenen sülfonamid bileşikleri olan 11, 12, 13 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) $\mu\text{mol/dakika}$ 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.

Çizelge 4. 7 HCA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 11 bileşiminin in vitro inhibisyon etkisi ve K_i elde etmek için yapılan işlem sonuçları

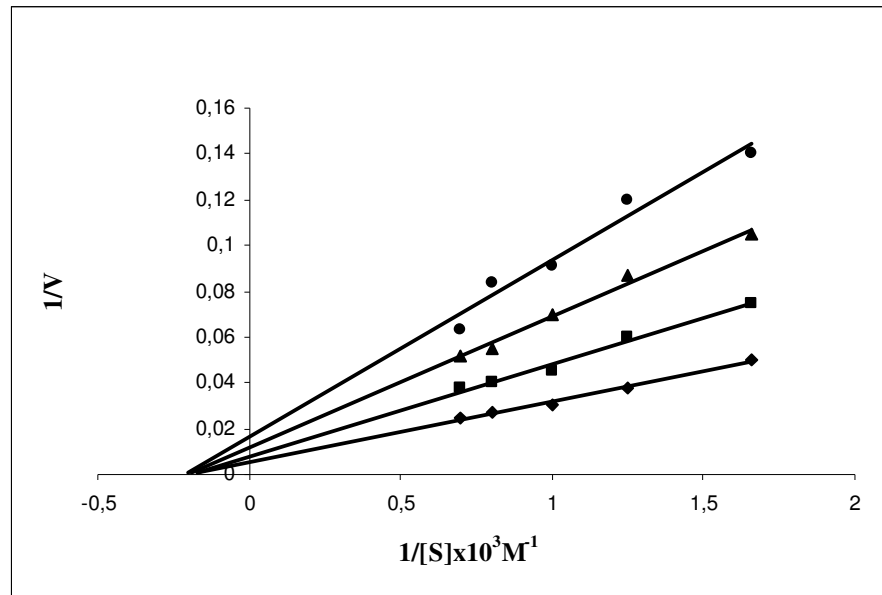
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
11	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,040
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,029
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,024
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,021
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,019
	0,6	1,3	0,1	50	0,95	1,66	0,065
	0,8	1,3	0,1	50	0,75	1,25	0,048
	1,0	1,3	0,1	50	0,55	1,0	0,043
	1,2	1,3	0,1	50	0,35	0,8	0,038
	1,4	1,3	0,1	50	0,15	0,7	0,028
	0,6	1,3	0,1	70	0,93	1,66	0,092
	0,8	1,3	0,1	70	0,73	1,25	0,070
	1,0	1,3	0,1	70	0,53	1,0	0,060
	1,2	1,3	0,1	70	0,33	0,8	0,050
	1,4	1,3	0,1	70	0,13	0,7	0,042
	0,6	1,3	0,1	120	0,88	1,66	0,120
	0,8	1,3	0,1	120	0,68	1,25	0,105
	1,0	1,3	0,1	120	0,48	1,0	0,078
1,2	1,3	0,1	120	0,28	0,8	0,067	
1,4	1,3	0,1	120	0,08	0,7	0,056	



Şekil 4. 16 HCA-I enzimi üzerinde (11) bileşiminin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 8 HCA I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 12 bileşiminin in vitro inhibisyon etkisi ve K_i elde etmek için yapılan işlem sonuçları

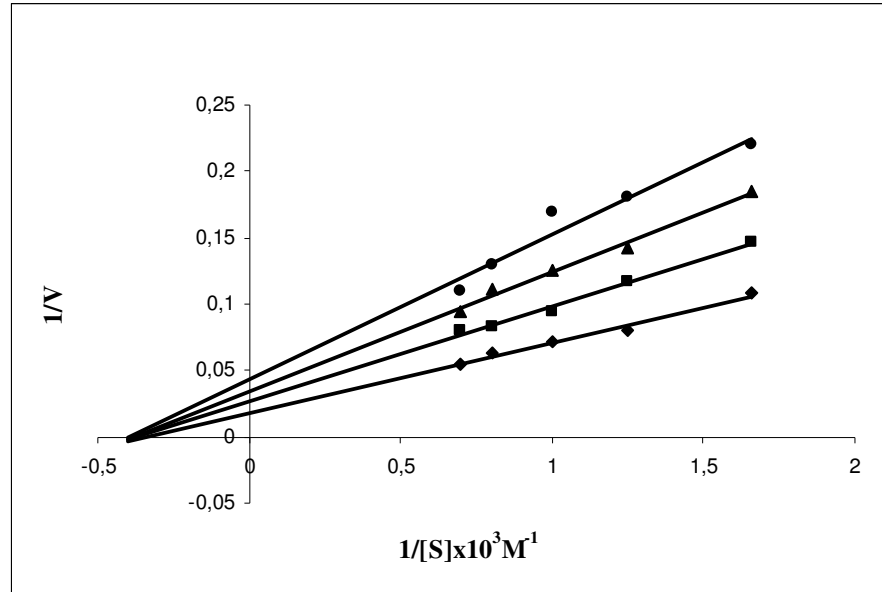
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
12	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,050
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,038
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,030
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,027
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,025
	0,6	1,3	0,1	100	0,90	1,66	0,075
	0,8	1,3	0,1	100	0,70	1,25	0,060
	1,0	1,3	0,1	100	0,50	1,0	0,045
	1,2	1,3	0,1	100	0,30	0,8	0,040
	1,4	1,3	0,1	100	0,10	0,7	0,038
	0,6	1,3	0,1	200	0,80	1,66	0,105
	0,8	1,3	0,1	200	0,60	1,25	0,087
	1,0	1,3	0,1	200	0,40	1,0	0,070
	1,2	1,3	0,1	200	0,20	0,8	0,055
	1,4	1,3	0,1	200	-	0,7	0,052
	0,6	1,3	0,1	300	0,70	1,66	0,140
	0,8	1,3	0,1	300	0,50	1,25	0,120
	1,0	1,3	0,1	300	0,30	1,0	0,091
	1,2	1,3	0,1	300	0,10	0,8	0,083
	1,4	1,3	0,1	300	-	0,7	0,063



Şekil 4. 17 HCA-I enzimi üzerinde (12) bileşiminin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 9 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 13 bileşiminin in vitro inhibisyon etkileri ve K_i elde etmek için yapılan işlem sonuçları

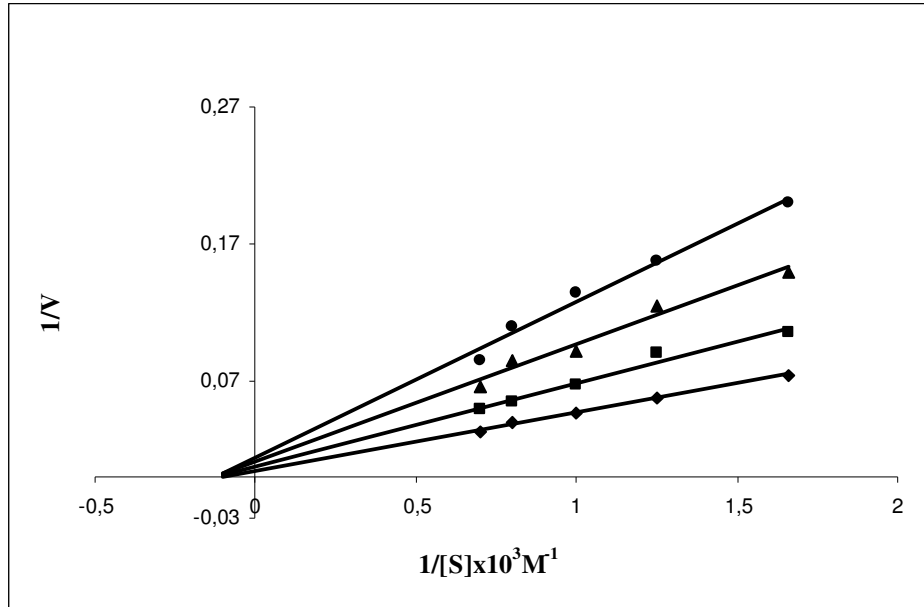
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	1/[S] 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
13	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,1080
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,081
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,071
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,063
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,055
	0,6	1,3	0,1	50	0,95	1,66	0,147
	0,8	1,3	0,1	50	0,75	1,25	0,116
	1,0	1,3	0,1	50	0,55	1,0	0,094
	1,2	1,3	0,1	50	0,35	0,8	0,083
	1,4	1,3	0,1	50	0,15	0,7	0,080
	0,6	1,3	0,1	70	0,93	1,66	0,185
	0,8	1,3	0,1	70	0,73	1,25	0,143
	1,0	1,3	0,1	70	0,53	1,0	0,125
	1,2	1,3	0,1	70	0,33	0,8	0,111
	1,4	1,3	0,1	70	0,13	0,7	0,094
	0,6	1,3	0,1	120	0,88	1,66	0,220
	0,8	1,3	0,1	120	0,68	1,25	0,180
	1,0	1,3	0,1	120	0,48	1,0	0,169
1,2	1,3	0,1	120	0,28	0,8	0,130	
1,4	1,3	0,1	120	0,08	0,7	0,110	



Şekil 4. 18 HCA-I enzimi üzerinde (13) bileşiminin Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4. 10 HCA II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 11 bileşiminin in vitro inhibisyon etkisi ve K_i elde etmek için yapılan işlem sonuçları

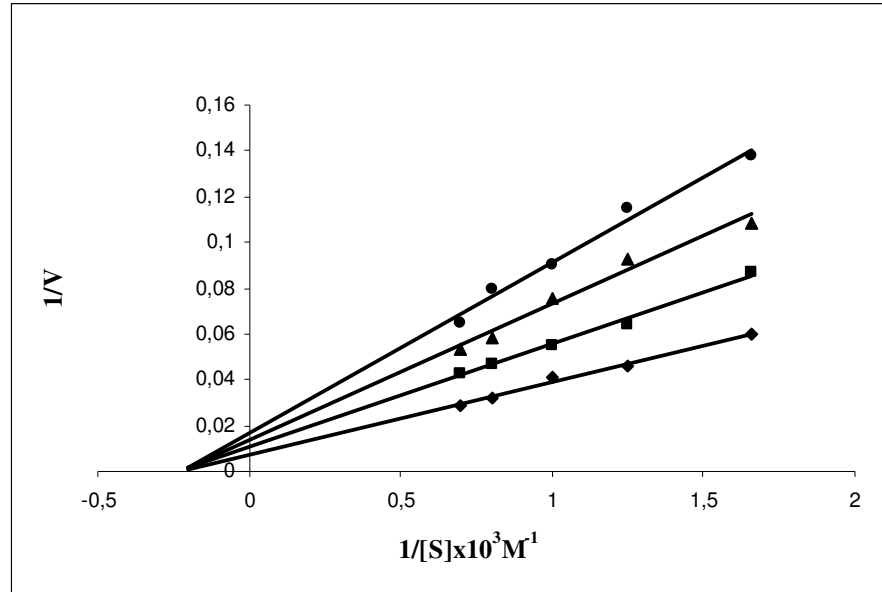
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
11	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,0746
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,057
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,047
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,040
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,033
	0,6	1,3	0,1	10	0,99	1,66	0,1059
	0,8	1,3	0,1	10	0,79	1,25	0,090
	1,0	1,3	0,1	10	0,59	1,0	0,067
	1,2	1,3	0,1	10	0,39	0,8	0,055
	1,4	1,3	0,1	10	0,19	0,7	0,050
	0,6	1,3	0,1	40	0,96	1,66	0,150
	0,8	1,3	0,1	40	0,76	1,25	0,125
	1,0	1,3	0,1	40	0,56	1,0	0,093
	1,2	1,3	0,1	40	0,36	0,8	0,085
	1,4	1,3	0,1	40	0,16	0,7	0,066
	0,6	1,3	0,1	70	0,93	1,66	0,20
	0,8	1,3	0,1	70	0,73	1,25	0,157
	1,0	1,3	0,1	70	0,53	1,0	0,135
	1,2	1,3	0,1	70	0,33	0,8	0,110
	1,4	1,3	0,1	70	0,13	0,7	0,085



Şekil 4. 19 HCA-II enzimi üzerinde (11) bileşiminin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4. 11 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 12 bileşiminin in vitro inhibisyon etkileri ve K_i elde etmek için yapılan işlem sonuçları

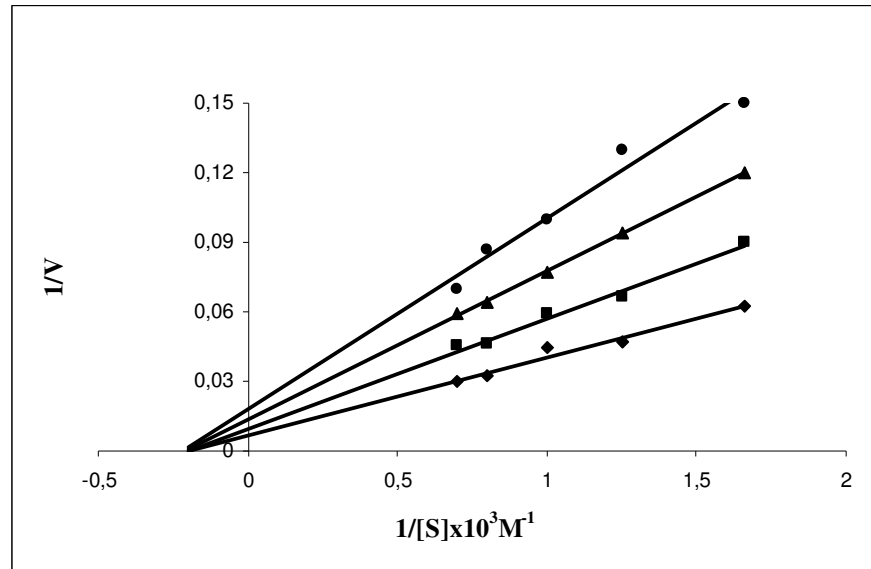
İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	1/[S] x 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
12	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,0598
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,046
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,041
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,032
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,029
	0,6	1,3	0,1	10	0,99	1,66	0,087
	0,8	1,3	0,1	10	0,79	1,25	0,064
	1,0	1,3	0,1	10	0,59	1,0	0,055
	1,2	1,3	0,1	10	0,39	0,8	0,047
	1,4	1,3	0,1	10	0,19	0,7	0,043
	0,6	1,3	0,1	20	0,98	1,66	0,108
	0,8	1,3	0,1	20	0,78	1,25	0,093
	1,0	1,3	0,1	20	0,58	1,0	0,076
	1,2	1,3	0,1	20	0,38	0,8	0,058
	1,4	1,3	0,1	20	0,18	0,7	0,054
	0,6	1,3	0,1	40	0,96	1,66	0,138
	0,8	1,3	0,1	40	0,76	1,25	0,115
	1,0	1,3	0,1	40	0,56	1,0	0,09
1,2	1,3	0,1	40	0,36	0,8	0,080	
1,4	1,3	0,1	40	0,16	0,7	0,065	



Şekil 4. 20 HCA-II enzimi üzerinde (12) bileşiminin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4. 12 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 13 bileşiğinin in vitro inhibisyon etkileri ve K_i elde etmek için yapılan işlem sonuçları

İnhibitör No	Substrat (ml)	Tris-SO ₄ tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	1/[S] 10 ³ (M ⁻¹)	1/V (mol/dak.) ⁻¹
13	0,6	1,3	0,1	-	1,0	1,66	0,0625
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	1,25	0,047
	1,0	1,3	0,1	-	0,6	1,0	0,044
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	0,8	0,032
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	0,7	0,030
	0,6	1,3	0,1	40	0,96	1,66	0,090
	0,8	1,3	0,1	40	0,76	1,25	0,067
	1,0	1,3	0,1	40	0,56	1,0	0,059
	1,2	1,3	0,1	40	0,36	0,8	0,046
	1,4	1,3	0,1	40	0,16	0,7	0,045
	0,6	1,3	0,1	60	0,94	1,66	0,12
	0,8	1,3	0,1	60	0,74	1,25	0,094
	1,0	1,3	0,1	60	0,54	1,0	0,077
	1,2	1,3	0,1	60	0,34	0,8	0,064
	1,4	1,3	0,1	60	0,14	0,7	0,060
	0,6	1,3	0,1	80	0,92	1,66	0,150
	0,8	1,3	0,1	80	0,72	1,25	0,130
	1,0	1,3	0,1	80	0,52	1,0	0,10
1,2	1,3	0,1	80	0,32	0,8	0,087	
1,4	1,3	0,1	80	0,12	0,7	0,070	



Şekil 4. 21 HCA-II enzimi üzerinde (13) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4. 13 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit HCA izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

HCA-II İÇİN SONUÇLAR				
İnhibitör	[I] (M)	K_i (M)	Ortalama K_i (M)	İnhibisyon Türü
11	$5,08. 10^{-8}$	$8,71. 10^{-8}$	$1,41. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$2,03. 10^{-7}$	$1,63. 10^{-7}$		
	$3,56. 10^{-7}$	$1,72. 10^{-7}$		
12	$4,65. 10^{-8}$	$1,10. 10^{-7}$	$1,21. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$9,31. 10^{-8}$	$1,11. 10^{-7}$		
	$1,86. 10^{-7}$	$1,41. 10^{-7}$		
13	$2,39. 10^{-7}$	$5,70. 10^{-7}$	$4,0. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$3,59. 10^{-7}$	$3,64. 10^{-7}$		
	$4,78. 10^{-7}$	$2,95. 10^{-7}$		
HCA-I İÇİN SONUÇLAR				
İnhibitör	[I] (M)	K_i (M)	Ortalama K_i (M)	İnhibisyon Türü
11	$2,54. 10^{-7}$	$4,20. 10^{-7}$	$3,24. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$3,55. 10^{-7}$	$2,65. 10^{-7}$		
	$6,09. 10^{-7}$	$2,89. 10^{-7}$		
12	$4,65. 10^{-7}$	$1,02. 10^{-6}$	$1,03. 10^{-6}$	Yarışmasız
	$9,31. 10^{-7}$	$8,39. 10^{-7}$		
	$2,32. 10^{-6}$	$1,23. 10^{-6}$		
13	$2,99. 10^{-7}$	$6,64. 10^{-7}$	$5,50. 10^{-7}$	Yarışmasız
	$4,18. 10^{-7}$	$4,77. 10^{-7}$		
	$7,18. 10^{-7}$	$5,13. 10^{-7}$		

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidroliz E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimidir [5]. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda CO_2 'in hidratasyon ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.

Bu çalışmada glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen (11), (12), (13) no'lu karbonik anhidraz inhibitörlerinin insan karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri, aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler, $R-SO_2NH_2$ kimyasal yapısına sahiptir. Bu amaçla birçok sülfonamid türevi sentezlenmiş ve göz epitelyumunda bulunan HCA-II üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır.

Glokom hastalığı tedavisinde asetazolamid uzun yıllar kullanılmıştır. Daha sonra 1995 yılında dorzolamid ve 1999 yılında da brinzolamid kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır.. Bu ilaçlar tedavide etkili ilaçlardır. Fakat bu ilaçların birçok yan etkisi olmasından dolayı yeni ilaçlar sentezlenmeye ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışmamızda üniversitemizde proje kapsamında sentezlenen yeni bileşiklerin HCA üzerinde inhibisyon etkileri çalışılmıştır.

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. p-nitro fenilasetat suda çözünmediği için ilk önce asetonda çözüldü ve daha sonra sulu çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak asetonun kullanılmasının sebebi ise asetonun hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olmasıdır. Bu aktivite tayininde yarışmasız inhibisyon türü gözlenmektedir. Bunun nedeni ise substrat olarak kullanılan p-nitrofenil

asetat enzimin aktif bölgesine çok yakın olan histidin amino asidinin imidazol halkasına bağlanmaktadır. Sülfonamid inhibitörleri ise enzimin aktif bölgesindeki çinkoya bağlı OH grubuna bağlanır. Dolayısıyla substrat ve inhibitör farklı yerlere bağlandığı için herhangi bir yarış söz konusu değildir.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede I_{50} değerleri kullanılmaktadır. İnsan CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (11), (12), (13) 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 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 (11), (12), (13) no'lu bileşiklerin HCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda çizilen %Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan I_{50} değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

Hidrataz I_{50} (M)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
asetazolamid	$8,3.10^{-7}$	$5,7. 10^{-7}$
tiyadiazol	$4,2. 10^{-6}$	$4,8. 10^{-6}$
11	$1,44.10^{-7}$	$1,09.10^{-7}$
12	$0,14.10^{-7}$	$0,8.10^{-7}$
13	$1,25.10^{-7}$	$0,82.10^{-7}$

HCA enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde (11), (12), (13) no'lu bileşiklerin 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.

İnsan eritrosit HCA izoenzimleri için K_i değerlerinin tesbitinde Lineweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Bu amaçla üç farklı inhibitör konsantrasyonu için beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapıldı.

Sentezlenen (11), (12), (13) no'lu bileşiklerinin 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} (M)		
İnhibitör	HCA-I	HCA-II
asetazolamid	$8,76.10^{-7}$	$4,72.10^{-7}$
tiyadiazol	$8,5.10^{-7}$	$5,2. 10^{-7}$
11	$6,8. 10^{-7}$	$1,8.10^{-7}$
12	$0,85.10^{-7}$	$1.0.10^{-7}$
13	$4,19.10^{-7}$	$3,2.10^{-7}$

Çalışmalar sonucunda (11), (12), (13) no'lu bileşiklerinin HCA-II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri (sırasıyla $1,09.10^{-7}$, $0,8.10^{-7}$, $0,82.10^{-7}$) olarak bulunmuştur. HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri ise (sırasıyla $1,44.10^{-7}$, $0,14.10^{-7}$, $1,25.10^{-7}$) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimi üzerinde (11), (12), (13) no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilir inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.(11), (12), (13) no'lu bileşiklerin HCA-II esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri (sırasıyla $1,8.10^{-7}$, $1,0.10^{-7}$, $3,2.10^{-7}$) olarak bulunmuştur. HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisini veren I_{50} değerleri ise (sırasıyla $6,8.10^{-7}$, $0,85.10^{-7}$, $4,19.10^{-7}$) olarak bulunmuştur İnsan CA-II izoenzimi üzerinde (11), (12), (13) no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilir inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin çizelge 4.11'deki sonuçlara göre HCA-II üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, (11) bileşiği için, ($K_i= 1,41.10^{-7}$), (12) bileşiği için, ($K_i= 1,21.10^{-7}$) ve (13) bileşiği için, ($K_i=4,0.10^{-7}$)'dir. HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde ise, (11) bileşiği için, ($K_i= 3,24.10^{-7}$), (12) bileşiği için, ($K_i= 1,03.10^{-7}$) ve (13) bileşiği için, ($K_i=5,50.10^{-7}$)'dir.

Bu değerlere göre (11), (12), (13) bileşikleri çıkış maddelerine göre HCA enzimleri üzerinde daha iyi inhibisyon etkilerine sahiptirler ve ileride glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday bileşiklerdir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s.
- [2] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- [3] Dikmen, N. ve Özgünen, T. , 2004 Harper Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 928s.
- [4] İnan, Y. ve Gül, M., 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s.
- [5] Arslan, O.,2003 Biyomoleküler Teori ve Uygulamaları , 117s
- [6] Keha, E. E., 1981, Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi
- [7] Lindskog, S., 1997, Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharma col. Ther.*74, 1-20 p.
- [8] Van Slyke, D. O. and Hawkins, J. A., 1930, 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.
- [9] Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. W., 1933, Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.*, 80, 113 p.
- [10] Daveport, H. W., Wilhelmi, A.E., 1941, Renal carbonic anhydrase *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*48, 53
- [11] Daveport, H. W., 1946, Carbonic anhydrase in tissues other than blood. *Physiol. Rev.* 26, 560 p.
- [12] Common, R. H., 1941, The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct. *J. Agric. Sci.*, 31, 412 p.
- [13] Pocker, Y., and Sarkanen, S.,1979, Carbonic anhydrase: Structure, Catalytic Versatilitiy and inhibition, *Advances in Enzymology*, İnterscience, New York, 49,149
- [14] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, Italy, 1, 61-97 p.
- [15] Ren, X. and Lindskog, S., 1992, Buffer dependence of CO₂ hydration catalyzed by human carbonic anhydrase. I. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1120, 81-86 p.
- [16] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 67, 375-401 p.
- [17] Renzi, G., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2000. Carbonic anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incoparating Secondary Amine Moieties. *Bioorg. Med. Chem.*, Italy, 10, 673-676 p.
- [18] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 64, 375-401 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [19] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., LaNoue, K.F. and Lynch, C.J., 1996, Differentiation – dependent expression of CA and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEBJ*, 10, 481-490 p.
- [20] Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H. and Tashian, R. E., 1996, Expression of carbonic anhydrase of mouse VII. in *E. Coli*. And demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 226, 268-272 p.
- [21] Hewett-Emmett, D. and Tashian, R.E , 1996, Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of α , β and γ carbonic anhydrase gene families . *Mol. Phylogenet. Evol.* 5:50-77
- [22] Fukuzawa, H., Fujiwara , S Yamamoto, Y., Dionisio-Sese, M. L and Miyachi, S ,1990 cDNA cloning sequence and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: regulation by environmental CO₂ concentration .*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4383-4387
- [23] Kamo, T., Shimogawara, K., Fukuzawa, H., Muto, S. and Miyachi, S. 1990 Subunit constitution of carbonic anhydrase from *Chlamydomonas reinhardtii* E:ur. *J Biochem.* 192:557-562
- [24] Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipls, P. J., Silverman, D. N. and Christianson, D. W., 1995, Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase. V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92, 10949 – 10953 p.
- [25] Lesburg, C. A. and Christianson, D. W., 1995, X – ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117 6368-6844 p.
- [26] Björkbacka, H., Johansson, I. M. , Skarfstad, E. and Formsan, C., 1997, The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochem.*, in press.
- [27] Kisker, C., Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G. and Rees, D. C. 1996, A left handed β - helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*. *EMBO I* 15; 2323-2330 p.
- [28] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 p.
- [29] Stams, T., Chen, Y., Boriack – Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis. P. and Christianson, D. W., 1998, *Protein Sci.*, 7, 556 p.
- [30] Briganti, F., Pierattelli, A, Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996 *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001 p.
- [31] Lindskog, S. and Malmström, B.G. 1962 Metal binding and catalytic activity in bovine carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.* 237:1129-1137.
- [32] Lindskog, S. and Nyman, P.O. 1964 Metal-binding properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *Biochem. Biophys. Acta* 85: 462-474

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [33] Hunt, J. B., Rhee, M.J and Storm, C.B 1977 A rapid and convenient preparation of apocarbonic anhydrase. *Anal. Biochem.* 79:614-617
- [34] Bertini, I. and Luchinat, C. 1983 Cobalt (II) as a probe of the structure and function of carbonic anhydrase. *Acc. Chem. Res.* 16: 272-279
- [35] Bertini, I. and Luchinat, C. 1984 The structure of cobalt(II) substituted carbonic anhydrase and its implications for the catalytic mechanism of the enzyme. *Ann. NY Acad. Sci.* 429:89-98
- [36] Lindskog, S. 1983 Carbonic Anhydrase. In: *Zinc Enzymes*, pp.78-121, Spiro, T.G(ed.) Wiley, New York.
- [37] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- [38] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p.
- [39] Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221 p.
- [40] Lindskog, S., 1982, Carbonic anhydrase. In *Advances in horganik Biochem.*, 4, 115-170. Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue, Y., 1994, Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p.
- [41] Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue, Y. 1994, Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p.
- [42] Mangani, S. and Hakansson, K 1992, 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.
- [43] Simonsson, I. and Lindskog, S. 1982, The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.* 123 : 29-36 p.
- [44] Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. and Liljas, A. 1992, Structure of native and apo carbonic anhydrase II. *J. Mol. Biol.* 227 : 1192-1204 p.
- [45] Roughton, F. J. W. and Booth, V. H. 1946, The Effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* (40) : 319 p.
- [46] Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van
- [47] Lindskog, S. and Wistrand, P. J. 1988, Inhibitors of carbonic anhydrase. In: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, pp. 698-723 p.
- [48] Liesegang, T. J., 1996, Glaucoma: Changing Concepts and Future Directions, *Mayo Clin. Proc.*, 71, 689 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [49] Chiou, C. Y., 1981, *Biochem. Pharm.*, 30, 103 p.
- [50] Wilson MR and Martane JF. 1996, Epidemiology of chronic open – angle glaucoma in : *The Glaucomas*. Ritch R, Shields MB, Krupin, (eds), StLouis Masby,; 735-68 p..
- [51] Wiggs J. L., 1995, *Genetics of Glaucoma Ophthalmol Clin. Nort. Am.*: 203-14 p.
- [52] 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, 1996; 1507-17
- [53] James B. Blood flow in the pathogenesis of glaucoma. *Current opinion in ophthalmology* 1993; 4:65-72
- [54] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [55] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2000, Carbonic Anhydrase inhibitors – Part 94. 1, 3, 4 – thiadiazole – 2 sulfonamide derivatives as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.*, 35, 867 – 874 p.
- [56] Taşkesen, M, 2002 Glokom tedavisinde kullanılan yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi. Yüksek lisans tezi , Harran Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı
- [57] Maren, T. H. and Jankowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. *Cur. Eye. Res.*, 4, 399 p.
- [58] Sugrue, M. F., 1996, The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, 363-376 p.
- [59] Conroy, C. W., 1997, Sulfonamides do not reach the retina in therapeutic amounts after topical application to the cornea. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 13, 465 – 472 p.
- [60] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 p.
- [61] Maren, C. H., 1960, A simplified micro method for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26 p.
- [62] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of carbonic anhydrase activity. *J. Pharm. And Toxicol. Meth.*, 38, 169 – 172 p.
- [63] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 214, 5137 p.
- [64] Kandel, M., Gonall, A. G., Wong, S. and Kondel, S. I., 1970, Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. *J. Biol. Chem.*, 245, 2444 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [65] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 7, 14 p.
- [66] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997, A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Tr. J. of Med. Sci.*, 27, 559 p.
- [67] Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoğlu, B., 1997, Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 515 – 518 p.
- [68] Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680 p.
- [69] Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 p.
- [70] Temizkan, G. ve Arda, N. 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri.