

PİRAZOL KARBOKSİLİK ASİTLERİN  
NİTRO TÜREVLERİNİN SIĞIR KARBONİK ANHİDRAZ  
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatih KARABULUT

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Ocak - 2008

PİRAZOL KARBOKSİLİK ASİTLERİN  
NİTRO TÜREVLERİNİN SIĞIR KARBONİK ANHİDRAZ  
ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatih Karabulut

Dumlupınar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü yönetmeliği uyarınca  
Kimya Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Ocak – 2008

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Fatih KARABULUT'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Pirazol karboksilik asitlerin nitro türevlerinin sığır karbonik anhidraz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ / 2008

**İmza:**

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÜYE: Doç. Dr. Asım OLGUN

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2007 gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. M. Sabri ÖZYURT  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## PİRAZOL KARBOKSİLİK ASİTLERİN NİTRO TÜREVLERİNİN SIĞIR KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fatih KARABULUT

Kimya, Yüksek Lisans Tezi, 2007 Tez

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

### ÖZET

Karbonik anhidraz (EC. 4. 2. 1. 1),  $\text{CO}_2$ 'in,  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen, çinko iyonlu metaloenzimlerden biridir. İnsan gözünde CA-I, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bulunur. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aköz humorun salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncın (IOP) düşürdükleri için, glaucoma hastalığı tedavisinde etkili olarak kullanılırlar.

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

Önce sığır eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimleri afinite jeli kullanılarak (Sepharose-4B-L-tirozin-sülfonilamid) saflaştırılmış ve daha sonra bu enzimlerle kinetik çalışmalar yapılmıştır.

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin (4, 5, 6) sığır eritrosit BCA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitesinden faydalanıldı. BCA'nın hidrataz ve esteraz aktivitesi üzerinde 4, 5, 6 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulunmuştur.  $\text{CO}_2$ -Hidrataz aktivitesine göre inhibisyon gösteren 4, 5 ve 6 bileşiklerinin  $I_{50}$  değerleri (enzimli reaksiyon süresini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); BCA için  $0,52 \cdot 10^{-7}$  ile  $1,79 \cdot 10^{-7}$  M arasında bulundu. p-Nitrofenil asetatı hidroliz aktivitesi olan esteraz aktivitesine göre ise; BCA için  $1,44 \cdot 10^{-7}$  ile  $3,91 \cdot 10^{-7}$  M arasında  $I_{50}$  değerleri bulundu.

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

# THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NITRO DERIVATIVES OF PYRAZOL CARBOXYLIC ACIDS ON BOVINE CARBONIC ANHYDRASE ENZYME

Fatih KARABULUT

Chemistry, M.S. Thesis, 2007

Thesis Supervisor: Asst. Prof. Dr. Metin BULBUL

## SUMMARY

Carbonic anhydrases (E.C. 4.2.1.1.) are family of zinc metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide in a two-stop reaction to yield bicarbonate and proton. The isoenzymes of human eye are CA-I, CAII and CA-IV. Carbonic anhydrase inhibitors, which reduce aqueous production with a corresponding decrease in intraocular pressure (IOP), have been used as ocular hypotensive agents for the treatment of glaucoma.

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

First, carbonic anhydrase enzymes from bovine erythrocyte were, purified using affinity gel and all of the investigations were carried out with these enzymes.

Later, inhibition effects of these new compounds (4, 5, 6) on bovine carbonic anhydrase enzymes (BCA) have been 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 (4, 5, 6) compounds show inhibition effect on BCA hydratase and esterase activity.  $I_{50}$  values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For (4), (5), (6), compounds of  $\text{CO}_2$ -hydratase activity, inhibition effect ranged from  $0,52 \cdot 10^{-7}$  to  $1,79 \cdot 10^{-7}$  M for BCA with  $I_{50}$  (molarity of inhibitor producing a %50 inhibition of CA activity). As for esterase activity of p-nitrophenyl acetate, (4), (5), (6) compounds have inhibition ranging from  $1,44 \cdot 10^{-7}$  to  $3,91 \cdot 10^{-7}$  M for BCA with  $I_{50}$ .

**Key Words:** Glaucoma,  $I_{50}$  Values, Carbonic Anhydrase, Sulfonamides

## TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında, bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bۆlüm BaŐkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĞAN'a, bu tez çalıŐmasının planlanması ve yürütölmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e. yakın ilgi ve alakalarını gördüğüm, Kimya Bۆlümünün değerli öğretim elemanlarına ve yüksek lisans arkadaşlarıma teŐekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca yanımda olup beni her zaman destekleyen aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Fatih KARABULUT

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
ÖZET.....	iv
SUMMARY .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	17
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	17
3.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	17
3.3 Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	18
3.4 Yöntemler .....	20
3.4.1 Protein Tayini .....	20
3.4.1.1. Kalitatif Protein Tayini.....	20
3.4.1.2. Coomassie Blue Yöntemi ile Protein Tayini .....	20
3.4.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini .....	20
3.4.2.1. CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi Tayini.....	20
3.4.2.2. Esteraz Aktivitesi Tayini .....	21
3.4.3. Sığır Eritrositlerinden Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Saflaştırılması .....	22
3.4.3.1. Sepharose-4B Matrisi Üzerinde Afinite Jelinin Hazırlanışı .....	22
3.4.3.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Enzimlerin Saflığının Kontrolü.....	24
3.5 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi.....	25
3.5.1 Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	25

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

3. 5. 2 Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	25
3. 5. 3. Sentezlenen Bileşiklerin Eritrosit BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin $K_i$ Sabitleriyle Bulunması.....	26
4 ARAŞTIRMA BULGULARI .....	27
4. 1 BCA Enziminin Afinite Kromatoğrafisi ile Saflaştırılması Sonuçları .....	27
4. 2 Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA Enziminin SDS-Poliakrilamid jel Elektroforezi Sonuçları.....	28
4. 3 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi ....	29
4. 3. 1 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA enziminin Hidrataz Aktiviteleri Üzerinde inhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....	29
4. 3. 2 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin <i>In Vitro</i> Olarak İncelenmesi .....	32
4. 4 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından $K_i$ Sabitlerinin Bulunması .....	36
5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	41
5. KAYNAKLAR .....	44



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	İnsan CA-II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü.....	6
1.2	Karbonik anhidrazın katalizlediği CO <sub>2</sub> -hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.....	8
1.3	İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri.....	10
1.4	Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması.....	12
3.1	Afinitejelinin hazırlanması.....	23
4.1	Sığır eritrositlerinden elde edilen BCA enziminin elüsyonunda; (.) 280 nm’de elde edilen absorbans değerleri.....	27
4.2	Coomassie-Blue yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.....	28
4.3	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı .....	29
4.4	BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 4 bileşiğinin etkisi.....	31
4.5	BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.....	31
4.5	BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 6 bileşiğinin etkisi.....	32
4.7	BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine 4 bileşiğinin etkisi.....	34
4.8	BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine 5 bileşiğinin etkisi.....	34
4.9	BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine 6 bileşiğinin etkisi.....	35
4.10	BCA enzimi üzerinde 4 bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği .....	39
4.11	BCA enzimi üzerinde 5 bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği .....	39
4.12	BCA enzimi üzerinde 6 bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği .....	40

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
4.1	BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	30
4.2	BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.	33
4.3	Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro CO <sub>2</sub> -hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....	35
4.4	Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....	36
4.5	BCA enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkileri ve K <sub>i</sub> elde etmek için yapılan işlem sonuçları.....	37
4.6	Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları .....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar
nm	Nanomolar
rpm	Devir/Dakika

### Açıklama

### Kısaltmalar

BCA	Sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi
CA	Karbonik anhidraz enzimi
ÇARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
E.C	Enzim kod numarası
E.U	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim inhibitör substrat kompleksi
I	İnhibitör
IOP	Yüksek göz içi basıncı
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
S	Substrat
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TCA	Trikloroasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetramet etilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan

### Açıklama

## GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına 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. Böylece enzimler bütün metabolik olaylarda vazgeçilmez öğelerdir.

Enzim moleküllerinde aktif bölge denilen özel bir cep yada yuva bulunur. 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 reaksiyonların çoğu 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. Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Karbonik anhidraz, enzimler arasında en yüksek turnover sayısına sahip olanları arasındadır ( $600.000 \text{ s}^{-1}$ ). Yani bir karbonik anhidraz molekülü tarafından  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$  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 aktif bir metal iyonu olabildiği gibi koenzim adı verilen organik bir molekülde olabilir. Enzim, kofaktörü ile beraber bulunuyor ise holoenzim, holoenzimin kofaktörsüz protein kısmına apoenzim denir. Uygun kofaktör olmadığında apoenzimin biyolojik aktivitesi yoktur [3]. Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılmayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere "prostetik grup" adı verilir [1].

Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları ya asit-baz katalizi, ya kovalent kataliz yapar, yada enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak sustratın bağlanmasını kolaylaştırır [3].

Enzim aktivitelerinin, bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir.

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 yollarla 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; reversible (dönüşümlü) veya irreversible (dönüşümsüz) olabilir. [3]

Dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir;

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

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör: yapı itibariyle substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmez. Yarışmalı inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş  $K_M$ 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Bu, yarışmalı bir inhibitör varlığında  $1/2 V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekeceği anlamına gelir [1, 2].

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].

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Unkompatitif 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. Unkompetitif inhibisyon bir substratlı reaksiyonlarda ender görülür; buna karşılık iki substratlı reaksiyonlarda yaygındır [1].

Dönüşümsüz inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur. Dönüşümsüz inhibisyonda  $V_{max}$  azalır,  $K_M$  ise değişmeden kalır.

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

**Karbonik anhidraz** (CA), (karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) çinko içeren ve karbondioksitin tersinir hidrasyonunu katalize eden bir enzimdir [4]. Katalizlenen reaksiyon;



Fakat  $\text{H}_2\text{CO}_3$  kendiliğinden



şeklinde iyonlarına ayrışır.

Fizyolog ve biyokimyacılar tarafından yapılan çalışmalarda yukarıdaki hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarının kendiliğinden oluşum hızından çok daha fazla olduğu görülmüştür [5]. Bu olaylarda, kanda var olan bir enzimin rol alabileceğinden şüphelenildi. Karbonik anhidraz enzimi Roughton ve Meldrum tarafından insan eritrositlerinde bulundu [6]. Birkaç yıl sonra karbonik anhidraz varlığı başka dokular içerisinde ve başka canlılarda ortaya çıkarıldı [7-9].

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir [1]. İzoenzimler, omurgalılar, böcekler, bitki ve tek hücreli organizmaların serum ve dokularında yaygın olarak bulunur [10].

İzoenzimlere örnek karbonik anhidraz (CA) verilebilir. CA'nın birçok canlı türünde  $\text{CO}_2$ 'in hidrasyonu ve bikarbonatın dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen çok sayıda izoenzimi mevcuttur. 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 [11]. Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır. [12] 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. [11]

**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 ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan  $\text{CO}_2$ 'i  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'i  $\text{CO}_2$ 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almaktadır. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi bulunamamıştır [11-13],

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın üzerinde en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı  $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de  $10^6\text{ s}^{-1}$  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 [4].

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

Glaucoma hastalığı, yüksek göz içi basıncından ileri gelmekte (intraocular pressure, IOP) ve 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. [14]

CA-III'ün turnover sayısı  $8.10^3\text{ s}^{-1}$ dir. Düşük aktiviteli bir enzimdir. Diğer CA izoenzimlerine göre, sülfonamidlerin inhibisyonuna daha az hassastır. Başlıca çözünür protein olduğu ve  $\text{CO}_2$ '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 [4].

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.[15]

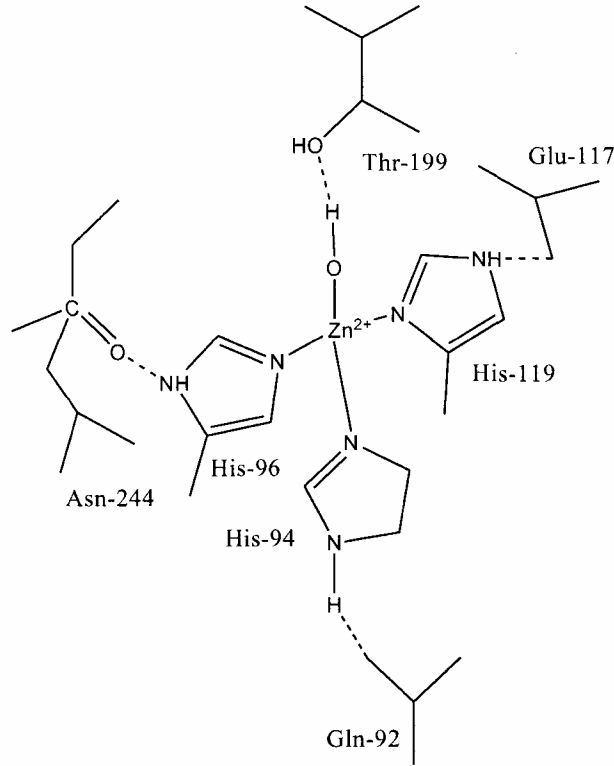
HCA-V, belirli dokuların mitokondrilerinin matrikslerinde bulunur. CA-V'in sırasıyla karbamoil fosfat sentetaz-I'e ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağlayarak ürogenez ve glukoneogenez de rol oynadığı ileri sürülmektedir. CA-V'in lipogenez olayında da rol oynaması mümkündür [16].

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 [17].

**Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları;**  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak adlandırılan, üç CA ailesi mevcuttur. İnsan CA-I ve CA-II'nin kristal yapısında, sığır CA-III'ünde, sıçan CA-V'inde ve E.coli'de bulunan CA'lar  $\alpha$ -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  $\alpha$ -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir. On iplikçik ve molekülü iki eş parçaya bölen sarılmış bir  $\beta$  şeridinden oluşan bölge, yapının ikinci bölgesidir. İki paralel iplik çifti haricinde,  $\beta$  şeritleri antiparaleldir. Molekülün yüzeyinde diğerlerine göre daha kısa olan heliksler bulunur [18].

Aktivite bölgesi, neredeyse molekülün merkezine uzanan büyük, koni biçimli bir oyukta bulunur. Çinko iyonu bu oyukun tabanına yakındır. Dördüncü ligandın  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  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 [19]. (Şekil 1.1)





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

Henüz hiçbir  $\beta$ -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu kuvvetle savunur. X-ray absorpsiyon spektroskopisinden ve mutasyonlardan elde edilen kanıt, ıspanak enzimindeki çinko iyonunun  $\alpha$ -CA'ların aksine Cys-His-Cys-H<sub>2</sub>O grubuyla koordine olduğunu ortaya koyar [20].

Son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak  $\gamma$ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik molekül  $\alpha$ -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  $\beta$ -heliks yapısının yedi dönüşü ile olmaktadır.

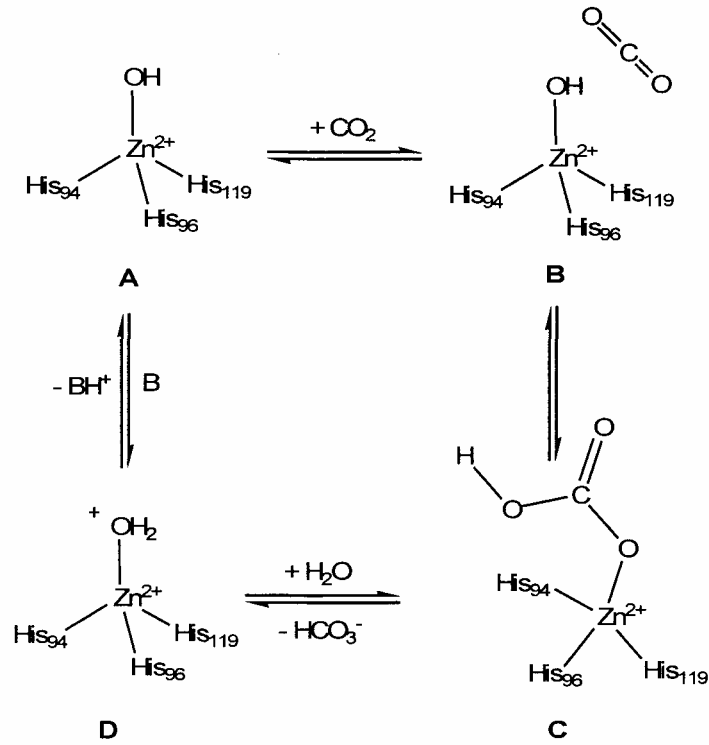
Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar. *M. thermophila* CA'sındaki ve insan CA-II'deki metal merkezli bu pozisyon önemli benzerlikler gösterir ve bu durumda

katalitik fonksiyonların yakın olması da çinko bağlı bölgelerin benzer olduğuna işaret etmektedir [21].

**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. [22]

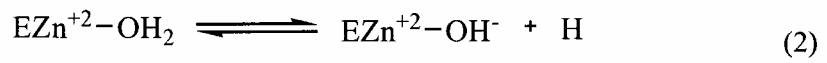
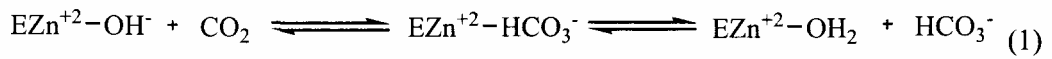
Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki Zn (II) iyonunun reaksiyonların katalizi için büyük önemi vardır. X-ray kristallografisi çalışmaları metal iyonun, aktif bölümün 15 Å<sup>0</sup> derinliğindeki tabanında yerleştiğini göstermiştir. 3 histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) ve su molekülü, 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 CO<sub>2</sub>'e doğru hareket etmektedir. [11]

Enzimin aktif formu; hidroksitin çinkoya bağlı olduğu temel formdur. (Şekil 1. 2-A). Bu güçlü nükleofil, CO<sub>2</sub> molekülü ile etkileşir (Şekil 1. 2-B). Bu da bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1. 2-C). Bu bikarbonat iyonu daha sonra su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Böylece Zn<sup>+2</sup> iyonuna su molekülü bağlanır. Bu da enzimin asit formuna yol açar (Şekil 1. 2-D). Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [23].



**Şekil 1. 2** Karbonik anhidrazın katalizlediği CO<sub>2</sub>-hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.

Reaksiyon 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. [24]

**Karbonik anhidraz aktivitesi;** enzimin CO<sub>2</sub>'i hidratasyonu bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortama göre CO<sub>2</sub> gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H<sup>+</sup> konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO<sub>2</sub> gazı, kantitatif olarak manometrik yolla tespit edilebilir. Fakat manometrik metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır[25].

İkinci olarak, ortamdaki H<sup>+</sup> 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 CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözünmesi ve kullanılan indikatörün 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 [25, 26].

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır. Enzim birimi ise, enzimsiz CO<sub>2</sub>-hidratasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın, t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [26].

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [26, 27].

**Karbonik anhidraz inhibitörleri;** inorganik anyon ve katyonlar bir de organik inhibitörler olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir.

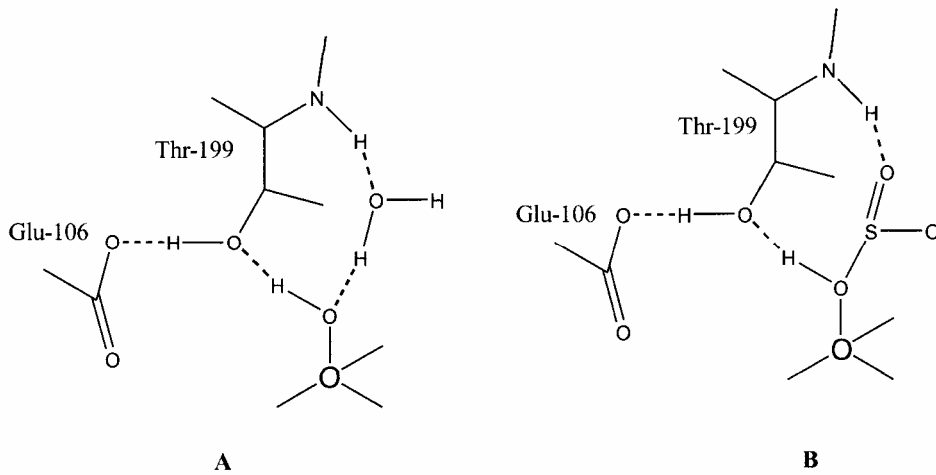
Çoğu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları: (sığır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren CN<sup>-</sup> iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren F<sup>-</sup> iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir [28].

Inhibisyonun pH bağımlılığına ve Co<sup>+2</sup> 'nin yer değiştirdiği enzimin spektrum değerleri üzerindeki çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağlandığı ve katalitik CO<sub>2</sub> hidrasyonunda önemli bir rolü olan OH<sup>-</sup> iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır. Co<sup>+2</sup> ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağlı çözücü molekülü

yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir [28].

Lund Üniversitesinde Profesör Anders Liljas'ın laboratuvarında yapılan insan CA-II çalışmaları başta olmak üzere, 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 [29].

Protonları iş 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  $NH$  grubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir [30].



**Şekil 1.3** İnsan CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri.

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

A: İnhibe olmayan enzim      B: Bisülfür

$\text{SO}_4^{2-}$  gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler [31]. 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. [32]

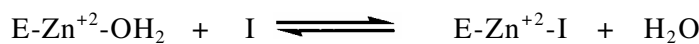
Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarakta kullanılmaktadır [33,34].

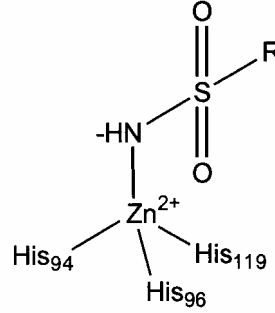
Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubu veya bir  $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{OH})$  grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak; enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde,  $(\text{R-SO}_2\text{NH}^-$  veya  $\text{R-SO}_2\text{N-OH}^-)$  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 [34, 35].

Nitekim süstitüe yada alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında; yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grup taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise; yalnızca hidrofobik bağlanmadan dolayı, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitörler değildir [11].



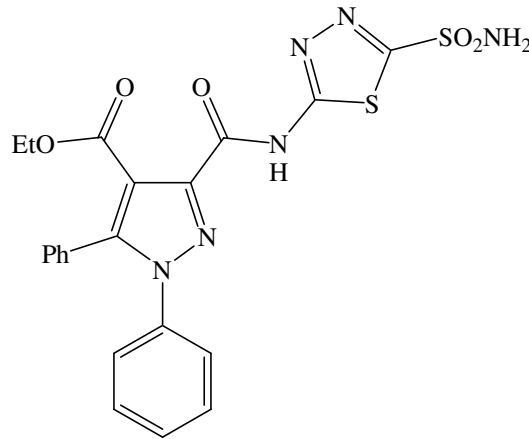
Tetrahedral yapı (süstitüsyon)

Zn (II) iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn (II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 1.4.) [24].



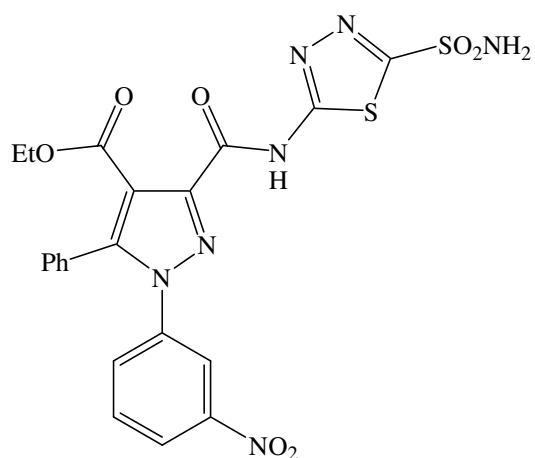
**Şekil 1. 4** Sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması

Bu çalışmada; karbonik anhidraz enziminin sığır eritrositlerinden saflaştırılması ve daha önce sentezlenen bileşiklerin; glaucoma tedavisinde rolü olan HCA-II'ye özellikleri çok benzeyen sığır CA'sı üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır. 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 şöyledir:



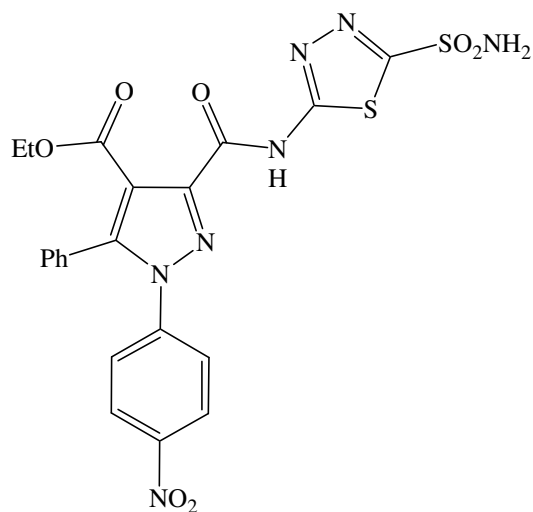
**Amit IV**

Etil,3-Difenil-3-(5-Sülfomoiil-1,3,4-Tiyadiazol-2-ylkarbomoiil)1-h-1-pirazol-4-karboksilat (4)



Amit V

2,1-3Nitroetil1-3-Hidrofenil-5fenil-3(5sülfomoil-1,3,4-tiyadiazol-2-ylkarbomoil)pirazol-4-karboksilat (5)



Amit VI

Etil1-(4-Nitrofenil)-5-Fenil-3-(5-sülfomoil)-1,3,4-Tiyadiazol-2-ylkarbomoil)1-hidrojen-pirazol-h-karboksilat (6)

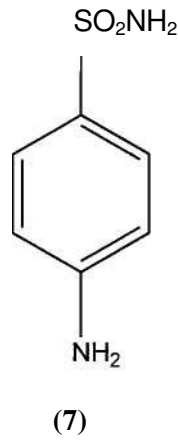


## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

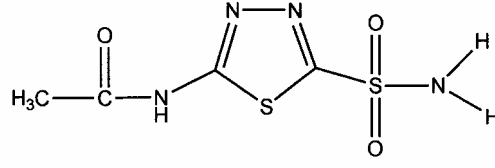
Göz hastalıkları içinde körlüğe en fazla glaucoma neden olur (% 15-20) [36]. ABD' de körlerin %10-11 bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir [37]. Yine aynı ülkede beyazlarda en fazla körlük nedeni olan üçüncü hastalık olarak belirtilmiştir [38, 39].

Glaucoma hastalığı, yüksek göz içi basıncıyla (intro ocular pressura, IOP) ortaya çıkarak, dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. Hastalığın en belirgin risk faktörü göz içi basıncının yükselmesidir. Diğer risk faktörleri miyopi, diyabet, yetersiz kan dolaşımı, yaş, yüksek göz tansiyonu, sistemik hipertansiyon ve kalıtım yolu ile aktarılması sıralanabilir. Fakat göz içi basıncın 22 mmHg'dan daha düşük (yani normal) hastaların %20'sinde de glaucoma hastalığı rastlanmaktadır.

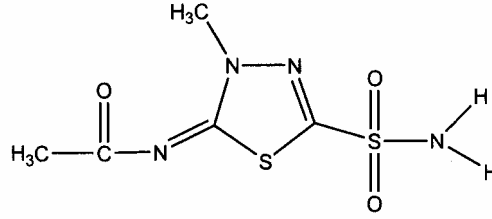
Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyonu yolu ile glaucomalı hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir. Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri (5) 1940 yılında Mann ve Keilin sentezlemiştir.



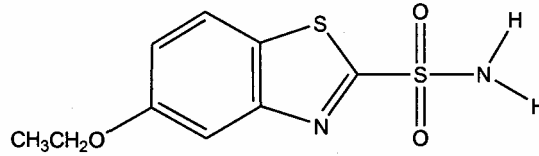
**Glaucoma tedavisinde kullanılan sülfonamidler:** Glaucoma tedavisinde uzun zamandan beri 4 çeşit sistemik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler asetazolamid (8), metazolamid (9), etokzolamid (10) ve diklorfenamid (11) bileşikleridir [40,41]. Sistemik inhibitörler, yükselen göz içi basıncını (IOP) düşürmekte kullanılır. Bu inhibitörler, silyer epitel enzimlerini (CA-II ve CA-IV) inhibe etmesiyle,  $\text{HCO}_3^-$  oranında bir azalma sağlar. Bu yüzden humor aköz salgılanmasında %25-30 azalma sağladığından, bu inhibitörler glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılırlar. Fakat bu inhibisyon, gözden daha çok diğer dokulardaki CA enzimlerini etkilediğinden, oldukça büyük yan etkilere sahip olmaktadır [40,41].



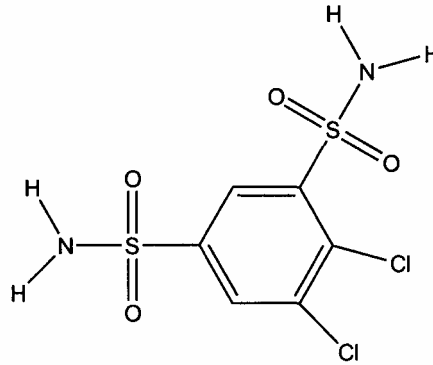
(8)



(9)



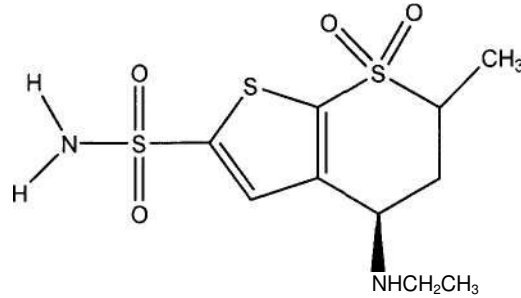
(10)



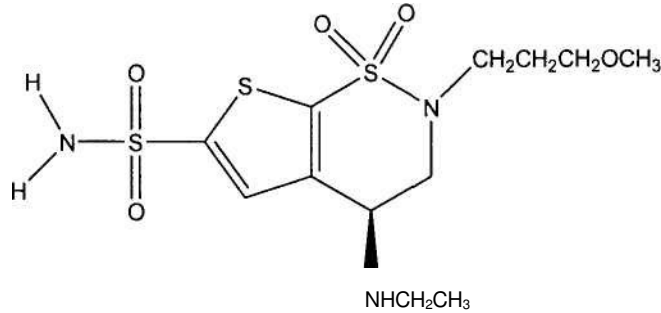
(11)

**8** ve **11** 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 [40,41]. Bu da **8** ve **11** bileşiklerinin topikal olarak göze uygulanması gerektiğini ortaya koymaktadır. Fakat **8** ve **11** bileşikleri gibi klinikte kullanılan ilaçların hiçbiri, suda çözünürlük problemlerinden dolayı etkili konsantrasyonları sağlayamadığından henüz damla haline getirilememiş ve ağızdan alınmaktadır

Yüksek IOP'yi düşürürken, CA izoenzimlerinin inhibe olmaması için, göze lokal olarak uygulanabilecek ilaçlara ihtiyaç duyulmuştur [42]. Bu sebepten dolayı ilk kez ilaç olarak kullanılmak üzere dorzolamid **12** bileşiği sentezlenmiş ve 1995'te kliniklerde kullanılmıştır [43]. İkinci olarak da, yapı olarak dorzolamide benzeyen brinzolamid **13** bileşiği sentezlenmiş ve 1999'da kliniklerde kullanılmaya başlanmıştır. Böylece glaucoma tedavisi için kullanılan 4-7 arası sistemik ilaçların arasına bu iki ilaç da katılmıştır. Bu iki ilaç **12** ve **13**, daha önceden ilaç olarak kullanılan bileşiklerle karşılaştırıldığında; daha az yan etkisi olmakla birlikte, lokal olarak uygulanması sebebiyle gözde yalnızca istenilen CA izoenzimlerini inhibe etmektedir [41].



(12)



(13)

Son yıllardaki çalışmalarda ise **12** ve **13** bileşiklerinin de; göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur [44,11].

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

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

#### **3.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar**

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

Santrifüj: Nüve NF800

Soğutmalı santrifüj: Sigma K30

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

pH metre: Schott Instruments / Lab850

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

Karıştırıcı: Vortex-Genie, 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-SO<sub>4</sub>, pH=7,4 (esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon):

6,055 g tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

**2.** 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH=8,8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon):

16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon):

3,0275 g tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon):

3,0275 g tris ve 3,124 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözülüp, 1 N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

**6.** 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH=5,6 (kolona tutunmuş HCA-Ü izoenzimi ve BCA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti):

9,187 g NaClO<sub>4</sub> ve 2,09 g NaCH<sub>3</sub>COO.H<sub>2</sub>O, 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.

**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-merkapt 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. CO<sub>2</sub> çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti):**

0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO<sub>2</sub> 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 TC A, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

**14. İnhibitör stok çözeltileri:**

CA inhibitörü olarak yeni sentezlenen 4,5, 6 bileşiklerinin %1'lik çözeltilerini hazırlamak için; herbir 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 absorbands göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbandsları 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 absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [45].

Tayin işlemlerinde; 1 mL’inde 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 absorbands 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 CO<sub>2</sub>-Hidrataz aktivitesi tayini

Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub>’in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> 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 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) yararlanıldı [46, 47]. Enzim birimi ise; enzimsiz CO<sub>2</sub> 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, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymuş CO<sub>2</sub> 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

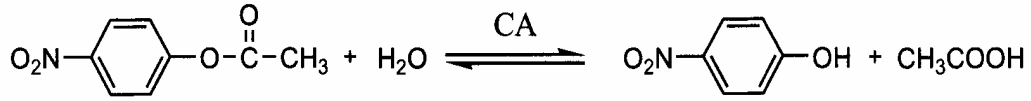
hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,2 mL). Bu yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzim olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

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

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

### **3.4. 2.2 Esteraz aktivitesi tayini**

İnhibitörlerin BCA 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 absorbanı 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 absorbanı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir [48,49]. Bu dalga boyundaki *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 250°C'de 348 nm'de absorbanı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbanı 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 esterin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi [48]. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı [50].



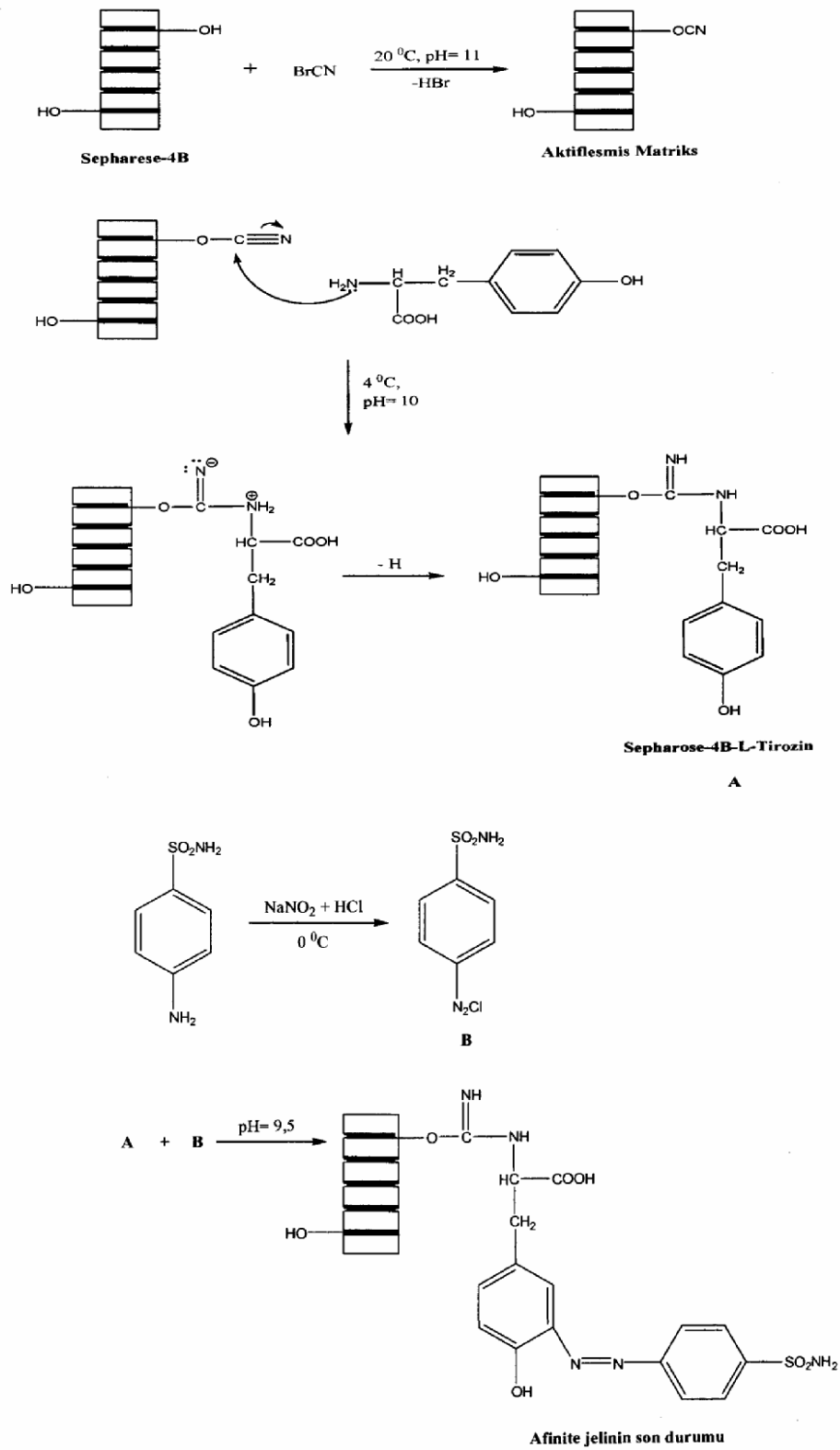
### 3. 4. 3 Sığır eritrositlerinden Karbonik Anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

#### 3. 4. 3.1 Sepharose-4B Matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır [50].

**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 aktarılarak süzüldü. Daha sonra pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> 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 absorban vermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin, tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisine alındı [51 -53].

**Sülfanilamid kenetlendirilmesi:** 25 mg-sülfanilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> 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-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi [54, 55]. Reaksiyonun açık formülleri aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 3. 1 Afinite jelinin hazırlanması

### **3.4.3.2 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 kısıkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Cam plakaların altı, kaynama sıcaklığına getirilerek çözünmüş daha sonra 40-50 °C'ye soğutulmuş ağar 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 inkübe edildi. Numuneler soğutulmuş, 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 akrilamid- %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 [(NH<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>(PER))] ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

Yığma 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 Sığır Eritrosit CA Enzimi Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi**

#### **3. 5. 1. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin Hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi**

Sığır eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen amit 4, 5, 6 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için sığır kanından elde edilen BCA 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 BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi**

Sığır eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen amit 4, 5, 6 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma 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 ( $\epsilon$ )  $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 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 [48].

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

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

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

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

bulunur.

### 3. 5.3. Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkilerinin $K_i$ sabitleriyle bulunması

$K_i$  değerlerini bulmak için; sığır eritrosit CA enziminin esteraz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen amit 4,5,6 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 yukarda belirtildiği gibi;

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

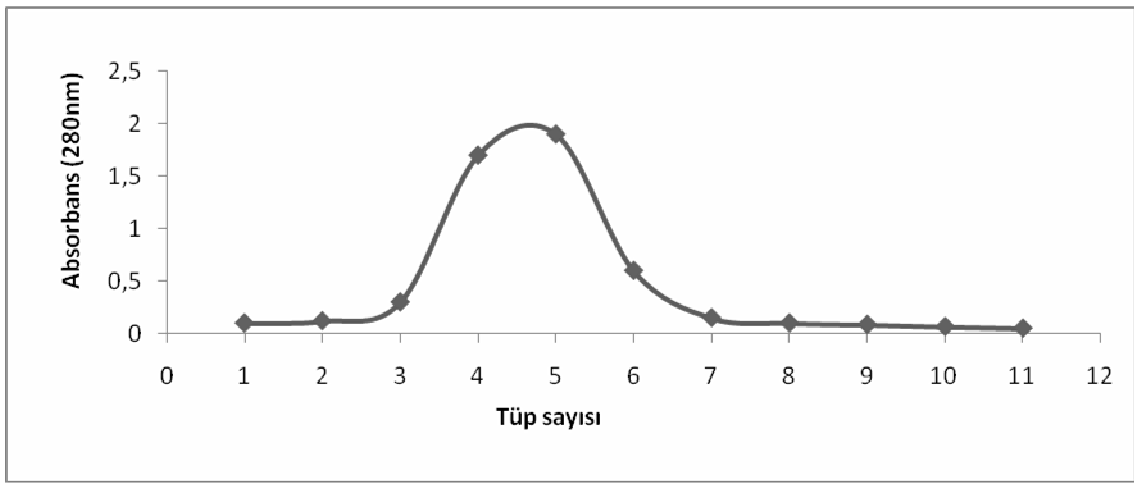
değeri,  $V$  (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver Burk grafiklerini çizmek için bu değerler  $1/V$  değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonlan  $[S]$ , grafikte kullanmak için  $1/[S]$  değerlerine dönüştürüldü; Bu-değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün, sığır eritrosit BCA 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 BCA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Sığır kanından elde edilen hemolizatlar kolona direk olarak tatbik edildi. Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işleminden sonra BCA; 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5,6) tamponuyla elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesine bakıldı (şekil 4.1).



**Şekil 4.1** Sığır eritrositlerinden elde edilen BCA enziminin elüsyonunda; (•) 280 nm'de elde edilen absorbans değerleri

Sığırdan saflaştırılan BCA enzimi için Coomassie Blue yöntemiyle protein tayini ve esterez 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.

Sığır kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 93 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 1631 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 1631/93 = 17,50$$

olarak bulundu.

BCA için 4-6 no'lu tüplerdeki elüatlar birleştirilerek coomassie blue yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi deneyleri yapıldı. Saflaştırılan enzim çözeltisi için mL'deki protein

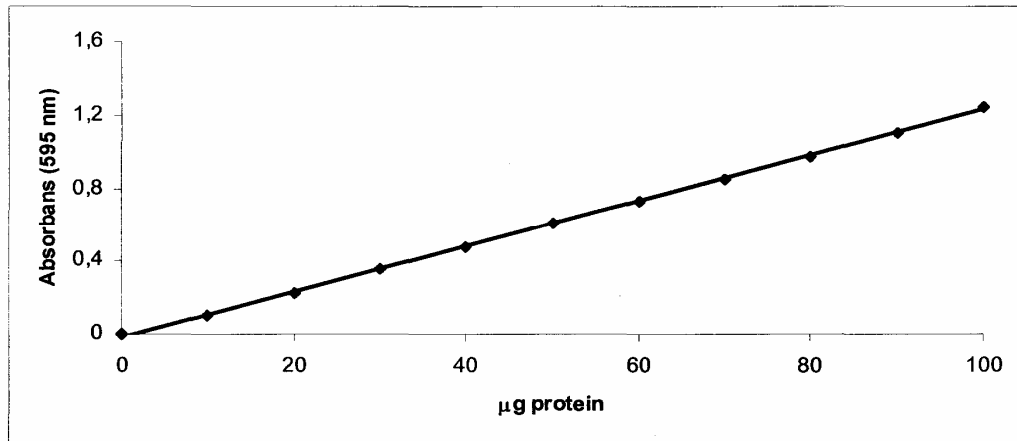
miktarı 0,58 mg ve mL'deki enzim ünitesi 98,69 EU olarak bulundu. Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 100 kat seyreltme yapıldığından aktivitesi BCA için 9869 EU/mL olarak bulundu. Buna göre;

$$\text{BCA için spesifik aktivite (SA)} = 9869/0,58 = 17000$$

Bu değerlere göre, hemolizatin doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

$$\text{BCA } 17000/17,5 = 971 \text{ kat saflaştırılmış oldu.}$$

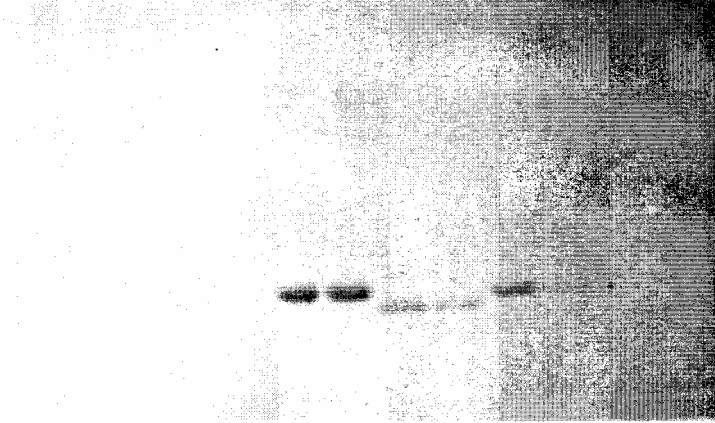
Kantitatif protein tayini Coomassie Blue yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem için önce standart bir eğri hazırlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerlerinden faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu\text{g}$  protein miktarları bulundu (şekil 4.2).



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

#### 4. 2 Sığır Eritrositlerinden Elde Edilen BCA 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. 3. 2'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektroforezine, sığır kanından saflaştırılan enzim tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (şekil 4. 3).



**Şekil 4.3** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimlerinin SDS-poliakrilamidjel elektroforezi fotoğrafı (1.kanal: HCA-I, 2.kanal: BCA, 3.kanal: HCA-II)

### **4. 3 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi**

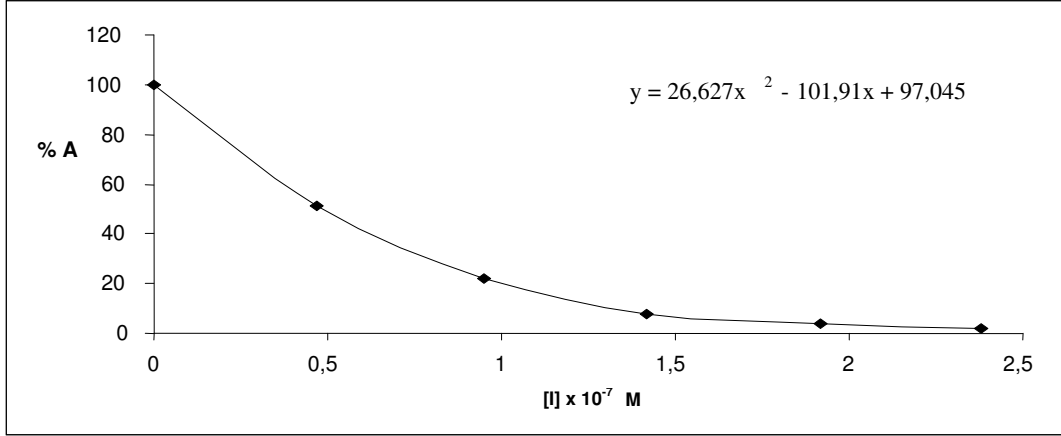
#### **4. 3. 1 Sentezlenen bileşiklerin sığır eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi**

Sığır eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen amit 4, 5, 6 no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için sığır kanından elde edilen BCA 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).

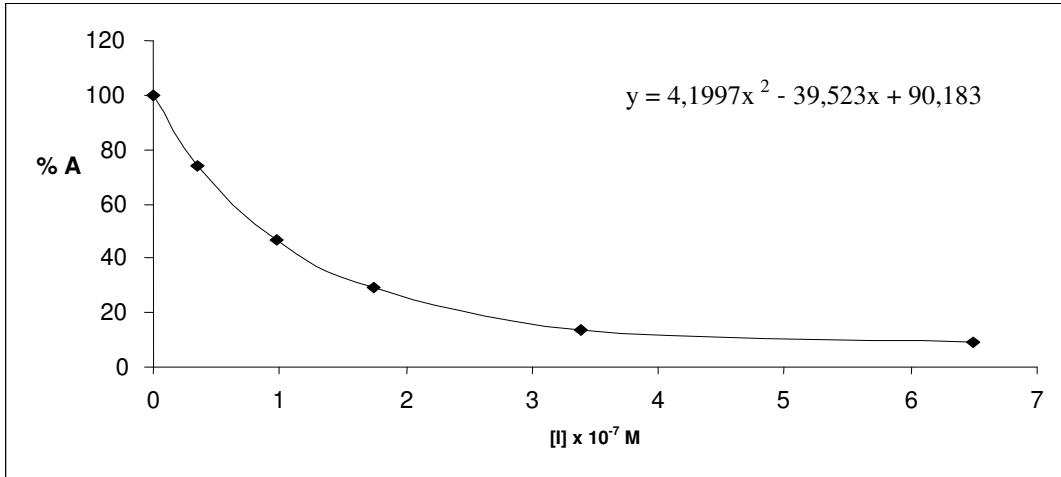


**Çizelge 4. 1** BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

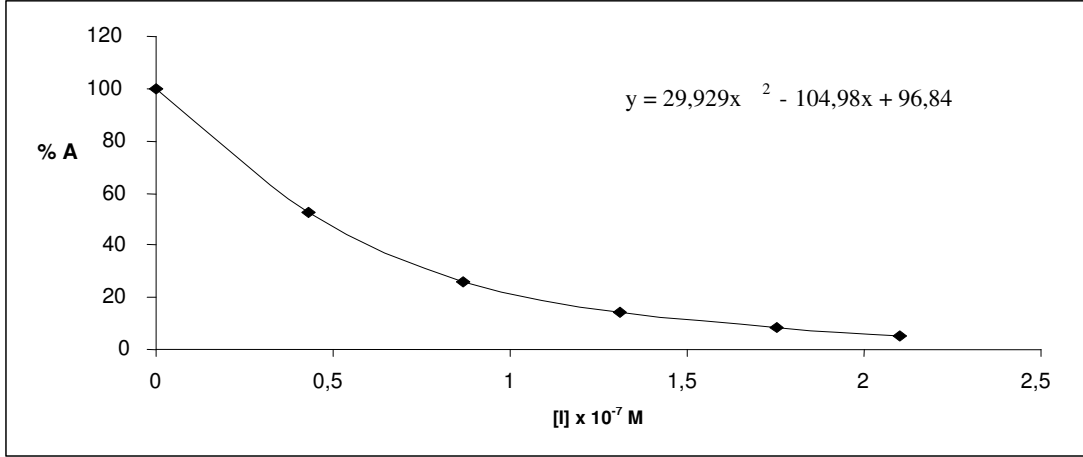
<b>İnhibitör No</b>	<b>Veronal Tamponu (mL)</b>	<b>Enzim (µL)</b>	<b>İnhibitör (µL)</b>	<b>Destile su (µL)</b>	<b>Doygun CO<sub>2</sub> Çözeltisi (mL)</b>	<b>% Aktivite</b>	<b>[I] M</b>
<b>4</b>	<b>1</b>	-	-	700	2,5	-	-
	<b>1</b>	100	-	600	2,5	100	0
	<b>1</b>	100	10	590	2,5	51	$0,47.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	20	580	2,5	21,87	$0,95.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	30	570	2,5	8,08	$1,42.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	40	560	2,5	4,16	$1,92.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	50	550	2,5	2,14	$2,38.10^{-7}$
<b>5</b>	<b>1</b>	-	-	700	2,5	-	-
	<b>1</b>	100	-	600	2,5	100	0
	<b>1</b>	100	10	590	2,5	73,72	$0,72.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	20	580	2,5	58,4	$1,17.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	40	560	2,5	47,4	$1,75.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	100	500	2,5	18,8	$4,38.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	150	450	2,5	8,84	$6,5.10^{-7}$
<b>6</b>	<b>1</b>	-	-	700	2,5	-	-
	<b>1</b>	100	-	600	2,5	100	0
	<b>1</b>	100	10	590	2,5	52,5	$0,43.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	20	580	2,5	25,9	$0,87.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	30	570	2,5	14,3	$1,31.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	40	560	2,5	8,14	$1,75.10^{-7}$
	<b>1</b>	100	50	550	2,5	5,2	$2,1.10^{-7}$



Şekil 4. 4 BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (4) bileşiğinin etkisi



Şekil 4. 5 BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (5) bileşiğinin etkisi



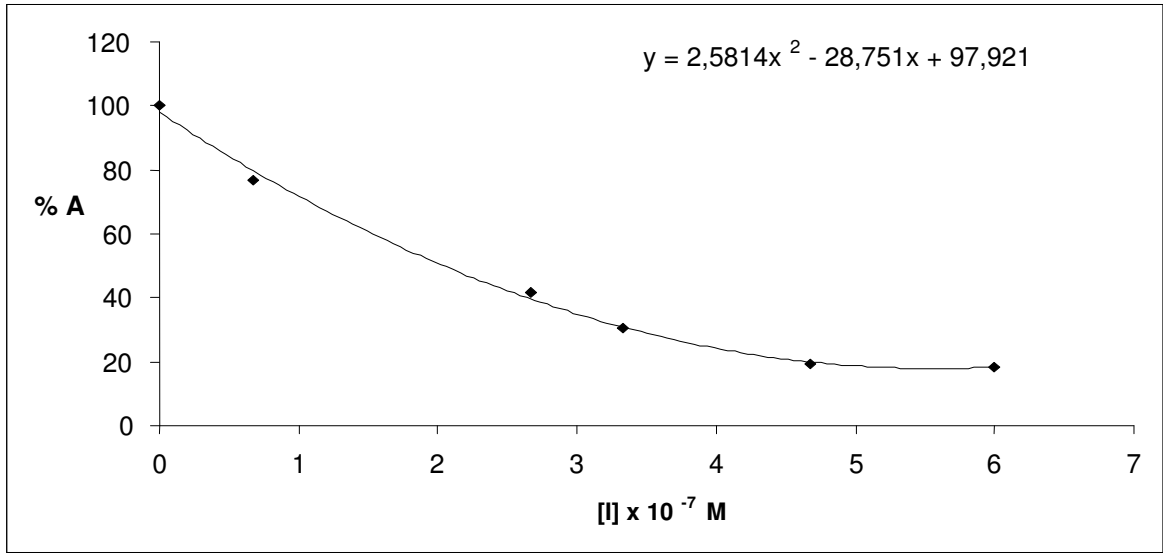
**Şekil 4. 6** BCA enziminin hidrataz aktivitesi üzerine (6) bileşiğinin etkisi

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

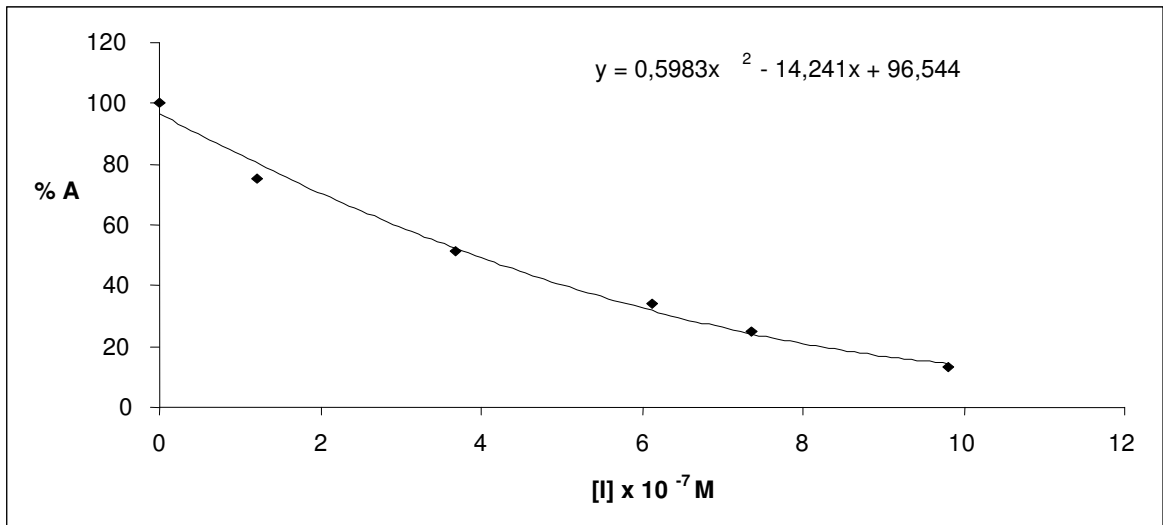
BCA'nın esteraz aktivitesi üzerinde amit 4, 5, 6 bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla sığır kanından elde edilen BCA enzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir.

**Çizelge 4. 2** BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

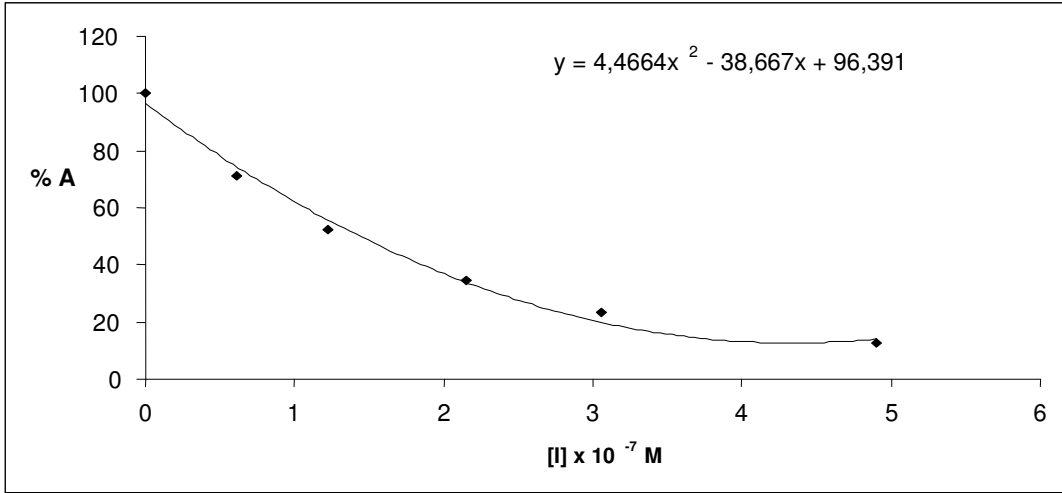
İnhibitör No	Substrat (ml)	SO <sub>4</sub> Tris-Tampon (ml)	Enzim (mL)	İnhibitör (µL)	Destile su (µL)	% Aktivite	[I] M
<b>4</b>	1	1,3	0,2	-	500	100	0
	1	1,3	0,2	10	490	76,53	$0,67 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	40	460	41,5	$2,67 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	50	450	30,5	$3,33 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	70	430	19,5	$4,67 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	90	410	18,37	$6 \cdot 10^{-5}$
<b>5</b>	1	1,3	0,2	-	500	100	0
	1	1,3	0,2	20	480	75,47	$1,22 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	60	440	51,42	$3,68 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	100	400	34,19	$6,13 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	120	380	24,76	$7,36 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	160	360	13,3	$9,81 \cdot 10^{-5}$
<b>6</b>	1	1,3	0,2	-	500	100	0
	1	1,3	0,2	10	490	71,37	$0,61 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	20	480	52,37	$1,22 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	35	465	34,74	$2,15 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	50	450	23,24	$3,06 \cdot 10^{-5}$
	1	1,3	0,2	80	420	12,96	$4,9 \cdot 10^{-5}$



Şekil 4. 7 BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine (4) bileşiğinin etkisi



Şekil 4. 8 BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine (5) bileşiğinin etkisi



**Şekil 4. 9** BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine (6) bileşiğinin etkisi

Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin CO<sub>2</sub> hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan (Şekil 4. 4. 4. 5. 4. 6'teki grafiklerden) hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 4. 3 verilmiştir.

**Çizelge 4. 3** Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

I <sub>50</sub> (M)	
İnhibitör	BCA
4	0,54. 10 <sup>-7</sup>
5	1,79 .10 <sup>-7</sup>
6	0,52. 10 <sup>-7</sup>

Sentezlenen inhibitörlerin eritrosit BCA enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan (Şekil 4. 7, 4. 8, 4. 9'daki grafiklerden) hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 4. 4'te verilmiştir.

**Çizelge 4. 4** Sentezlenen bileşiklerin BCA enziminin in vitro esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

I <sub>50</sub> (M)	
İnhibitör	BCA
4	2,04.10 <sup>-7</sup>
5	3,91.10 <sup>-7</sup>
6	1,44.10 <sup>-7</sup>

#### 4. 4 Sentezlenen Bileşiklerin Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından K<sub>i</sub> Sabitlerinin Bulunması

İnhibitör çalışmaları için sentezlenen sülfonamid bileşikleri olan 4, 5, 6 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-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) ve 0.1 mL enzim ilave edilip, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 348 nm'de köre karşı absorban 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 absorban 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;  $1/V-I/S$  değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K<sub>i</sub> değerleri hesaplandı.

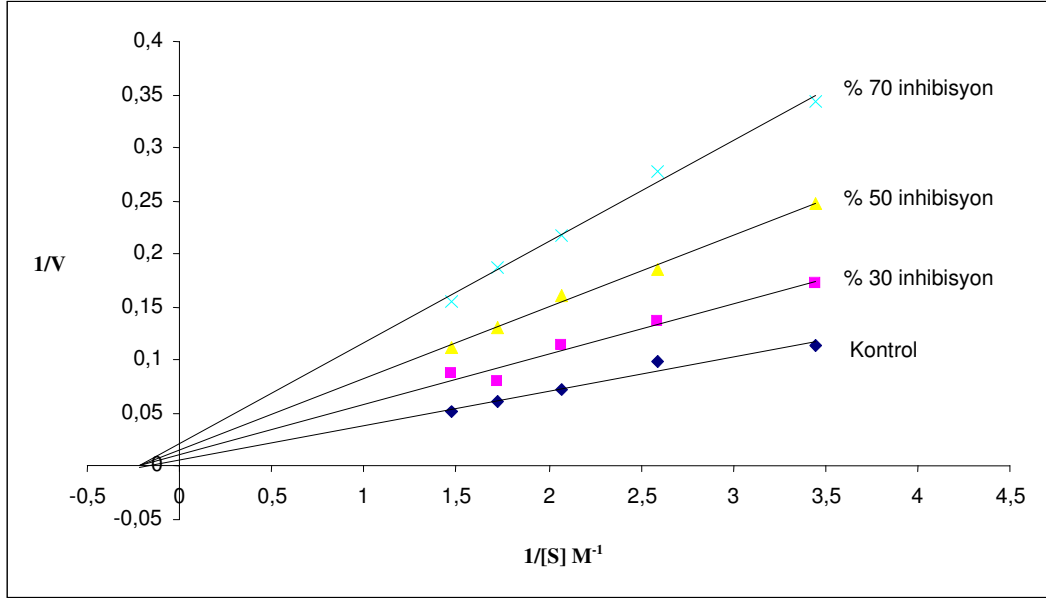
**Çizelge 4. 5** BCA enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkileri ve  $K_i$  elde etmek için yapılan işlem sonuçları

İnhibitör No (Amit)	Substrat (ml)	Tris-SO <sub>4</sub> tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	I/[s] (M <sup>-1</sup> )	1/V (µmol/dak.) <sup>-1</sup>
4	0,6	1,3	0,1	-	1	3,4.10 <sup>4</sup>	0,113
	0,6	1,3	0,1	30	0,970	3,4.10 <sup>4</sup>	0,172
	0,6	1,3	0,1	50	0,950	3,4.10 <sup>4</sup>	0,263
	0,6	1,3	0,1	70	0,930	3,4.10 <sup>4</sup>	0,454
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	2,6.10 <sup>4</sup>	0,098
	0,8	1,3	0,1	30	0,770	2,6.10 <sup>4</sup>	0,156
	0,8	1,3	0,1	50	0,750	2,6.10 <sup>4</sup>	0,185
	0,8	1,3	0,1	70	0,730	2,6.10 <sup>4</sup>	0,277
	1	1,3	0,1	-	0,6	2,0.10 <sup>4</sup>	0,072
	1	1,3	0,1	30	0,570	2,0.10 <sup>4</sup>	0,113
	1	1,3	0,1	50	0,550	2,0.10 <sup>4</sup>	0,161
	1	1,3	0,1	70	0,530	2,0.10 <sup>4</sup>	0,217
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	1,72.10 <sup>4</sup>	0,061
	1,2	1,3	0,1	30	0,370	1,72.10 <sup>4</sup>	0,079
	1,2	1,3	0,1	50	0,350	1,72.10 <sup>4</sup>	0,131
	1,2	1,3	0,1	70	0,330	1,72.10 <sup>4</sup>	0,167
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	1,47.10 <sup>4</sup>	0,045
	1,4	1,3	0,1	30	0,170	1,47.10 <sup>4</sup>	0,070
	1,4	1,3	0,1	50	0,150	1,47.10 <sup>4</sup>	0,111
	1,4	1,3	0,1	70	0,130	1,47.10 <sup>4</sup>	0,156
5	0,6	1,3	0,1	-	1	3,4.10 <sup>4</sup>	0,156
	0,6	1,3	0,1	20	0,980	3,4.10 <sup>4</sup>	0,227
	0,6	1,3	0,1	60	0,940	3,4.10 <sup>4</sup>	0,312
	0,6	1,3	0,1	110	0,890	3,4.10 <sup>4</sup>	0,555
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	2,6.10 <sup>4</sup>	0,104
	0,8	1,3	0,1	20	0,780	2,6.10 <sup>4</sup>	0,138
	0,8	1,3	0,1	60	0,740	2,6.10 <sup>4</sup>	0,178
	0,8	1,3	0,1	110	0,690	2,6.10 <sup>4</sup>	0,227
	1	1,3	0,1	-	0,6	2,0.10 <sup>4</sup>	0,084
	1	1,3	0,1	20	0,580	2,0.10 <sup>4</sup>	0,113
	1	1,3	0,1	60	0,540	2,0.10 <sup>4</sup>	0,151
	1	1,3	0,1	110	0,490	2,0.10 <sup>4</sup>	0,2
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	1,72.10 <sup>4</sup>	0,063
	1,2	1,3	0,1	20	0,380	1,72.10 <sup>4</sup>	0,081
	1,2	1,3	0,1	60	0,340	1,72.10 <sup>4</sup>	0,1
	1,2	1,3	0,1	110	0,290	1,72.10 <sup>4</sup>	0,128
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	1,47.10 <sup>4</sup>	0,051
	1,4	1,3	0,1	20	0,180	1,47.10 <sup>4</sup>	0,078

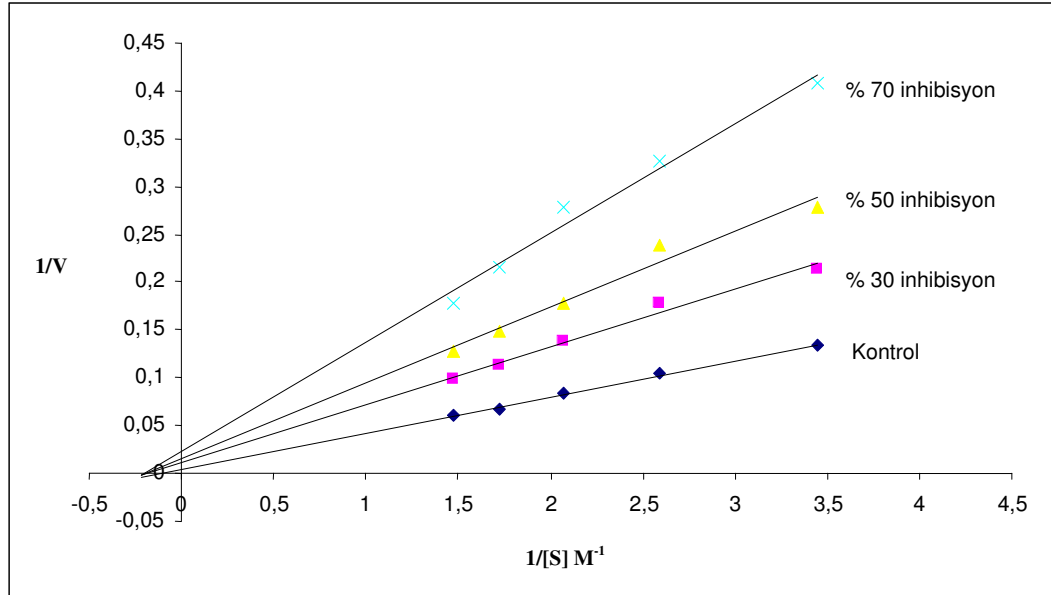


**Çizelge 4. 5** BCA enziminin esteraz aktivitesi yoluyla 4, 5, 6 bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkileri ve  $K_i$  elde etmek için yapılan işlem sonuçları (Devamı)

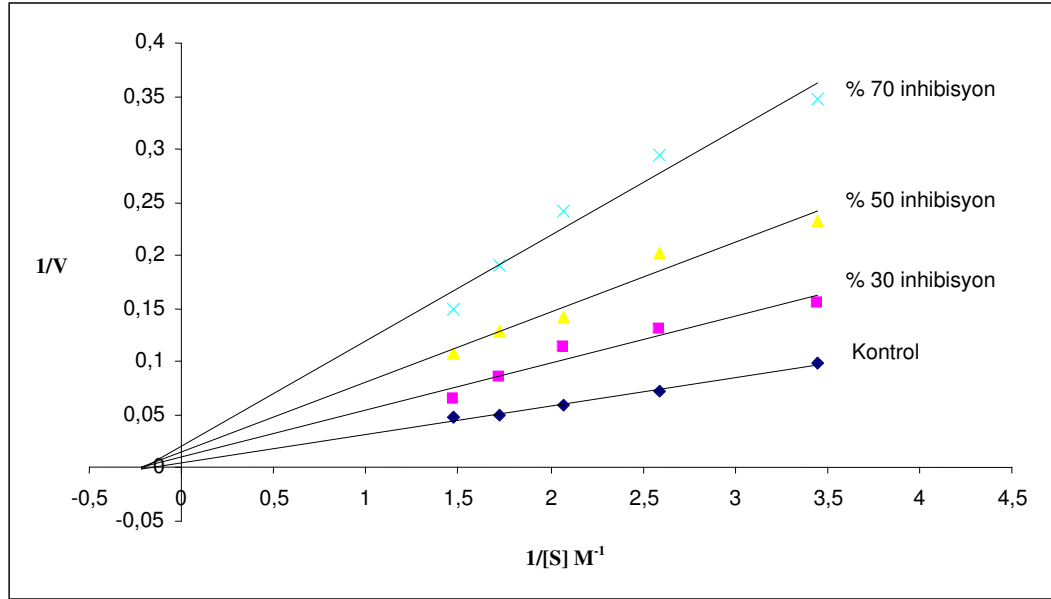
İnhibitör No (Amit)	Substrat (ml)	Tris-SO <sub>4</sub> tampon (ml)	Enzim (ml)	İnhibitör (µL)	Destile su (ml)	I/[s] (M <sup>-1</sup> )	1/V (µmol/dak.) <sup>-1</sup>
5	1,4	1,3	0,1	60	0,140	1,47.10 <sup>4</sup>	0,096
	1,4	1,3	0,1	110	0,09	1,47.10 <sup>4</sup>	0,111
6	0,6	1,3	0,1	-	1	3,4.10 <sup>4</sup>	0,098
	0,6	1,3	0,1	20	0,980	3,4.10 <sup>4</sup>	0,156
	0,6	1,3	0,1	35	0,965	3,4.10 <sup>4</sup>	0,277
	0,6	1,3	0,1	50	0,950	3,4.10 <sup>4</sup>	0,555
	0,8	1,3	0,1	-	0,8	2,6.10 <sup>4</sup>	0,073
	0,8	1,3	0,1	20	0,780	2,6.10 <sup>4</sup>	0,131
	0,8	1,3	0,1	35	0,765	2,6.10 <sup>4</sup>	0,208
	0,8	1,3	0,1	50	0,750	2,6.10 <sup>4</sup>	0,333
	1	1,3	0,1	-	0,6	2,0.10 <sup>4</sup>	0,060
	1	1,3	0,1	20	0,580	2,0.10 <sup>4</sup>	0,113
	1	1,3	0,1	35	0,565	2,0.10 <sup>4</sup>	0,142
	1	1,3	0,1	50	0,550	2,0.10 <sup>4</sup>	0,178
	1,2	1,3	0,1	-	0,4	1,72.10 <sup>4</sup>	0,049
	1,2	1,3	0,1	20	0,380	1,72.10 <sup>4</sup>	0,086
	1,2	1,3	0,1	35	0,365	1,72.10 <sup>4</sup>	0,108
	1,2	1,3	0,1	50	0,350	1,72.10 <sup>4</sup>	0,156
	1,4	1,3	0,1	-	0,2	1,47.10 <sup>4</sup>	0,042
	1,4	1,3	0,1	20	0,180	1,47.10 <sup>4</sup>	0,060
	1,4	1,3	0,1	35	0,165	1,47.10 <sup>4</sup>	0,090
	1,4	1,3	0,1	50	0,150	1,47.10 <sup>4</sup>	0,122



Şekil 4. 10 BCA enzimi üzerinde (4) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4. 11 BCA enzimi üzerinde (5) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4. 12 BCA enzimi üzerinde (6) bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4. 6 Sentezlenen bileşiklerin eritrosit BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

İnhibitör	[I] (M)	$K_i$ (M)	Ortalama $K_i$ (M)	İnhibisyon Türü
4	$2,02 \cdot 10^{-7}$	$1,33 \cdot 10^{-7}$	$2,42 \cdot 10^{-7}$	Yarışmasız
	$3,36 \cdot 10^{-7}$	$2,7 \cdot 10^{-7}$		
	$4,71 \cdot 10^{-7}$	$3,24 \cdot 10^{-7}$		
5	$1,26 \cdot 10^{-7}$	$0,94 \cdot 10^{-7}$	$1,55 \cdot 10^{-7}$	Yarışmasız
	$3,68 \cdot 10^{-7}$	$1,76 \cdot 10^{-7}$		
	$6,74 \cdot 10^{-7}$	$1,96 \cdot 10^{-7}$		
6	$1,26 \cdot 10^{-7}$	$1,39 \cdot 10^{-7}$	$2,27 \cdot 10^{-7}$	Yarışmasız
	$2,14 \cdot 10^{-7}$	$2,36 \cdot 10^{-7}$		
	$3,06 \cdot 10^{-7}$	$3,06 \cdot 10^{-7}$		

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

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

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri ise, 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.

Bu çalışmada glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni sentezlenen (4), (5), (6) no'lu karbonik anhidraz inhibitörlerinin sıgır karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan karbonik anhidraz enzimi, afinite jeli hazırlanarak, eritrositlerden saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde kullanılan jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlendi. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B CNBr ile aktifleştirildi. CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece 5 dakika da gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu. Aktifleştirilen jele L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış p-aminobenzen sülfanilamid kenetlendi. Uzantı kolu olarak, L-tirozin seçilmiştir. Bu uzantı kolu ile sentezlenen afinite jelleri peptidazlara karşı oldukça hassastır.

Ligand olarak karbonik anhidrazın güçlü inhibitörlerinden olan sülfanilamid yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Hazırlanan afinite jeline takılan bu ligand, eritrosit karbonik anhidraz enziminin ayrılmasında uygun özelliklere sahiptir.

Jele adsorbe olan BCA enziminin elüsyonu için, elüsyon çözeltisi kullanılmıştır. Saflaştırılan enzimler için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulanarak BCA için tek bant gözlenmiştir (Şekil 4. 3).

Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein muhtevaları 280 nm de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, proteinin yapısında bulunan tirozin ve tiriptofan amino

asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanır. Kantitatif protein tayinleri Coomassie-Blue yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayinlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [45]. Enzim aktivitesi tayini için hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede  $I_{50}$  değerleri kullanılmaktadır. Sığır CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenen (4), (5), (6) no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için sığır kanından elde edilen BCA enzimi için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

Sentezlenen (4), (5), (6) no'lu bileşiklerin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu çalışmalar sonucunda çizilen %Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan  $I_{50}$  değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

Hidrataz için, $I_{50}$ (M)	
İnhibitör	BCA
Tiyadiazol	$5.10^{-6}$
Asetazolamid	$13.10^{-6}$
4	$0,54.10^{-7}$
5	$1,79.10^{-7}$
6	$0,52. 10^{-7}$

Bunun sonucunda (4), (5), (6) no'lu bileşiklerinin BCA üzerindeki inhibisyon etkisini veren  $I_{50}$  değerleri (sırasıyla  $0,54.10^{-7}$ ,  $1,79.10^{-7}$ ,  $0,52. 10^{-7}$ ) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimiyle benzer özellikler gösteren sığır CA enzimi üzerinde (4), (5), (6) no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılabilecek inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde (4), (5), (6) no'lu bileşiklerin inhibisyon etkileri; glaucoma hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildi. Daha sonra inhibisyon gösteren bileşikler için; sığır kanından saflaştırılan eritrosit BCA enzimi için, beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

Sentezlenen (4), (5), (6) no'lu bileşiklerinin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi in vitro esteraz aktivite ölçümleri sonucu çizilen %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen  $I_{50}$  değerleri tekrar aşağıda özetlenmiştir.

Esteraz için, $I_{50}$ (M)	
<b>İnhibitör</b>	<b>BCA</b>
Tiyadiazol	$2.10^{-6}$
Asetazolamid	$4,9.10^{-6}$
4	$2,04. 10^{-7}$
5	$3,91. 10^{-7}$
6	$1,44. 10^{-7}$

Bunun sonucunda (4), (5), (6) no'lu bileşiklerin BCA üzerindeki inhibisyon etkisini veren  $I_{50}$  değerleri (sırasıyla  $2,04.10^{-7}$ ,  $3,91.10^{-7}$ ,  $1,44.10^{-7}$ ) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II izoenzimiyle benzer özellikler gösteren sığır CA'sı üzerinde (4), (5), (6) no'lu bileşiklerinin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glaucoma hastalığı tedavisinde kullanılabilecek inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Tiyadiazol için ( $K_i=0,82.10^{-4}$ ), asetazolamid için ( $K_i=2,01.10^{-4}$ ) olarak bulunmuştur. Sentezlenen bileşiklerin çizelge 4. 6'deki sonuçlara göre BCA üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, (4) bileşiği için, ( $K_i= 2,42.10^{-7}$ ), (5) bileşiği için, ( $K_i= 1,55.10^{-7}$ ) ve (6) bileşiği için, ( $K_i=2,27.10^{-7}$ )'dir. Bu durum; sentezlenen bileşiklerin BCA enzimine karşı daha fazla ilgisi olan inhibitörler olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla sentezlenen bileşiklerin glaucoma hastalığının tedavisinde kullanılmaya aday yeni inhibitörler olabileceğini söylemek mümkündür.

### KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, 6.1., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s.
- [2] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- [3] İnan, Y. ve Gül, M., 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s.
- [4] Lindskog, S., 1997, Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharma col. Ther.*74, 1-20 p.
- [5] Van Slyke, D. O. and Hawkins, J. A., 1930, Studies of gas and electrolyte equilibria in blood. XVI. The evaluation of carbon dioxide from blood and buffer solutions. *J. Biol. Chem.*, 80, 265 p.
- [6] Meldrum, N. U. and Roughton, F. J. W., 1933, Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.*, 80, 113 p.
- [7] Daveport, H. W., Wilhelmi, A.E., 1941, Renal carbonic anhydrase *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*48, 53
- [8] Daveport, H. W., 1946, Carbonic anhydrase in tissues other than blood. *Physiol. Rev.* 26, 560 p.
- [9] Common, R. H., 1941, The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct. *J. Agric. Sci.*,31,412p.
- [10] Menten, G. ve Ersoz, B., 1993, Harper'in Biyokimyasi, Bantay Kitapevi, 913 s.
- [II] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, Italy, 1,61-97 p.
- [12] Ren, X. and Lindskog, S., 1992, Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase. I. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1120, 81-86 p.
- [13] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 375-401 p.
- [14] Renzi, G., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2000. Carbonic anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incorporating Secondary Amine Moieties. *Bioorg. Med. Chem.*, Italy, 10, 673-676 p.
- [15] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 375-401 p.
- [16] 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.
- [17] Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C. H. and Tashian, R. E., 1996, Expression of carbonic anhydrase of mouse VII. in *E. Coli*. And demonstration of its CO<sub>2</sub> hydrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 268-272 p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Björkbacka, H., Johansson, I. M. , Skarfstad, E. and Forman, C, 1997, The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochem.*, in press.
- [21] Kisker, C, Schindelin, H., Albert, B. E., Ferry, J. G. and Rees, D. C. 1996, A left handed P - helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanarcula thermophila*. *EMBO J*; 2323-2330 p.
- [22] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularly of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 p.
- [23] Stams, T., Chen, Y., Boriack - Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipls. P. and Christianson, D. W., 1998, *Protein Sci.*, 7, 556 p.
- [24] Briganti, F., Pierattelli, A, Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996 *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001 p.
- [25] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- [26] 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.
- [27] Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., 1967, Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J. Biol. Chem.*, 242, 4221 p.
- [28] 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.
- [29] Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B. H. and Xue, Y. 1994, Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.*, 219, 1-10 p.
- [30] 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.
- [31] Simonsson, I. and Lindskog, S. 1982, The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem.* 123 : 29-36 p.
- [32] 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.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [33] 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.
- [34] Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflastırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van
- [35] Lindskog, S. and Wistrand, P. J. 1988, Inhibitors of carbonic anhydrase. In: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, pp. 698-723 p.
- [36] Liesegang, T. J., 1996, Glaucoma: Changing Concepts and Future Directions, *Mayo Clin. Proc.*, 71, 689 p.
- [37] Chiou, C. Y., 1981, *Biochem. Pharm.*, 30, 103 p.
- [38] Wilson MR and Martane JF. 1996, Epidemiology of chronic open - angle glaucoma in: *The Glaucomas*. Ritch R, Shields MB, Krupin, (eds), StLouis Mosby,; 735-68 p..
- [39] Wiggs J. L., 1995, Genetics of Glaucoma *Ophthalmol Clin. Nort. Am.*: 203-14 p.
- [40] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [41] 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.
- [42] Maren, T. H. and Janskowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. *Cur. Eye. Res.*, 4, 399 p.
- [43] Sugrue, M. F., 1996, The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, 363-376 p.
- [44] 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.
- [45] 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.
- [46] Maren, C. H., 1960, A simplified micro method for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26 p.
- [47] 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.
- [48] Armstrong, J., Me, 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.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [49] 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.
- [50] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 7, 14 p.
- [51] 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.
- [52] Arslan, O., Küfrevioğlu, O. I. and Nalbantoğlu, B., 1997, Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 515 - 518 p.
- [53] Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680 p.
- [54] Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 p.
- [55] Keha, E. E., 1981, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu. Doçentlik tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi