

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**KANSER İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII  
İZOENZİMLERİNİN (CA-IX, CA-XII) EKSPRESYONU,  
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERE KARŞI İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ÖZEN ÖZENSOY**

**Balıkesir, Haziran 2006**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**KANSER İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII  
İZOENZİMLERİNİN (CA-IX, CA-XII) EKSPRESYONU,  
SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERE KARŞI İLGİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ÖZEN ÖZENSOY**

**Balıkesir, Haziran 2006**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

KANSER İLİŞKİLİ CA-KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII  
IZOENZİMLERİNİN ( CA-IX, CA-XII)  
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERE KARŞI  
İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ÖZEN ÖZENSOY

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Oktay ARSLAN  
İkinci Danışman: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Sınav Tarihi : 26//06/2006

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ (İÜ)

Prof. Dr. Ümit ÇAKIR (BAÜ)

Prof. Dr. Leman TARHAN (DEÜ)

Yrd. Doç. Dr. Turgut KILIÇ (BAÜ)

Balıkesir, Haziran 2006

Bu doktora alışması Balıkesir niversitesi **2006 / 08** no'lu Araştırma Projesi ile desteklenmiştir.

## ÖZ

# KANSER İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX VE XII İZOENZİMLERİNİN (CA-IX, CA-XII) EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI BİLEŞİKLERE KARŞI İLGİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Özen ÖZENSOY

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,

Kimya Anabilim Dalı

(Doktora Tezi / Tez Danışmanı : Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

Yrd.Danışman: Doç. Dr. Feray KÖÇKAR

Balıkesir, 2006

Çinko içeren karbonik anhidraz ailesi (CA, EC 4.2.1.1) karbondioksit ve bikarbonat iyonu arasındaki basit geri dönüşümlü fizyolojik reaksiyonu katalizler. Solunum, doku ve akciğerlerdeki CO<sub>2</sub> / bikarbonat transportu, pH ve CO<sub>2</sub> homeostasis, tümörleşme ve daha bir çok fizyolojik, patolojik işlemler bu reaksiyonla ilişkilidir.

CA-IX ve CA-XII tümörlü hücrelerde ekspre edilen transmembran izoenzimlerdir. Asidik ekstraselüler pH (pHe) tümör çevresinde kanser gelişimi ve tedavisinde tipik bir özelliktir. Tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimleri tümör markerların içinde en iyi aday olarak gösterilmektedir çünkü ekstraselüler enzim bölgeleri oldukça aktiftir ve ekspresyonları hypoxia ile indüklenir.

Araştırmamızı, tümör ilişkili transmembran izoenzimlerinin ekspresyonu ve saflaştırılması oluşturmaktadır. Bu amaçla sentezlenen , Sepharoz-4B-L-tirozin-sulfonamid yapısına sahip afinite jeli kullanılarak ekspre edilen CA-IX ve CA-XII izoenzimleri sırasıyla 129,5 ve 92,29 kat olarak saflaştırılmıştır. Izoenzimlerin saflık dereceleri SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

Söz konusu saf izoenzimler üzerinde farklı gruptaki 15 antibiyotik ve kemoterapide kullanılan 11 çeşit ilacın inhibisyon etkisi incelenmiştir.

Etkili inhibisyon , CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri için sırasıyla, Rifocine için 2,52;1,02;1,27;1,41(mol/L), Rocamisine için 2,27; 0,92; 1,23; 1,28 (mol/L), Amplital için ise 1,63;1,14;1,69;1,66 (mol/L) olarak belirtilmiştir. Kemoterapi ilaçlarında elde edilen I<sub>50</sub> değerleri Cisplatin/EBEWE için 3,36; 2,15; 0,67; 0,93 (mol/L), 5-Fluorouracil /EBEWE için 14,47; 2,40; 0,83; 1,60 (mol/L) ve Carboplatin EBEWE için 3,35; 8,98; 0,58; 0,68 (mol/L) sırasıyla CA-I,CA-II,CA-IX, CA-XII izoenzimleri için elde edilmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER :** CA-XII, CA-IX, CA-I, CA-II, ekspresyon, saflaştırma, inhibisyon, kanser, antibiyotik, kemoterapi ilaçları

## **ABSTRACT**

### **EXPRESSION AND PURIFICATION OF TUMOR-ASSOCIATED CARBONIC ANHYDRASE ISOZYMES IX AND XII (CA-IX, CA-XII) AND INVESTIGATION OF THEIR AFFINITIES ON SOME COMPOUNDS**

**Özen ÖZENSOY**

**Balıkesir University , Institute of Science, Department of Chemistry**

**(PhD. Thesis / Supervisor : Prof. Dr. Oktay ARSLAN)**

**CoSupervisor: Assoc. Prof. Dr. Feray KÖÇKAR**

**Balıkesir-Turkey, 2006**

Carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) are ubiquitous zinc enzymes which catalyzes a very simple physiological reaction, the interconversion between carbon dioxide and the bicarbonate ion, and are thus involved in crucial physiological processes connected with respiration and transport of CO<sub>2</sub>/bicarbonate between metabolizing tissues and lungs, pH and CO<sub>2</sub> homeostasis, tumorigenicity and many other physiologic or pathologic processes.

CA-IX and CA-XII are transmembrane isozymes which are expressed in tumor cells. Acidic extracellular pH (pHe) is a typical attribute of a tumor microenvironment, which has an impact on cancer development and treatment outcome. The tumor-associated CA IX and CA-XII isoforms are the best candidate, of tumor markers because their extracellular enzyme domains are highly active, expression is induced by hypoxia.

This study deals with expression and purification of tumor associated transmembrane isozymes by a novel affinity technique. For this purpose we determined 129,5 and 92,29 fold purifications of CA-IX CA-XII, respectively with a

Sepharose 4B-L-tyrosine-sulfonamide affinity gel. Their inhibition studies were performed with different groups of 15 antibiotics and 11 chemotherapy drugs.

Most potential inhibition for CA-I, CA-II, CA-IX and CA-XII were calculated as  $IC_{50}$  values 2,52;1,02; 1,27;1,41(mol/L) with Rifocine of, 2,27; 0,92; 1,23; 1,28 (mol/L) with Rocamisine;1,63;1,14;1,69;1,66 (mol/L) with Amplital respectively. For the chemotherapy drugs it was observed  $IC_{50}$  values of 3,36; 2,15; 0,67; 0,93 (mol/L) with Cisplatin/EBEWE, 14,47; 2,40; 0,83; 1,60 (mol/L) with 5-Fluorouracil /EBEWE and 3,35; 8,98; 0,58; 0,68 (mol/L) with Carboplatin EBEWE for CA-I,CA-II,CA-IX and CA-XII isozymes, respectively.

**KEY WORDS:** CA-XII, CA-IX, CA-I, CA-II, expression, purification, inhibition, cancer, antibiotic, chemotherapy drugs



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZ, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	iii
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	v
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	xi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	xii
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	xxii
<b>ÖNSÖZ</b>	xxvi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1 Çalışmanın Amacı	1
1.2 Kanser	1
1.2.1 Kanserin Biyolojisi	3
1.3 Hücre Siklusu Ve Kontrol Noktaları	4
1.3.1 Hücre Siklusu kontrol noktaları	5
1.3.2 Kanser Hücresi Üretiminin Nedeni	6
1.3.2.1 Anormal hücrelerin apoptozise gidememesi	6
1.3.2.2 Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri	8
1.4 Kemoterapi ve Kanser tedavisi	10
1.4.1 Kemoterapi İlaçları	11
1.4.1.1 Anzataks	13
1.4.1.2 Metotreksat-Teva	13
1.4.1.3 Lastet (Etoposid/EBEWE)	13
1.4.1.4 Kampto (irrinotekon)	14
1.4.1.5 Sisplatin/EBEWE	14
1.4.1.6 Gemzar (Gemsitabin HCl)	14
1.4.1.7 5-Flurourasil /EBEWE/ BIOCYN	15
1.4.1.8 Okzaliptatin (Eloksatin,Okzaliptatin, laktöz monohidrat)	15
1.4.1.9 Farmorubisin (Epirubisin Hidroklorür)	15
1.4.1.10 Karboplatin/EBEWE	16
<b>1.5 Antibiyotikler</b>	16

1.5.1 Çalışmada kullanılan Antibiyotikler	17
1.5.1.1 Amoklavın BID	18
1.5.1.2 Gentamisin Sülfat	19
1.5.1.3 Sefamezin (Sefazolin sodyum)	20
1.5.1.4 Amplital ( Sodyum Ampisilin)	21
1.5.1.5 Klasid (Klaritromisin)	22
1.5.1.6 Rifosin (Rifamisin SV)	23
1.5.1.7 Klindaver (Klindamisin fosfat)	24
1.5.1.8 Baktrim	25
1.5.1.9 Siproksin (Siprofloksasin Klorhidrat)	26
1.5.1.10 Kerafloks (Prurifloksasin)	27
1.5.1.11 Kemisetin Süksinat (Kloramfenikol)	27
1.4.1.12 Rosamisin	28
1.4.1.13 Avaloks (Moksiloksasin)	28
1.5.1.14 Amoksilin	28
1.5.1.15 Aksef (Sefuroksim aksetil)	29
1.6 Karbonik Anhidraz	30
1.6.1 Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	31
1.6.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	32
1.6.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları	33
1.6.4 Karbonik anhidraz enziminin Katalitik Mekanizması	35
1.6.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	37
1.6.6 Karbonik anhidraz IX ve XII İzoenzimleri (CA-IX ve CA-XII)	40
1.6.6.1 CA-IX	40
1.6.6.2 CA-XII	41
1.6.7 Hipoksi (Hypoxia)	43
1.7 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayin Metodları	45
1.7.1 CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi	45
1.7.2 Esteraz Aktivitesi	46
1.8 Afinite Kromatografisi	46
1.8.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromotografisi	50

<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b>	51
<b>2.1 MATERYALLER</b>	51
2.1.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar	52
2.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	52
2.2. CA-IX ve CA-XII Proteinlerinin E.coli'de Ekspresyonu	59
2.2.1 CA-IX ve CA-XII Proteinlerinin Ekspresyon Plazmidleri	59
2.2.2 IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi	60
2.2.3 Protein ekstraktlarının Hazırlanması	61
2.2.4 Ekspresyon sonucu üretilen Proteinlerin Saflaştırılması	61
2.2.4.1 Kalmodulin Afinitite Jeli ile Saflaştırma Basamakları	62
2.2.4.1.1 Kalmodulin Afinitite Jelinin Hazırlanması	63
2.2.4.1.1.2 Standard Kolon Metodu	64
2.2.5. Entrokinaz ile Saflaştırılmış CBP Ucunun Ayrılması	64
2.2.5.1. Füzyon Proteinin Ayrılması	64
2.2.5.2 Enterokinase ile Ayrılan Ürünün Uzaklaştırılması	65
2.2.5.3 GST- CA IX ve CA-XII Proteinlerinin İzolasyon Protokolü	65
2.2.6 Protein Ekstraktlarının Hazırlanması	65
2.2.7 Proteinin Saflaştırılması	66
2.2.7.1 GST-Sepharose Ticari Afinitite Jeli ile İzoenzimlerin Saflaştırılması	66
2.2.7.2 Sepharose 4B-L-tirozin-sulfonamid Afinitite Jelinin Sentezi	67
2.2.7.2.1 GST-Sepharoz Afinitite Jeli ile Saflaştırılan İzoenzimlerin Sepharose 4B-L-tyrosine-sulfonamid Afinitite Jeline Tatbik Edilmesi	69
2.2.7.2.2 Numune Hazırlanması	69
2.2.7.2.3 Numunelerin Afinitite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu	69
<b>2.3 YÖNTEMLER</b>	70
2.3.1 Protein Tayini	70
2.3.1.1 Kalitatif Protein Tayini	70
2.3.1.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini	70
2.4 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	71
2.4.1 CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi (Maren Metodu)	71
2.4.2 CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi (Stop Flow Kinetik Alet)	71
2.5 Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) elektroforezi İle	73

Enzim Saflığının Kontrolü	
2.5.1 SDS-PAGE jelinin Boyanması İşlemleri	74
2.5.1.1 Coomassie Brilliant Blue ile Boyama Yöntemi	74
2.5.1.2 AgBr Boyama Yöntemi	74
2.6 Antibiyotikler ve Kemoterapi İlaçları için I <sub>50</sub> değerlerinin Bulunması	75
<b>3. BULGULAR</b>	76
3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	76
3.2 CA-IX ve CA-XII Izoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	76
3.3 CA-IX ve CA-XII Izoenzimlerinin Farklı Antibiyotik ve Kemoterapi İlaçları Üzerindeki İnhibisyon Değerleri	80
<b>3.3.1 Antibiyotikler</b>	81
3.3.1.1 Kemisetin Süksinat	81
3.3.1.2 Amoklavın BID	84
3.3.1.3 Rifosin(Rifamisin SV)	87
3.3.1.4 Sefamezine (Sefazolin sodyum)	90
3.3.1.5 Gentamisin Sülfat	93
3.3.1.6 Klindaver (Klindamisin fosfat)	96
3.3.1.7 Avaloks (Moksiloksasin)	99
3.4.1.8 Kerafloks	102
3.4.1.9 Klasid(Klaritromisin)	105
3.4.1.10 Rozamisin	108
3.4.1.11 Baktrim	111
3.4.1.12 Amplital ( Sodyum Ampisilin)	114
3.4.1.13 Aksef (Sefuroksim aksetil)	117
3.4.1.14 Amoksilin	120
3.4.1.15 Siproksin (Siprofloksasin Klorhidrat)	123
<b>3.4.2 Kemoterapi İlaçları</b>	126
3.4.2.1 Anzataks	126
3.4.2.2 Metotreksat-Teva	129
3.4.2.3 Lastet (Etoposid/EBEWE)	132
3.4.2.4 Kampto (irinotekon)	135

3.4.2.5 Sisplatin/EBEWE	138
3.4.2.6 Gemzar (Gemsitabin HCl)	141
3.4.2.7 5-Florourasil /EBEWE/ BIOCYN	144
3.4.2.8 Okzaplatin (Eloksatin)	149
3.4.2.9 Farmorubisin (Epirubisin Hidroklorür)	152
3.4.2.10 Karboplatin/EBEWE	155
	160
<b>4. SONUÇ VE TARTIŞMA</b>	
	169
<b>5. KAYNAKLAR</b>	

## SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
CA	Karbonik Anhidraz enzimi
CA-I	İnsan eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimi-I
CA-II	İnsan eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimi-II
CA-IX	İnsan eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimi 9
CA-XII	İnsan eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimi 12
PON	Paraoksanaz enzimi
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
E.C.	Enzim kod numarası
U	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N', N',-tetrametil etilendiamin
Hb	Hemoglobin
CNBr	Siyanojenbromür
RCC	Renal hücre karsinomu
pHe	Asidik ekstrasellüler pH

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Hücre siklusunun evreleri	4
Şekil 1.2	Kemoterapi uygulanan kanserli hücre	11
Şekil 1.3	Karbonik anhidraz enziminin katalitik bölgeleri	34
Şekil 1.4	BCA enziminin 3 boyutlu yapısı	35
Şekil 1.5	HCA-II enziminin 3 boyutlu yapısı	35
Şekil 1.6	CA enziminin CO <sub>2</sub> -hidratasyon reaksiyonu kataliz mekanizmasının şematik gösterimi	36
Şekil 1.7	Sulfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması	38
Şekil 1.8	Anyonik inhibitörler ve sulfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyon mekanizması	39
Şekil 1.9	CA-XII izoenziminin yapısı	42
Şekil 1.10	CA izoenzimlerinin hücredeki yerleşimleri	44
Şekil 1.11	CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin pH regülasyonu ve iyon transportuna etkisi	44
Şekil 1.12	Afinite kromatografisinde saflaştırma basamaklarının şematik gösterimi	48
Şekil 1.13	Afinite kromatografisinde uzantı kolunun şematik gösterimi	49
Şekil 2.1	pCAL-n FLAG vektörü	59
Şekil 2.2	pCAL-n FLAG vektörü çoklu klonlama bölgesi	60
Şekil 2.3	Kalmodulin afinite protein ekspresyonu ve saflaştırma	62

sistemi

Şekil 2.4	GSTMN-IX elektroforez jel gösterimi	66
Şekil 2.5	Afinite saflaştırma tekniği ile trombin ayrılması	67
Şekil 2.6	CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin saflaştırılması için kullanılan afinite jelinin kimyasal yapısı	67
Şekil 2.7	Stop Flow Aleti	72
Şekil 2.8	Stop Flow Instrument ile CA-II enziminin alınan adsorpsiyon spektrumu	73
Şekil 3.1	Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik	76
Şekil 3.2	CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin AgBr Tekniği ile boyanmış SDS-PAGE fotoğrafı	77
Şekil 3.3	CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin Comassie Blue boyası ile boyanmış SDS-PAGE fotoğrafı	78
Şekil 3.4	Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	81
Şekil 3.5	Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	82
Şekil 3.6	Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	82
Şekil 3.7	Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	83
Şekil 3.8	Amoklavin BID antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	84
Şekil 3.9	Amoklavin BID antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	85



Şekil 3.10	Amoklavin BID antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	85
Şekil 3.11	Amoklavin BID antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	86
Şekil 3.12	Rifosin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	87
Şekil 3.13	Rifosin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	88
Şekil 3.14	Rifosin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	88
Şekil 3.15	Rifosin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	89
Şekil 3.16	Sefamizin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	90
Şekil 3.17	Sefamizin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	91
Şekil 3.18	Sefamizin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	91
Şekil 3.19	Sefamizine antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	92
Şekil 3.20	Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	93
Şekil 3.21	Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	94
Şekil 3.22	Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	94

Şekil 3.23	Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	95
Şekil 3.24	Klindaver 60 mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	96
Şekil 3.25	Klindaver 600 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	97
Şekil 3.26	Klindaver 600 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	97
Şekil 3.27	Klindaver 600 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	98
Şekil 3.28	Avaloks 400mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	99
Şekil 3.29	Avaloks 400 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	100
Şekil 3.30	Avaloks 400 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	100
Şekil 3.31	Avaloks 400 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	101
Şekil 3.32	Kerfloks 600mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	102
Şekil 3.33	Kerfloks 600 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	103
Şekil 3.34	Kerfloks 600 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	103
Şekil 3.35	Kerfloks 600 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	104
Şekil 3.36	Klasid 500mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi	105

	üzerindeki inhibisyon etkisi	
Şekil 3.37	Klasid 500 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	106
Şekil 3.38	Klasid 500 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	106
Şekil 3.39	Klasid 500 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	107
Şekil 3.40	Rozamisin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	108
Şekil 3.41	Rozamisin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	109
Şekil 3.42	Rozamisin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	109
Şekil 3.43	Rozamisin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	110
Şekil 3.44	Baktrim antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	111
Şekil 3.45	Baktrim antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	112
Şekil 3.46	Baktrim antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	112
Şekil 3.47	Baktrim antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	113
Şekil 3.48	Amplital antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	114
Şekil 3.49	Amplital antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi	115

	üzerindeki inhibisyon etkisi	
Şekil 3.50	Amplital antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	115
Şekil 3.51	Amplital antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	116
Şekil 3.52	Aksef antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	117
Şekil 3.53	Aksef antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	118
Şekil 3.54	Aksef antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	118
Şekil 3.55	Aksef antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	119
Şekil 3.56	Amoksilin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	120
Şekil 3.57	Amoksilin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	121
Şekil 3.58	Amoksilin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	121
Şekil 3.59	Amoksilin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	122
Şekil 3.60	Siproksin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enziminin üzerindeki inhibisyon etkisi	123
Şekil 3.61	Siproksin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enziminin üzerindeki inhibisyon etkisi	124
Şekil 3.62	Siproksin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi	124

	üzerindeki inhibisyon etkisi	
Şekil 3.63	Siproksin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	125
Şekil 3.64	Anzataks kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	126
Şekil 3.65	Anzataks kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	127
Şekil 3.66	Anzataks kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	127
Şekil 3.67	Anzataks kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	128
Şekil 3.68	Metotreksat-Teva kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	129
Şekil 3.69	Metotreksat-Teva kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	130
Şekil 3.70	Metotreksat-Teva kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	131
Şekil 3.71	Metotreksat-Teva kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	131
Şekil 3.72	Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	132
Şekil 3.73	Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	133
Şekil 3.74	Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	133
Şekil 3.75	Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-II	134

	(1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	
Şekil 3.76	Campto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-IX (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	135
Şekil 3.77	Campto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	136
Şekil 3.78	Campto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-I (1.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	136
Şekil 3.79	Campto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-II (1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	137
Şekil 3.80	Cisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-IX (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	138
Şekil 3.81	Cisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	139
Şekil 3.82	Cisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-I (1.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	139
Şekil 3.83	Cisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-II (1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	140
Şekil 3.84	Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-IX (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	141
Şekil 3.85	Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	142
Şekil 3.86	Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-I (1.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	142
Şekil 3.87	Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-II (1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	143
Şekil 3.88	5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-IX	144

	(4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	
Şekil 3.89	5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	145
Şekil 3.90	5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-I (1.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	145
Şekil 3.91	5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-II (1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	146
Şekil 3.92	5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-IX (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	147
Şekil 3.93	5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	147
Şekil 3.94	5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-I (1.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	148
Şekil 3.95	5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-II (1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	148
Şekil 3.96	Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-IX (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	149
Şekil 3.97	Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	150
Şekil 3.98	Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-I (1.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	150
Şekil 3.99	Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-II (1.0x10 <sup>-7</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	151
Şekil 3.100	Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-IX (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	152
Şekil 3.101	Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-XII (4.0x10 <sup>-6</sup> M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	153

Şekil 3.102	Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	153
Şekil 3.103	Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	154
Şekil 3.104	Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	155
Şekil 3.105	Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	156
Şekil 3.106	Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-I ( $4.0 \times 10^{-6}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	156
Şekil 3.107	Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$ M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi	157
Şekil 4.1	Antibiyotiklerin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon dağılımları	164
Şekil 4.2	Kemoterapide kullanılan ilaçların CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon dağılımları	166



## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Çalışmada kullanılan antikanser ilaçları	12
Çizelge 1.2	Çalışmada kullanılan Antibiyotikler	17
Çizelge 1.3	Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	33
Çizelge 2.1	SDS-elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	54
Çizelge 2.2	SERVA gümüş boyama kiti inkübasyon zamanları	56
Çizelge 2.3	pCAL-n-FLAG vektöründe bulunan bazı bölgeler ve nükleotid durumları	60
Çizelge 2.4	Ticari Kalmodulin Afinite Reçinesine uyumlu reaktifler ve kullanım uyarıları	63
Çizelge 3.1	Sepharose-4B-tirozin-sulfonamid afinite jeliyle saflaştırılan CA-IX izoenziminin saflaştırma tablosu	79
Çizelge 3.2	Sepharose-4B-tirozin-sulfonamid afinite jeliyle saflaştırılan CA-XII izoenziminin saflaştırma tablosu	79
Çizelge 3.3	Kemisetine süksinat antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	83
Çizelge 3.4	Amoklavın BID antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	86

Çizelge 3.5	Rifosin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	89
Çizelge 3.6	Sefamizine antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	92
Çizelge 3.7	Gentamisin sülfat antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	95
Çizelge 3.8	Klindamisin fosfat antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki IC <sub>50</sub> değerleri	98
Çizelge 3.9	Avaloks antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	101
Çizelge 3.10	Keralfloks antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	104
Çizelge 3.11	Klasid 500 mg antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	107
Çizelge 3.12	Rozamisin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	110
Çizelge 3.13	Baktrim antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki IC <sub>50</sub> değerleri	113
Çizelge 3.14	Amplital antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	116
Çizelge 3.15	Aksef antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	119
Çizelge 3.16	Amoksilin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	122
Çizelge 3.17	Siproksin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	125

Çizelge 3.18	Anzataks kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	128
Çizelge 3.19	Metotreksat-Teva kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	131
Çizelge 3.20	Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	134
Çizelge 3.21	Kampto (irinotekon) kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	137
Çizelge 3.22	Sisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	140
Çizelge 3.23	Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	143
Çizelge 3.24	5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	146
Çizelge 3.25	5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	149
Çizelge 3.26	Okzaplatin kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	151
Çizelge 3.27	Farmorubisin kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	154
Çizelge 3.28	Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I <sub>50</sub> değerleri	157
Çizelge 3.29	Antibiyotiklerin CA I ,CA II ,CA IX ve CA XII izoenzimleri üzerinde gözlenen inhibisyon değerleri	158
Çizelge 3.30	Kemoterapi ilaçlarının CA I ,CA II ,CA IX ve CA XII izoenzimleri üzerinde gözlenen inhibisyon değerleri	159

## ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmının ilk bölümü, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, ikinci bölümü ise, TÜBİTAK NATO-A2 burs desteğiyle İtalya/Floransa Üniversitesi Bioorganik Kimya laboratuvarında tamamlanmıştır.

Bu teze başlarken beni her anlamda özgür bırakan, bilimsel düşünceyi yaşam biçimi olarak algılamamı sağlayan yüksek lisanstan bu yana her zaman beni destekleyen, takdir ve taltif eden bir öğrencisi olarak değil meslektaşısı olarak gören bana hep güvenen sayın hocam Prof Dr. Oktay ARSLAN' a teşekkür gönül borcumdur. Sevgili hocam, ikinci danışmanım, Doç.Dr.Feray KÖÇKAR'a sabrı, sevecenliği, tezimin her adımında beni yönlendirdiği en önemlisi beni hiç yalnız bırakmadığı için sonsuz teşekkürler.

İtalyadaki deneysel çalışmalarımda beni yönlendiren, sayın Dr. Caludiu T. SUPURAN, Prof. Dr. Andrea SCOZZAFAVA, Dr. Christina VETTORI, Dr. Alessandro CECCHI ve beni ülkemden uzakta bulunduğum süre zarfında yanımda olan diğer tüm arkadaşlarıma destekleri için teşekkür etmek isterim

Ayrıca, desteklerini esirgemeyen sevgili dostlarım; Semra IŞIK, Dr. Selma Sinan, Arş.Gör.Özkan DEMİRBAŞ, Arş. Gör. Onur TURHAN, Arş. Gör. Serap BEYAZTAŞ kan numunelerini sağlayan Bursa Ali Osman Sönmez Onkoloji Hastanesi müdürü Fikret MUTİ ve hastane personeline ayrıca diğer tüm dostlarıma minnettarlığımı belirtmek isterim.

Her anımda desteğini hissettiğim, bana bir hocadan daha çok baba edası üstlenmiş sayın hocam, Prof. Dr. Ümit ÇAKIR' a da en derin minnet ve şükranlarımı sunmak isterim.

Hayatta başarımın asıl temeli olan, her yönüyle beni her anlamda yetiştirmiş, bilgilendirmiş, doktora tezimi bitirmemde her anımı paylaşmış, ama bu sefer yalnız bırakan, *CANIM ANNEM'e*, hep yanımda olan sevgili babama ve artık hayatta tek desteğim olan canım kardeşim Özgür'e ve sevgili eşim Dr. Murat Güler'e bana göstermiş oldukları sabır ve destekleri için teşekkür ederim.

**Balıkesir, 2006**

**Özen ÖZENSOY GÜLER**

***Canım Annem Gülhan ÖZENSÖY'a itafen!***

*Ne zaman aklıma gelsen kara bulutlar düşer yüreğime, nefes alamam,  
Sensizliğin tarifi yok, göz pınarlarımdan şelaler çağıldar, sessiz sessiz!  
Canım biricik anneciğim, içimdeki özlemimle, yüreğimde tüm acılarımla en sevdiğin  
çiçeklerden bir demet buketle sana geleceğim yattığın yerde rahat uyu diyerek!  
Unutmadığım sıcaklığına inat kapanacağıım buz gibi bir mermere!  
Seni çok seviyorum diyeceğim, beni bugünlere getirdiğin için teşekkür edeceğim  
belki duyarsın benim biricik ela gözlü  
CANIM ANNECİĞİM.....*

## **1. GİRİŞ**

### **1.1 Çalışmanın Amacı**

Araştırmamızda, kanser ilişkili karbonik anhidraz CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin ekspre edildikten sonra saflaştırılması düşünülmektedir. Ayrıca saf enzim üzerinde bazı ilaçların etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Tümör mikroçevresinde asidifikasyondan sorumlu ve tümüyle kanserli hücrelerde aktivite gösteren CA-IX ve CA-XII izoenzimlerin kanser dokusundan izolasyonu son derece güç bazı durumlarda ise imkansız olduğu bilinmektedir. Enzimin saflığı inhibisyonu önemli derecede etkilediği düşünüldüğünde daha sağlıklı sonuçların elde edilebilmesi için enzimin saflaştırılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin *E.Coli*'de ekspresyonu sonucu elde edilen enzim, afinite kromatografi tekniği ile belirli ölçüde saflaştırılması gerçekleştirilecektir. Saf izoenzimler üzerinde kanser tedavisinde kullanılan 11 çeşit kemoterapi ilacı ve farklı gruplarda 15 çeşit antibiyotik ile inhibiyon çalışmaları yapılması planlanmıştır.

Elde edilecek sonuçların kanser tedavisinde kullanılacak yeni ilaçların dizaynı ve farmakolojik uygulamaları için son derece önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

### **1.2 Kanser**

Kanser tüm dünyada ve vücudun her hangi bir yerinde ortaya çıkabilen ve önemi giderek artan bir sağlık ve yaşam sorunu durumudur. Her üç kişiden biri hayatının herhangi bir döneminde bu hastalığa yakalanmaktadır.

Ölüm nedeni olarak, kanser kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Batı toplumlarında her yıl 250-350 kişiden biri kansere yakalanmaktadır. 60 yaşın üzerindeki grupta ise kanser riski, 300 kişide 4-5 kişi civarına yükselmektedir. Yurdumuzda en sık görülen kanserler erkeklerde akciğer,

prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanabilir. Deri kanseri sıklığı her iki cinstede de yüksek olmakla birlikte, habis melanom dışındaki deri kanserleri tedaviye iyi cevap verdiklerinden ölüm oranı çok düşüktür [1].

Günlük konuşmalarda kanser diye de adlandırılan karsinom, bir dokunun veya organın hücrelerinde sağlıklı bir değişme ortaya çıkıp bu hücrelerin denetimsiz çoğalmaya başlamasıyla meydana gelen hastalıkların tümü için kullanılan bir genel kavramdır. Vücudumuzun her organı bir çok farklı hücre tiplerinden oluşmaktadır. Normal olarak bu hücreler vücut için gerekli olduğu şekilde belli bir düzen içinde büyüyerek bölünürler. Bu süreç bir düzen içinde yürür ve vücut sağlığının korunmasına yarar. Eğer, yeni hücrelere ihtiyaç olmadığı halde hücreler bölünmeye başlarsa, gereğinden fazla doku oluşmaya başlar. Bu fazlalık dokular “*tümör*” denen bir ürün ortaya çıkmasına sebep olurlar. Böylece oluşan fazlalık doku iyi huylu veya kötü huylu olabilir. İyi huylu tümörler, kanser değildir. Bunlar normal olarak yok edilir ve bir daha da meydana çıkmazlar. Kötü huylu tümörler ise kanser anlamına gelir. Kanser hücreleri denetimsiz büyüyüp bölünür. Bunlar yakınlarındaki sağlıklı dokuların içine girerek bunları bozabilirler. Kanser hücreleri ayrıca ilk tümörden koparak kan dolaşımına veya lenf sistemine girebilirler [2].

Kanser; normal hücrelerin çoğalması, olgunlaşması ve diğer fonksiyonlarındaki bütünlüğün kaybolması ile karakterize edilir, kanserde temel sorun hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybolmasıdır. Çoğalma ya da büyüme genlerin kontrolü altında olduğuna göre genetik faktörler tüm kanser türlerinde etkilidir [3].

Genlerdeki bozukluklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan meydana gelen mutasyon adı verilen değişikliklerle de oluşabilir. Genlerde mutasyonlarla meydana gelen yapısal değişiklikler sonucu hücre normal kontrol mekanizmalarını kaybederek, kontrolsüz çoğalma yeteneği kazanır. Kanser çok hızlı yayılım özelliği göstermesi nedeniyle tedavisi oldukça zor bir hastalıktır. Çok farklı tedavi stratejileri kullanılarak bu sorun çözülmeye çalışılmaktadır. Özellikle metastaz yapmış kanser türlerinde kemoterapik tedavi yaklaşımları oldukça önemlidir. Bu nedenle çok farklı kemoterapik ajanlar geliştirilmeye çalışılmaktadır, bunların metabolizmada yapmış

oldukları hasar ve doğuracakları yan etkilerin azaltılması en büyük hedefdir . Bu amaçla dizayn edilen bu ajanların hücre düzeyinde etkilerinin çok iyi araştırılması gereklidir. Bu yaklaşımlar diğer tedavi yöntemleri ile birlikte, tümör büyümesinin önlenmesi, kontrol altına alınmasını ya da tedavi edilmesini sağlayarak bu hastalığın tam olarak yok edilmesini amaçlamaktadır. Bu tür yaklaşımlar ve umut verici sonuçlar kanserin tam olarak tedavisi için önemli aşamalardır.

### **1.2.1 Kanserın Biyolojisi**

Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, gerek yerel ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan habis hastalıklar grubudur. Normalde hücreler belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptozis" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona (değişime) uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de "onkogen" denir [4]. Onkogenlerin yanında anti-onkogenler de çok önemlidir. Onkogenler kansere sebep olurken, anti-onkogenler kanseri önleyen genlerdir. Anti-onkogenlere "tümörü baskılayan genler" de denir. Bunlar doğal hallerinde iken, yani mutasyona uğramamış hallerinde iken hücre bölünmesini ve çoğalmasını frenleyen, durduran genlerdir. Örnek olarak retinoblastoma genini ve p53 genini gösterebiliriz.

Kanser bir organda oluştuğundan sonra, uzak doku ve organlara da metastaz dediğimiz yerleşmeler yapar ve genel olarak hastalar metastazlar nedeniyle kaybedilir. Hızlı ilerleyen kanserlerde metastaz erken, daha iyi gidişli kanserlerde ise metastaz geç oluşur. Metastaz oluşumu tesadüften çok, kanser hücrelerinin bazı organlara kolay yerleşmelerini sağlayan özelliklerine bağlıdır. Örneğin, kolon kanserleri karaciğere, prostat kanserleri kemiğe metastaz yapmayı tercih etmektedir. Burada, kanserli dokuda kan akımı, damar hücrelerinin aktivasyonu gibi faktörler rol oynamaktadır [5].

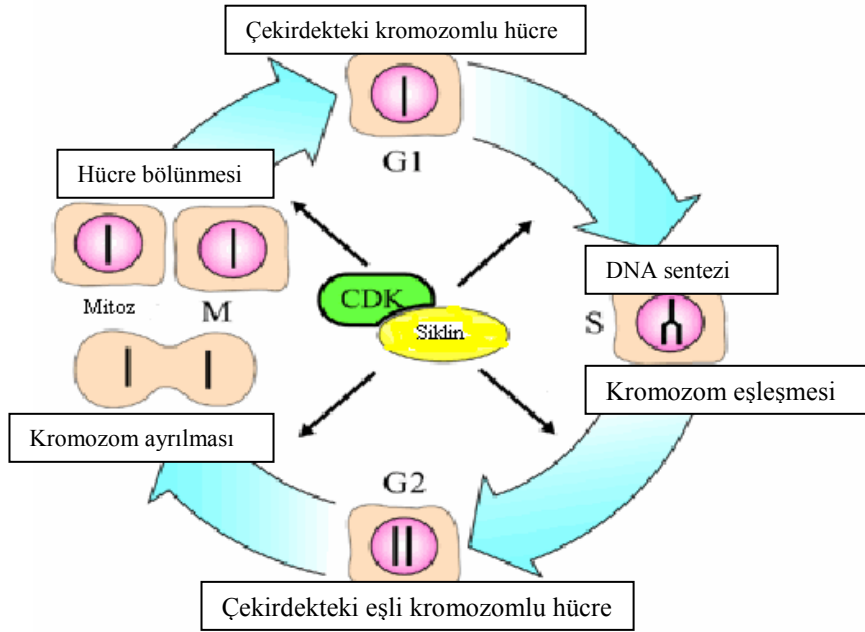


### 1.3 Hücre Siklusu ve Kontrol Noktaları

Her hücre, çoğalma ,farklılaşma, yaşlanma ve ölüm seçeneklerini belirleyen genetik programların kontrolündedir [6]. Hücre siklusu, çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir.

Hücre siklusunda normal hücre çoğalmasının bazı özellikleri:

Normal dokularda, çoğalan hücre sayısı organizmanın ihtiyaçlarının bir fonksiyonudur. Azalmış hücre çoğalması veya artmış ölüm hızı herhangi bir aşırı artışı önler. Hücre siklusu şekil 1.1’de görülmektedir.



Şekil 1.1. Hücre siklusunun evreleri

Hücrenin kendine benzer iki hücreye çoğalması dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir seri fazlardan geçer ve hem dış hem de iç büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogenler ve hücre siklusuna özgü proteinler hücre siklusu boyunca senkronize bir şekilde aktive edilir ve ardından inaktifleştirilir.

**G0 fazında (istirahat fazı)**, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.

**G1 fazında (ara faz, interfaz)**, spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir. Geç G1 fazında bol miktarda RNA sentezlenir. Ayrıca, DNA sentezi için gereken birçok enzim üretilir.

**S fazında (DNA sentezi fazı)** hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.

**G2 fazında** DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder, mitotik "spindle"ların mikrotübüler prekürsörleri üretilir.

**M fazında (mitozis)** protein ve RNA sentez hızı aniden yavaşlar, genetik materyal oluşan iki yeni hücreye dağılır. Mitozisi takiben oluşan yeni hücreler ya G0 ya da G1 fazına girerler.

### 1.3.1 Hücre Siklusu kontrol noktaları

Çoğalma kapasitesine sahip hücreler normal olarak belli kontrol noktalarında dururlar. Bunların en önemlileri, ilki DNA sentezinden hemen önce ve ikincisi mitozisten hemen öncedir. Bu histolojik olarak dinlenme periyotları, olasılıkla siklin bağımlı kinazların ve tümör supresör proteinlerin aktivitelerinin azalmasıyla gerçekleşir. Gerçekte, bu fazdaki hücreler hücre siklusunun bir sonraki fazına girecek proteinleri sentezlediklerinden biyokimyasal olarak aktiftirler. Bu geçiş dönemlerinde (kontrol noktalarında), varsa genetik defektler düzeltilir. Sonuç olarak, hücre siklus boyunca ilerlerken iki kontrol noktasında durur ve kontrol edilmiş olur.

Siklinler, hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Bölünme yeteneğine sahip çoğu normal hücre, büyüme faktörleri, bazı hormonlar, ve hücre yüzey reseptörlerini etkileyen antijen- histokompatibilite kompleksleri gibi dış uyarılara karşı yanıt olarak bölünür. Tirozin kinazlar hücre dışı büyüme faktörlerinden aldığı uyarıyı nukleusa kadar olan bir kaskad şeklinde proliferatif sinyalleri iletirler. Siklinler, kendilerine spesifik olan ve *siklin-bağımlı kinazlar* olarak adlandırılan tirozin kinazlarla kombine olurlar, onları aktive ederler, ve etkilerini düzenlerler. Hücre siklusunda çeşitli fazlarda çeşitli siklinler sentezlenir, ve düzeyleri senkronize bir şekilde siklusun çeşitli fazları boyunca azalır ya da artar.

Normal hücreler DNA sekansında oluşan hataları saptayan mekanizmalara sahiptirler. DNA hasarlandığı zaman bir grup tamir mekanizması hasarlı nükleotidleri normal moleküllerle değiştirir. Bu mekanizmalar oluşan iki yeni hücredeki genetik materyalin ana hücredeki materyalle kesinlikle aynı olmasını sağlarlar.

İlk kontrol noktası geç G1 fazında, S fazına girmeden hemen önce gelir. DNA sentezi için uygun ekstrasellüler sinyaller ve tüm mekanizma işler durumda olsa bile, hücrenin G1 fazını terketmeden önce DNA'nın hasarsız bir durumda olması lazım. Eğer herhangi bir lezyon saptanırsa, hücreler ya hasarı onarır ya da apoptozise giderek ölürlür. Bu kontrol noktası p53 proteinin etki yerlerinden biridir. İkinci kontrol noktası hücreler M (mitozis) fazına girmeden hemen önce gelir. Hücre siklusu inhibitörleri, hücreyi, yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin oluncaya kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde tamamlanamamışsa, veya beraberindeki tüm proteinler, iplikçik materyalleri, ve mitozisin tamamlanması için gerekli diğer tüm maddeler eksiksiz olarak tamamlanmamışsa hücre bu kontrol noktasında her şey başarıyla düzenleninceye kadar durur ve ardından M fazına girer [7].

### **1.3.2 Kanser Hücresi Üretiminin Nedeni**

#### **1.3.2.1 Anormal Hücrelerin Apoptozise Gidememesi**

Apoptozis, programlı hücre ölümü demektir ve anormal DNA'lı hücreleri yok eder [8]. Anormal DNA'lı hücreler ya tamiri olanaksız DNA hasarı oluşmuş ya da yanlış, eksik veya gereksiz olarak fazla transkript olmuş DNA'dan dolayı oluşur. Buradaki apoptozis, belli bir tür için gerekli kromozom sayısının uygun miktarda devam ettirilmesinde ve aneploidinin önlenmesinde ana mekanizmadır. Böylece, DNA'sını sadece doğru bir şekilde ve tam olarak replike etmiş hücrelerin mitozise girmesi sağlanır.

Apoptozis normal doku kaybından sorumludur. Apoptozis ayrıca primatlarda embriyogenez döneminde varolan parmaklar arası perdelerin kaybolmasından da

sorumludur. Apoptozis yaşlanmış ve yararsız hale gelen normal hücrelerin ortamdaki yok edilmelerini sağlar.

Kanser hücreleri ve bazı immün sistem hücreleri normal dokularda apoptozisi anormal olarak indükleyen maddeleri üretirler. Apoptozis genetik olarak düzenlenir ve malign hücrelerde bozulabilir. Örneğin, p53 tümör süpressör onkogeni apoptozisi uyarır. Bcl-2 onkogeni ise apoptozisi inhibe eder. Böylece, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açar [9].

Hücre proliferasyonunu anormal şekilde uyararak genetik bozukluklar, normal proliferasyon mekanizmasından bağımsız olarak oluşur. Reseptörlerin veya sinyal aktarıcı proteinlerin mutasyonları veya aşırı üretimleri hücrelerin büyüme faktörlerinden veya diğer mitotik faktörlerden bağımsız hale gelmesine ve böylece kendi başına giden hücre bölünmesine yol açarlar. Bu gen anormallikleri genellikle dominanttır.

Tümör süpressör genlerdeki anormallikler, hücre bölünmesinin (siklusunun) baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Bu genler resesiftir; yani malign hücre normal hücre ile hibritleştirildiğinde normalleşir.

- **Kalıtısal tümörler:** Retinoblastoma geni (*RBI*) bu genler arasında ilk keşfedilen genidir. Ardından, özellikle sık rastlanmayan veya nadir kalıtısal hastalıklarda olmak üzere diğer süpressör gen anormallikleri de saptanmıştır. Wilm's tümörü (*WT1*), familyal polipozis (*APC*), familyal melonoma (*CDKN20*), ve familyal meme ve over kanserleri (*BRCA-1* ve *BRCA-2*) diğer süpressör gen anormalliklerine örnek olarak verilebilir.
- **p53 süpressör gen:** Bu genler içinde en önemli gen p53 süpressör genidir. Bu genin ürünü olan p53 proteini birçok kompleks aktivitesi olan ve hücre siklusunu baskılayan bir proteindir. Bu protein, DNA sarmalının kırıkları gibi DNA lezyonlarını ve ayrıca radyasyon veya kemoterapi ile oluşan DNA hasarlarını saptayabilir.

DNA lezyonu saptandığında, p53 hücre siklusunu G1 fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptozise yol açan proteinleri indükler. In vitro çalışmalar, kemoterapi ve radyasyonun kanser hücrelerini DNA hasarı yaratarak ve böylece p53'le indüklenen apoptozise yol açarak öldürdüklerini göstermiştir. p53 proteininin eksik olduğu fare timositlerinde ve istirahat halindeki lenfositlerde radyasyonun bu öldürücü etkisi görülmez ve hücreler canlılığını sürdürür.

Birçok insan kanserlerinin mutant *p53* süpressör genine sahip olduğu bulunmuştur. Mutant *p53*, Li-Fraumeni sendromunun karakteristik bulgusudur. Bu sendrom, hem yumuşak doku hem de epitel kaynaklı kanserlerin birçok organda görüldüğü ve erken bir yaşta başladığı dominant bir sendromdur [10].

### 1.3.2.2 Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanser, hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu gerçekleşir. Bu hücreler invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğrattırılar. Kanser hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem kanser hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından dolayıdır [11].

Kanser hücrelerinin bazı özellikleri aşağıdaki şekildedir:

- **Klonal orijin:** Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden doğar. Bazı kanserler birden fazla sayıda malign klonlardan doğar. Bu klonlar ya bir saha hasarı ya da bazı genlerdeki kalıtsal defektler sonucu oluşurlar.
- **İmmortalite:** Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünürler ve bitmez tükenmez miktarda hücre oluştururlar. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Hücre diferansiye olurken, çoğu normal hücre tipinde

telomerler gittikçe kısalır. Fakat, kanser hücrelerinde ve stem hücrelerde telomerler telomerez enziminin etkisiyle yenilenirler. Bu enzim normal olarak hücreler diferansiye olurken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Tamamıyla diferansiye olmuş bir hücre istirahat durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiğinden ölür. Oysa, birçok kanser tipinde telomerez etkinliğini sürdürür veya aktive edilir. Sonuç olarak, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır.

- **Genetik instabilite:** Bu durum, DNA tamirindeki defektlerden dolayıdır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına yol açar. Kanser hücreleri proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt veren klonlar oluştururlar. Bu klonların ayrıca yabancı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve böylece metastaz yaparlar.
- **Kontakt inhibisyon ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı:** Kültür ortamında büyüyen normal hücreler hücrelerin normalde yapıştığı substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde doldurduklarında bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını ihtiva etse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarı katı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeye devam edebilirler. Hatta, hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşsa bile büyümeye devam edebilirler
- **Metastaz:** Benign tümörlerde veya normal hücrelerde bulunmayan bir özelliktir. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmaktan sorumlu hücresel proteinlerin kaybı yada anormalliklerinden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metaloproteaz gibi bazı enzimlerle (kolejenazlar) bazal membranın yıkılmasından dolayı gerçekleşir. Sorumlu proteinler keşfedildikçe ve onların mekanizmaları aydınlatıldıkça metastatik süreç daha iyi anlaşılacaktır.
- **Proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı:** Bu durum kültür ortamındaki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini

tüketmelerine rağmen büyümeye devam ettiklerinden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler. Birçok hayvan türünün de bu şekilde davranması ilginçtir.

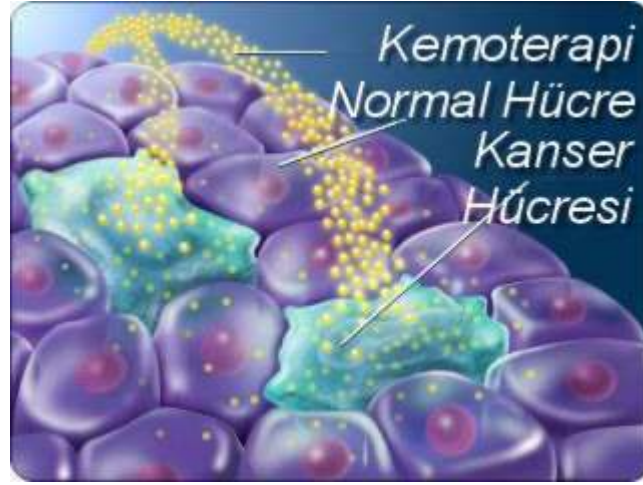
- **Tümör anjiogenezi:** Kan desteği olmayan kanser kolonileri çap olarak 1 mm'den daha fazla büyümmezler. Yeterli kan desteği olmayan koloniler istirahat halinde değildirler. Bu durumdaki koloniler tipik olarak daha hızlı proliferasyon olurlar fakat artmış proliferasyon hızına kompensatuar olarak hücre ölümü de artar. Kan akımı sağlandıktan sonra, hücre ölüm hızı azalır ve tümör hızla büyür. Yeni kan damarlarının oluşumu için bazı maddeler gereklidir. Bu durum normal dokularda böyledir, fakat hemen hemen tüm ölçülebilir kanserlerde bu maddelerin sadece biri üretilir. Bu faktörün adı *Vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF)*. Bu faktör, kendi reseptörünün gelişimini ve diğer kan damarlarının oluşumuna neden olacak büyüme faktörlerini indükler böylelikle VEGF'nün, indüklenmiş epitel hücrelerinde apoptozisi baskıladığı görülmektedir. Tümörler ayrıca anjiogenezi inhibitörleri de içerirler. Bu inhibitörler uzak bölgelerdeki tümörlerin büyümelerini azaltır. Murin akciğer kanserinin bir formu bu gibi inhibitörleri içeren ve böylece primer odağın büyümesini yavaşlatan metastazlara yol açar. Bu mekanizma metastazla birlikte seyreden primer tümörlerin lokalize edilmesindeki güçlüğü ve primer tümörün bulunamadığı durumları açıklayabilir.

#### 1.4 Kemoterapi ve Kanser Tedavisi

Tanısı ve tedavisi güç olan kanser, bir çok uzmanlık dallarının işbirliğini gerektirmektedir. Cerrahi ve radyoterapi kanserin lokal tedavi yöntemleri olup, onların arkasından kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedaviler uygulanmaktadır [12].

Kemoterapi, kanser hücrelerini yok etmek için antikanser ilaçlarının kullanılma şeklidir [13]. Uygulanan kemoterapi, özellikle kanserin türüne, vücudun neresinden başladığına, kanser hücrelerinin tipine ve bu hücrelerin ne kadar yayıldığına bağlıdır. Kemoterapi, kanser tedavisinde, tek başına veya cerrahi işlemle

ve/veya radyoterapi ile birlikte uygulanabilir. Bu ilaçların değerlendirmeleri yapılmış ve yıllardır kullanılmaktadır. Kemoterapi, kanser tipine ve kullanılan ilaçlara göre çok çeşitli yollarla verilebilir. En yaygın yolları damara enjekte etmek ve ağız yoluyla vermektir. Daha ender olarak adaleye veya deri altına enjekte edilir. Özel durumlarda omuriliğe de enjekte edilebilir. Bazı hastalarda, bu yollardan bir kaçını birlikte kullanılabilir. Hangi yolla verirse verilsin ilaçlar kana karışarak vücudun her tarafına tabii ki kanser hücrelerine de ulaşırlar ve hücrelerin kendi kendine bölünmesini ve yenilenmesini engelleyerek tesir ederler. Böylece ilaçlardan etkilenen kanser hücreleri zarar görür ve ölürlür.



Şekil 1.2 Kemoterapi uygulanan kanserli hücre

Tüm normal ve kanser hücreleri yaşamları süresince büyüme ve bölünerek çoğalma evrelerinden geçerler. Kemoterapi ilaçları bu süreci kırarak hücrenin ölümüne yol açar. Her kemoterapi ilacının etkili olduğu evre farklıdır. Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavilerdir. Kemoterapi ise tüm vücuda yayılarak etki eden bir tedavi şeklidir. Normal hücreler kanser hücrelerinden farklı olarak süratle kendi kendilerini yenilerler ve tedavi sırasında oluşan yan etkiler tedavi bitiminde ortadan kalkar. Kemoterapi ilaçları bazı kanser tiplerinde yüksek oranlarda, bazılarında düşük oranlarda etkilidir ancak bu kanserin tipine bağlıdır.



### 1.4.1 Kemoterapi İlaçları

Antikanser ilaçları olarak da bilinen kemoterapi ilaçlarının değişik sınıflandırılmalarına sahip olduğu ve metabolizmada etkilerinin farklı olduğu vurgulanmaktadır [14]. Alkilleyici ajanlar, DNA ile kovalent bağ kurarak DNA replikasyonunu engeller. Antimetabolitler, DNA sentezi metabolik yolunu bloke eder veya bu yola zarar verir. Antitümör antibiyotikleri ise, Topoizomeraz II'ye müdahale eder ve böylece RNA, DNA sentezini inhibe eder, DNA zincirlerinin parçalanmasına sebep olur, bundan başka DNA zincirleri arasına bağlanarak RNA polimeraza müdahale eder ve transkripsiyonu inhibe etmek gibi çeşitli sitotoksik etkilere sebep olurlar. Bitki alkaloidleri sınıfına dahil olan antikanser ilaçları ise, tubulinlere bağlanarak metafazda bölünmeyi inhibe ederler. Topoizomeraz II'ye müdahale ederek DNA sentezini inhibe ederler ayrıca mitokondri fonksiyonlarını inhibe ederler [15]. Çalışmada kullanılan antikanser ilaçları ve sınıflandırılmaları Çizelge 1.1' de verilmiştir.

Çizelge 1.1 Çalışmada kullanılan Antikanser İlaçları

<b>Antikanser ilaçları</b>	<b>Sınıflandırılma</b>	<b>Kullanıldığı kanser ipleri</b>
Anzataks 30 mg/ 5mL	Paklitaksel	Ovaryum kanseri,göğüs kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri
Metotreksat-Teva 50 mg/ 2 mL	Antimetabolit (Folat antagonistleri)	Akut lenfotik lösemi(ALL)
Lastet(Etoposid/EBEWE)100mg/5mL	Bitki alkaloidleri (Podophylltoxinler)	Akciğer kanseri, kaposi's sarkoma
Kampto (irinotekon)100 mg/5 mL	Bitki alkaloidleri (Camptothecins)	Dayanıklı kolon kanseri, ilerlemiş ovaryum kanseri
Sisplatin/EBEWE10 mg /10 mL	Alkilleyici ajan	Ovaryum,baş ve boyun,akciğer,testis
Gemzar (Gemsitabin HCl) 1 g	Mitotik inhibitör	Akciğer kanseri

5-Flurourasil EBEWE1000mg/20mL	Antimetabolit (Pirimidin analogları)	Kolon,mide kanseri
5-Flurourasil /Biocyn1000 mg/20 mL	Antimetabolit (Pirimidin analogları)	Kolon kanseri, mide kanseri
Eloksatin 100 mg/1 mL	Alkilleyici ajan	Ovaryum,baş ve boyun,akciğer,testis
Farmorubisin 50 mg/5 mL	Alkilleyici ajan	Ovaryum,baş ve boyun,akciğer,testis
Karboplatin EBEWE50 mg/5mL	Alkilleyici ajan	Ovaryum,baş ve boyun,akciğer,testis

#### 1.4.1.1 Anzataks

Diğer bir adı da Paklitaksel olan antikanser ilacı Anzataks platin içerikli bir ajandır. Ovaryum kanserinde sıklıkla uygulanır. Bunun yanında metastatik ovaryum kanserinin tedavisinden sonra standard terapi olarak da uygulanmaktadır. Meme kanserinde siklofosfoamid,doksorubisin kombinasyonu ile birlikte kullanılır. Östrojen reseptör-pozitif metastatik meme kanseri olan bazı hastalara bu ajan daha önceden hiç kemoterapi almamışlar ise trastuzumab ile kombine olarak verilir. Ayrıca küçük olmayan hücreli akciğer kanseri tedavisinde de kullanılmaktadır. Uygulaması damar yoluylaadır. İlacın tam bir etki mekanizması bilinmemesine rağmen hücre döngüsünün geç G2 fazında ve M fazında hücreleri bloke eder ve hücre replikasyonu inhibe olur, sinir dokusunun fonksiyonu bozulur [16].

#### 1.4.1.2 Metotreksat-Teva

Antineoplastik etkilidir. Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisi ve psöriazisin kemoterapisinde kullanılır. Ağız yoluyla, kas içine, damar içine veya intratekal (beyni çevreleyen zar bölgesinin içine) uygulanabilmektedir. Folik asidi tetrahidrofolik aside redükleyen dihidrofolat redüktazı geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Genellikle malignan hücreleri,kemik iliği, fetal hücreler,yanak ve barsak mukozası ve mesane hücreleri gibi çoğalan dokular methotrexate'a daha duyarlıdır [17,18].

#### **1.4.1.3 Lastet (Etoposid/EBEWE)**

Antineoplastik etkilidir. Akciğer, testis ve over karsinomları ile Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalarda uygulanır. Uygulaması damar yoluyla en az 30 dakika şeklindedir. İlaç çok hızlı verildiği takdirde şiddetli hipotansiyon (düşük kan basıncı) ortaya çıkabilmektedir. Etoposid aynı zamanda ağız yoluyla da verilebilmektedir. İlacın damar dışına kaçmasından kaçınılmalıdır. Ayrıca lösemi (kan kanseri) gelişim riskinde artış olabileceği görülmüştür. Farmakolojik olarak hücre döngüsünün geç S fazı ve G2 fazlarında hücreleri bloke eder. Bu ilaç %97 oranında proteine bağlandığından kanserli hastalarda ilaç etkisi serum albumine bağlanmasıyla doğru orantılıdır. Küçük hücreleri akciğer kanseri, habis lenfomalar, akut lösemiler testis tümörleri ve mesane kanseridir [18].

#### **1.4.1.4 Kampto (irrinotekon)**

Uygulaması damar yoluyla yapılır. Doz kısıtlayıcı yan etkileri ishal ve düşük lökosit sayısıdır. DNA topoizomeraaz I'ın spesifik inhibitörü olarak etki eden bir antineoplastik bir ajandır. DNA topoizomeraaz I bu ilaç ile etkileşimi ile tek zincirli DNA lezyonları meydana gelip DNA replikasyon çatalı bloke olur. Bu S fazında spesifik bir durumdur [18].

#### **1.4.1.5 Sisplatin/EBEWE**

Sis-diamin-dikloroplatinyum (II); çok güçlü kemoterapik antikanser ilaçlarından biridir. Sisplatin tek başına ya da kombine olarak diğer ilaçlarla birlikte ovaryum, testis, mesane, serviks, yemek borusu, baş ve boyun kanserleri ile küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini de içeren çok geniş ve değişik tümörlere karşı klinikte kullanılmaktadır. Damar yoluyla veya vücut boşluklarına uygulanmaktadır. İlacı kullanacak hastanın sıvı dengesinin iyi olması gerekmektedir. Sıvı dengesinin yetersiz kalması durumunda, yan etkilerin daha şiddetli şekilde ortaya çıktığı kanıtlanmıştır. Böbrek fonksiyonları yetersiz olan, duyma güçlüğü çeken, daha önceden nöropatiye (periferik sinir sistemi hasarı) maruz kalmış veya cis-platin alerjisi olan hastalarda uygulanırken son derece tedbirli davranılmalıdır. sis-diaminodikloroplatinyum içeren inorganik ağır metaldir. İlaç DNA zincirinde

çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini inhibe eder, ayrıca daha az bir oranda protein ve RNA sentezini de inhibe etmektedir [19].

#### **1.4.1.6 Gemzar (Gemsitabin HCl)**

Uygulaması damar yoluyla 30 dakika civarındadır. Gemsitabin murin ve insan tümör hücrelerini içeren çeşitli kültürlerde anlamlı sitotoksikite gösterir. DNA sentez döneminde (S-fazı) olan hücreleri öldürerek ve belirli koşullarda hücrelerin G1/S fazı sınırına ulaşmasını önleyerek hücre fazı spesifitesi gösterir. Hücre içinde nükleozid kinazlar yoluyla aktif difosfat ve trifosfat nükleozidlere metabolize eder ve DNA sentezini inhibe eder. Gemsitabin DNA yapısına girdikten sonra uzayan DNA zincirlerine ek bir nükelotid eklenir. Bu eklenmeden sonra daha ileri düzeyde DNA sentezinin tam bir inhibisyonu gerçekleşir ve daha sonra apoptozis olarak bilinen programlı hücre ölüm sürecini indükler [18].

#### **1.4.1.7 5-Flurourasil /EBEWE/ BIOCYN**

Antineoplastik etkilidir. Basit tümörlerin ve özellikle rektum, kolon, meme, uterus, pankreas, karaciğer, yumurtalık ve mesane karsinomlarının tedavisinde kullanılır. Damar yoluyla ve bazı vücut boşluklarına uygulanabilmektedir. Yan etkileri, bulantı, kusma, ağızda yara (stomatit-mukozit) oluşumu, yemek borusunda yaralar ve mide ülserleridir. Düşük lökosit sayısı görülebileceği gibi, saç kaybı ve tırnaklarda renk değişimi ortaya çıkabilmektedir. Cilt güneşe duyarlı hale geldiği için güneşten sakınma önerilmektedir. Antimetabolitler grubundan florlu bir pirimidin türevidir. DNA sentezini bloke eder, hücre bölünmesini timidilat sentetaz ile kompleks oluşturarak inhibe eder. Bu ilacın monoterapötik bir ajan olarak kullanılmasının önemi, kolon ve rektum kanserlerinde daha geçerlidir [17,18].

#### **1.4.1.8 Okzaliplatin (Eloksatin, Okzaliplatin, laktöz monohidrat)**

Damar yoluyla kısa süreli veya uzatılmış 120 saate kadar sürekli infüzyon şeklinde uygulanabilmektedir. Sinir hasarı (ellerde ve ayaklarda bazen dudaklarda hissizlik ve karıncalanma) olabilir fakat genellikle ilaç kesildikten sonra düzelir. Kanda lökosit ve trombositlerde hafif düşüslere sebep olabilir. Okzaliplatin atomunun 1,2 diaminosiklohegzan ve bir okzalat grubuyla kompleks oluşturduğu yeni

platin esaslı bileşik sınıfının üyesi olup okzaliplatin tek bir enantiyomerdir ve etki mekanizması tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte bu konuda yapılan çalışmalar biyotransformasyona uğramış sulu okzaliplatin ürünlerinin DNA ile etkileşerek inter ve intrastrand çaprazbağlar oluşturduğu ve bu şekilde DNA sentezini bozarak sitotoksik ve antitümör etkilere yol açtığını göstermiştir [18].

#### **1.4.1.9 Farmorubisin (Epirubicin Hidroklorür)**

Antineoplastik etkilidir. Meme karsinomu, malign lenfoma, yumuşak doku sarkomu, mide, karaciğer, pankreas ve akciğer karsinomu ve over karsinomunda etkilidir ve antrasiklin sınıfından bir antibiyotiktir. Etki mekanizması maddenin DNA'ya bağlanabilmesinden kaynaklanmaktadır. Hücre kültürü çalışmaları, Farmorubicin'in süratle hücreye geçtiğini, nukleusta lokalize olduğunu nükleik asit sentezini ve mitozu inhibe ettiğini göstermiştir. Maddenin timüsü çıkarılmış tüysüz farelere transplantasyonu yapılan bir çok insan tümörüne karşı da (melanoma,meme,akciğer,prostat ve over karsinomları)aktif olduğunu göstermiştir [17,18].

#### **1.4.1.10 Karboplatin/EBEWE**

İkinci nesil platinyum ilaçlarından olan karboplatin bugün kanser kemoterapisinde rutin olarak kullanılır. Karboplatin, cisplatine göre alternatiftir ve daha az toksik bir bileşik olarak dünya çapında kabul görmüş ve kemoterapide sıklıkla kullanılmaktadır. Antineoplastik ve sitotoksik ajan olarak etki gösterir. Sitotoksik etkisi, platinasyon yoluyla DNA zincirinde tekli ve çiftli çapraz bağlanmalar oluşturmasından ileri gelir ve DNA matriks fonksiyonu bozulur [20].

### **1.5 Antibiyotikler**

Kanser tedavilerinin geleceğine ilişkin yönelimler, yeni tür kombinasyon tedavilerinin daha etkili sonuçlar yarattığı antiviral ve antibiyotik tedavilerinin gelişim süreçlerini yakından izlemektedir.

Herhangi bir mikroorganizma tarafından, başka bir mikroorganizmayı öldürmek veya çoğalmasını durdurmak için üretilen her türlü maddeye “antibiyotik”

adı verilir [21]. Antibiyotikler etkili oldukları mikropların metabolik işlemlere müdahale ederek çalışırlar ve bu işlemlere göre spesifiktir. Bu metabolik işlemlere örnek olarak; protein sentezi, hücre çeperi sentezi, nükleik asit sentezi veya hücre zarı fonksiyonlarını verebiliriz. Penisilin, vankomisin ve sefalosporin gibi antibiyotikler bugün en çok kullanılan antibiyotiklerdendir. Bu antibiyotiklerin hepsi bakterilerin peptidoglikan hücre çeperlerini zayıflatır ve bakteri patlar (lisis). Antibiyotikler bu molekülleri bir arada tutan peptit bağlantılarının sentezini önlerler [22].

Streptomisin, eritromisin, tetrasiklin ve kloramfenikol gibi antibiyotikler ise ya protein sentezini önlerler ya da anormal proteinlerin sentezlenmesine yol açarlar. Antibiyotikler bunları bakterilerin ribozomlarına bağlanarak yaparlar. Bakteri ribozomları ökaryotik ribozomlardan (insan ribozomları gibi) daha küçük oldukları için, bu tür antibiyotikler sadece bakterileri etkiler. Böylece bakterilerin saldırdığı canlıya zarar vermezler [23]. Rifamisin ve antrasiklin gibi antibiyotikler ise nükleik asit sentezine müdahale ederler. Antrasiklinler bunu DNA replikasyonunu önleyerek yaparken, rifampisin transkripsiyonu önler.

### 1.5.1 Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler, gruplarına göre ve ticari adlarına göre ayrılarak Çizelge 1.2' de verilmiştir.

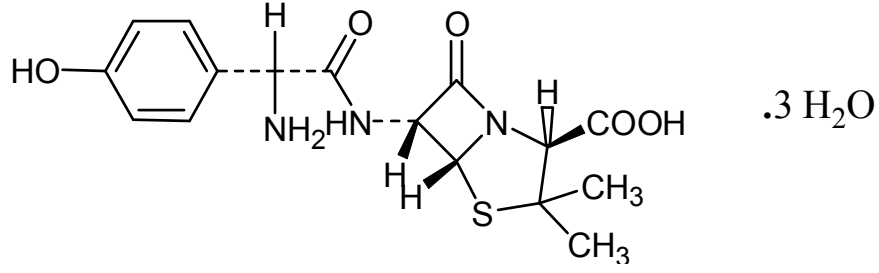
Çizelge 1.2 Çalışmada kullanılan Antibiyotikler

Ticari Antibiyotik İsimleri	Etken madde	Antibiyotik grupları	Hücredeki etkisi
Amoklavın BID	Amoxilin-potasyum kluvanat	Penisilin	Hücre duvarı sentezi
Genta 80 mg	Gentamisin Sülfat	Aminoglikozit	Protein sentezi
Cefamezine	Sefazolin sodyum	Sefalosporin	Hücre duvarı sentezi
Amplital	Sodyum ampisilin	Penisilin	Hücre duvarı

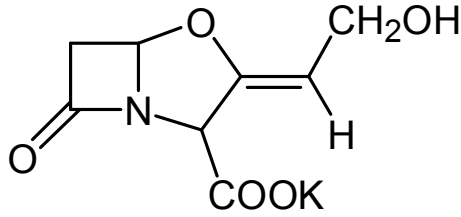
			sentezi
Klacid 500 mg	Klatromisin	Makrolid	Protein sentezi
Rifocine	Rifamicin	Ansamisinler	Protein sentezi
Klindaver 600 mg	Klindamisin fosfat	Linkozamid	Protein sentezi
Bactrim	Trimethoprim-sulfamethoxazole	Sulfonamid	Bakteriyel antimetabolitler
Ciproxin 500 mg	Ciprofloxacın	Kinolon	DNA-Giraz inhibitörleri
Kerafloxx 600 mg	Prurifloxacın	Kinolon	DNA-Giraz inhibitörleri
Kemicetine süksinat	Kloramfenikol Süksinat	Kloramfenikol	Protein sentezi
Rosamisin	eter oksim	Makrolid	Protein sentezi
Avalox 400 mg	Moxifloxacın	Kinolon	DNA-Giraz inhibitörleri
Amoxicilina 1 g	Amoksilin	Penisilin	Hücre duvarı sentezi
Aksef	Sefuroksim aksetil	Penisilin	Protein sentezi

### 1.5.1.1 Amoklavın BID (Amoksilin-potasyum klüvanat)

Amoklavın antibiyotiği, yarı sentetik amoksilin antibiyotiği ve bir laktamaz inhibitörü olan klüvanatın(klüvanik asidin potasyum tuzu) kombinasyonunu içerir. Amoksilin ampisilin bir analogu olup, temelinde penisilin çekirdeği 6-aminopenisillanik asitten türemiştir. Amoksilin moleküler formülü,  $C_{16}H_{19}N_3O_5S^{\circ} \cdot 3H_2O$  ve moleküler ağırlığı 419.46 g/mol olarak bilinmektedir. Kimyasal olarak amoksilin (2S, 5R, 6R)-6-[(R)-(-)-2-Amino-2-(p-hidroksifenil)asetamido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-thia-1-azabisiklo[3.2.0]heptane-2-karboksilikasittrihidrat'tır.



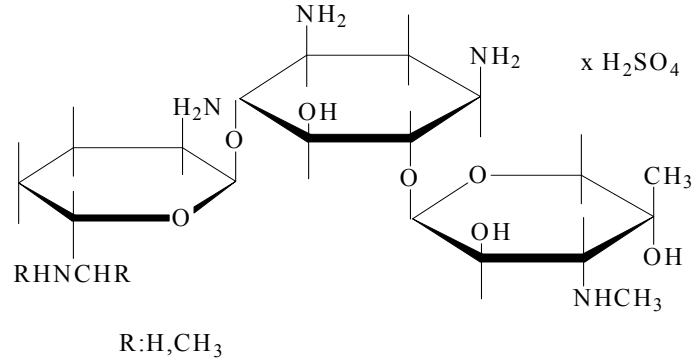
Klavulanik asit, *Streptomyces clavuligerus*'un fermentasyonu sonucu üretilmiştir ve özellikle klinik olarak önemli plazmid bağlı laktamazların sıklıkla penisilin ve sefalosprinlerin ilaç dirençleri için aktiftir. Klavulanat potasyumun molekül formülü  $C_8H_8KNO_5$  olup molekül ağırlığı 237.25g/mol olarak verilmektedir. Kimyasal yapısı olarak klavulanat potasyumu, potasyum (Z)-(2R, 5R)-3-(2-hidroksietildene)-7-oxo-4-oxa-1-azabisiklo[3.2.0]-heptan-2-karboxilat olarak gösterebiliriz [24].



### 1.5.1.2 Genta (Gentamisin Sülfat)

Gentamisin, bir aktinomiset olan *Mikromonospora purpurea*'dan elde edilen, duyarlı bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bakterisid etkili bir aminoglikozid antibiyotiktir. Gentamisin *E. coli*, indol pozitif ve negatif *Proteus* türleri *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* grubu türleri *Citrobacter* türleri ve penisilin ve metisiline dirençli *Staphylococcus* türleri de dahil geniş etki spektrumuna sahiptir. Ayrıca *Shigella* ve *Salmonella* türlerine karşı da *in vitro* olarak etkilidir. Gentamisine karşı bakteriyel direnç zor gelişmektedir. Gentamisin hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler ile kombine kullanıldığı zaman D grubu streptokok suşları üzerinde sinerjik bir etki göstermektedir. Gentamisin intramusküler yolla verilmesinden sonra kısa sürede (30-60 dakika) doruk plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Böbrek fonksiyonu normal kişilerde gentamisin yarı ömrü 2 saatten biraz fazladır [25].





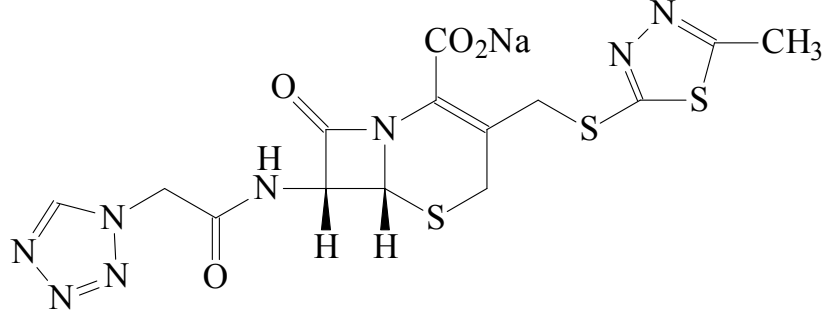
0-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranosyl-(1.4)-0-[3-deoxy-3-(methylamino)-D-xylopyranosyl-(1 6)]-2-deoxy-D-streptamine.

Yapılan bir çalışmada, gentamisin sülfat antibiyotiği in vitro ortamda glutatyon metabolizmasında rol oynayan glutatyon redüktaz enziminin aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir [26]. Shigenobu tarafından yapılan bir başka çalışmada insan nötrofil hücrelerinde ve hücre dışında in vitro ortamda NADPH oksidaz enzimi üzerinde gentamisin sülfatın doza bağımlı olarak inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir [27]. Ayrıca gentamisin sülfatın koyun göz merceğindeki glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimini de inhibe ettiği bulunmuştur [28].

### 1.5.1.3 Sefamezin (Sefazolin sodyum)

Sefazolin sodyum bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren bir sefalosporindir. Sefazolin sodyum enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Sefazolin sodyum intramusküler uygulandıktan 1 saat sonra serumda maksimum konsantrasyona ulaşır ve en etkili olduğu andır. Sefazolin sodyumun serum yarılanma ömrü intramusküler uygulamada yaklaşık 2 saattir. Sefazolin sodyumun % 90'dan fazlası idrarda değişmeden dışarı atılır. Sefazolin sodyum *Staphylococcus aureus*, (penisilaz üreten suşlar dahil) *Staphylococcus epidermidis* (metisiline dirençli stafilokoklar hariç) A grubu beta hemolitik streptokoklar ve diğer streptokok suşları, *Streptococcus pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Proteus mirabilis*,

*Klebsiella* türleri *Enterobacter aerogenes*, *Haemophilus influenza* 'ya karşı duyarlıdır [25].



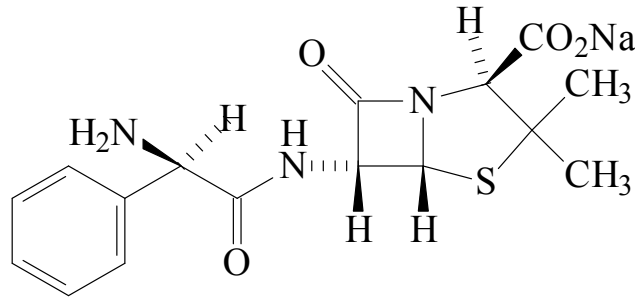
(6R,7R)-3-(5-metil-1,3,4-tiyadizol-2-sülfanilmetil)-8-okso-7-[2-(1H-tetrazol-1-il)asetilamino]-5-tiya-1-azabisiklo [4.2.0]okt-2ene-2-karboksilat

Sefazolin sodyum ile yapılan *in vitro* bir çalışmada koyun karaciğerinden saflaştırılan glikoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde güçlü inhibisyon gösterirken [29], koyun gözünden salınan glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde aktivasyonuna neden olmaktadır [28]. Benzer şekilde sefazolin sodyum antibiyotiği insan eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi göstermiştir [30]. Sefazolin sodyumun bulunduğu sefalosporinler ana antibiyotik grubunda bulunan sefatoksim antibiyotiği sığır eritrositlerinden saflaştırılan glutatyon redüktaz enzimi üzerinde yarışmalı bir inhibisyon göstermiştir [26].

#### 1.5.1.4 Amplital ( Sodyum Ampisilin)

Bir aminopenisilanik asit türevi olan ampisilin geniş bir spektruma sahip olup gram (+) ve gram (-) aerob ve anerob mikroorganizmalara karşı bakterisit etkilidir; bu etkisini bakterilerin hücre duvarı mukopeptit biyosentezini inhibe ederek gösterir. Ampisilin  $\beta$ -laktamazlara karşı dayanıklı değildir; kolayca parçalandığından etkisiz bir duruma gelir. Ampisilin  $\beta$ -laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* ile

*Staphylococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* ve *Streptococcus viridans*'a *in vitro* etkilidir. Ayrıca gram (-) mikroorganizmalardan,  $\beta$ -laktamaz salgılayan ve salgılamayan *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii* ampisiline duyarlıdır. Anaerob mikroorganizmalardan, *Clostridium* türleri, *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve *B. Fragilis* dahil *Bacteroides* türlerine ampisilin etkilidir. Ampisilin intravenöz ve intramusküler uygulamadan sonra kanda yüksek konsantrasyonlar oluşturur ve ortalama yarılanma süresi sağlam bireylerde yaklaşık 1 saattir. Uygulandıktan sonra ilk 8 saat içinde %75-85 oranında değişmeden idrarla atılır [25].



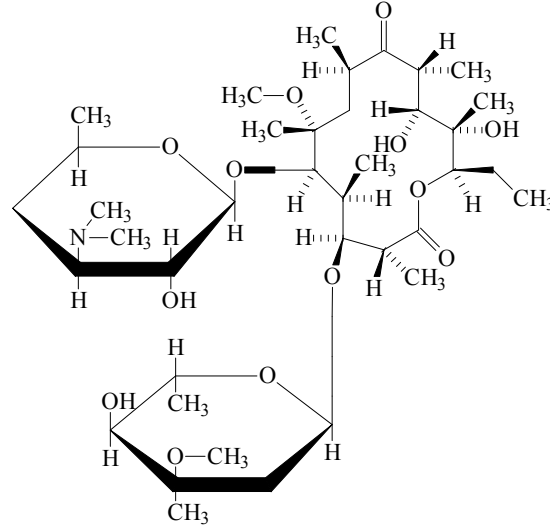
Monosodyum (2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenilasetilamino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tiya-1-azabisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilat

Yapılan bir *in vitro* çalışmada insan eritrositlerinden izole edilen karbonik anhidraz I ve II enzimi üzerinde ampisilin'in inhibisyon etkisi tespit edilmiştir [31]. Benzer şekilde insan eritrosit glikoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi üzerinde ampisilin *in vitro* inhibisyon etkisi göstermiştir [32].

#### 1.5.1.5 Klacid (Klaritromisin)

Klaritromisin bir semi-sentetik makrolid antibiyotiktir. Klaritromisin ve metaboliti 14-OH klaritromisin vücut dokularına ve sıvılarına kolayca dağılır. Yüksek intraselüler konsantrasyonundan dolayı, doku konsantrasyonları, serum

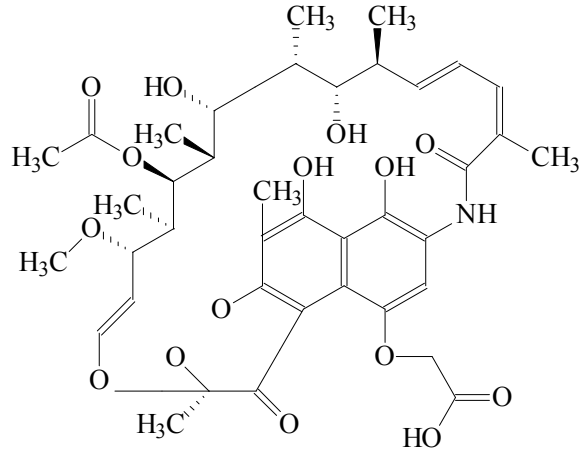
konsantrasyonlarından daha yüksektir. Klaritromisin, duyarlı bakterinin 50S ribozom alt ünitelerine bağlanarak antibakteriyel etkisini gösterir ve protein sentezini inhibe eder. Klaritromisin *in vitro* olarak birçok aerob ve anaerob gram-pozitif ve gram-negatif organizmalar olan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, *Heliobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Pasteurella multocida* ve *Propianibacterium acnes*'e karşı etkilidir. Ayrıca *Myobacterium avium* kompleks organizmalarına da etkilidir. Klaritromisinin ortalama terminal faz plazma yarı ömrü doza bağımlı olup 2.1 ila 4.5 saat arasında değişmektedir, molekül ağırlığı 747.9g/mol olup kapalı formülü,  $C_{38}H_{69}NO_{13}$  [25].



Makrolid grubunda yer alan klaritromisin antibiyotiği karaciğer metabolizmasında önemli bir yeri olan P-450 enzimlerinden CYP3A enziminin dönüşümsüz inhibitörüdür [33,34]. Klaritromisin ile CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2D6 enzimlerinin substratları arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiş [35,36] ve klaritromisinin *in vivo* ortamda insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada CYP1A2, CYP2C9 ve CYP2D6 enzimlerinin inhibe ettiği gösterilmiştir [37].

### 1.5.1.6 Rifocin (Rifamisin SV)

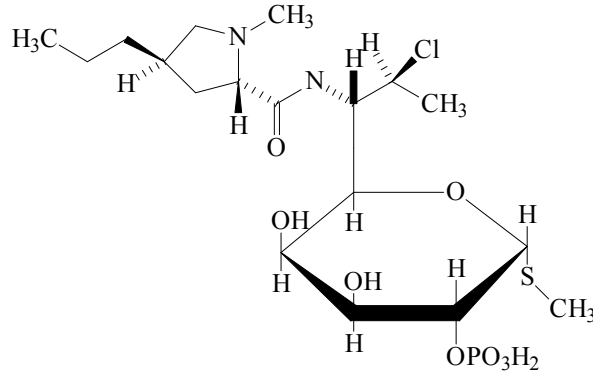
Rifamisin SV yüksek bakterisid etkiye sahip bir antibiyotiktir. İn vitro antimikrobiyel etki diğer antibiyotiklere karşı dirençli olsalar bile, gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda kendini gösterir. Antibakteriyel spektrumu *Myobacterium tuberculosis*'i de kapsar. Rifosin rifamisin grubu haricinde diğer antibiyotiklerle çapraz rezistans oluşturmaz. Klinik deneyler Rifosin'in gram-pozitif mikroorganizmaların (*stafilokok*, *streptokok*, *pnömokok* ve benzerleri) neden olduğu enfeksiyonlar ile gram-negatif mikroorganizmaların neden olduğu bazı enfeksiyonların tedavisinde özellikle etkili olduğunu göstermiştir. Rifosin'in safrada yüksek konsantrasyona ulaşması onu safra kesesi enfeksiyonlarının tedavisinde özellikle kullanılması gereken bir ilaç haline getirir. Rifosin intramusküler uygulamadan 6 saat sonra organizmada maksimum etki seviyesine ulaşır [25].



Çalışmamızda kullandığımız rifosin grubundan rifamisin SV antibiyotığının yapılan bir çalışmada DNA polimeraz enziminin güçlü inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [38]. Ayrıca Rifamisin SV türevlerinin insan nötrofil hücrelerinin fonksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [39].

### 1.5.1.7 Klindaver (Klindamisin fosfat)

Klindamisin fosfat, *in vivo* koşullarda hızla hidroliz olarak antibakteriyel etkiye sahip klindamisine dönüşür. Klindamisin, makrolidlere benzer şekilde bakteri ribozomlarına bağlanarak, protein sentezinin ilk aşamasını inhibe eder. Temel olarak bakteriyostatik olmakla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda duyarlı suşlara karşı bakterisid etki gösterir. Klindamisin, şu mikroorganizmalar karşı *in vitro* olarak etkilidir; Aerob gram pozitif koklardan; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, streptokoklar ve pnömokoklar. Anaerob gram negatif basillerden; *Bacteroides* türleri ve *Fusobacterium* türleri. Anaerob gram pozitif spor yapmayan basillerden; *Propionibacterium*, *Eubacterium* ve *Actinomyces* türleri. Anaerob ve mikroaerofilik gram pozitif koklardan *Peptococcus* türleri, *Peptostreptococcus* türleri ve mikroaerofilik streptokoklar. *Clostridium perfringens* suşlarının çoğu klindamisine duyarlıdır [25].



Metil 7-klor-6,7,8-trideoksi-6-[(2S, 4R)-1-metil-4-propilpiyrolidin-2-karboksamido]-1-L-treo- $\alpha$ -D-galakto-oktapiyranosit 2-dihidrojen fosfat.

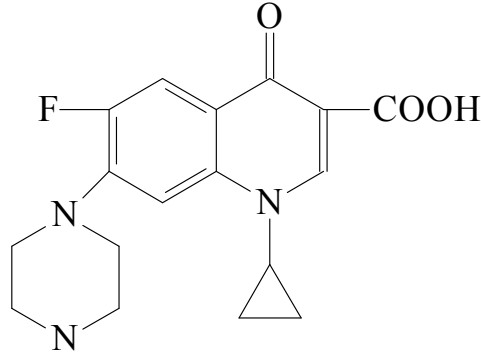
Klindamisin fosfat intramusküler yoldan uygulandığında, serumdaki en yüksek aktif klindamisin konsantrasyonlarına erişkinlerde 3 saat içinde ulaşılır. Aktif klindamisinin serumdaki yarılanma süresi 3 saattir.

### 1.5.1.8 Baktrim

Baktrim, trimethoprim ve sulfamethoxazole'den türemiş sentetik bir antibiyotiktir. Her bir tablet 160 mg trimethoprim ve 800mg sulfamethoxazole, magnezyum sterat, jelatinli nişasta ve sodyum nişasta glikolat ihtiva eder. Trimethoprim, 2,4-diamino-5-(3,4,5 trimethoksibenzil)pirimidin yapısal formülüne sahip olup, molekül formülü  $C_{14} H_{16} N_4 O_3$ 'tür. Molekül ağırlığı ise 290.3 g/mol'dür. Sulfamethoxazol ise, N1-(5-metil-3-isoxazolyl)sulfanilamide formülüne sahiptir ve  $C_{10} H_{11} N_3 O_3 S$  kapalı formülüdür. Molekül ağırlığı 253.28 g/mol olarak verilmektedir [40].

### 1.5.1.9 Siproksin (Siprofloksasin Klorhidrat)

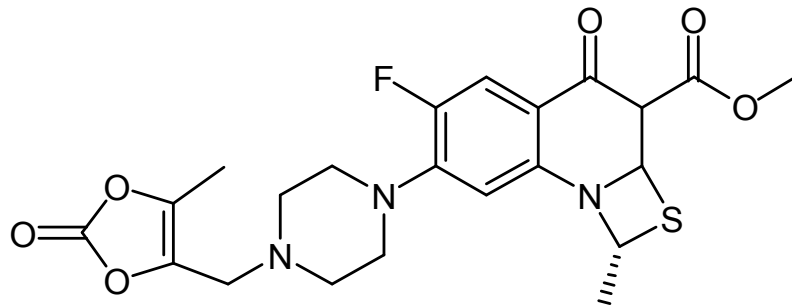
Siprofloksasin kinolon grubunda yeni bir aktif maddedir. Bu grup maddeler jiraz inhibitörleri olarak bilinmektedirler. Siprofloksasin geniş bir bakteri spektrumuna karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahiptir. Siprofloksasin bakterinin normal metabolizması için gerekli enformasyonun kromozomdan okunmasını engelleyerek çoğalma kapasitesinde hızlı bir düşüşe neden olur. Ayrıca siprofloksasin, bu özel etki mekanizmasından dolayı jiraz inhibitörleri dışında kalan antibiyotiklere genel olarak paralel rezistans göstermesi ile de karakterizedir. Bundan dolayı siprofloksasin, aminoglikozidler, penisilinler, sefalosporinler, tetrasiklinler ve diğer antibiyotiklere dirençli bakterilere de yüksek derecede etkilidir. Siprofloksasin *pseudomonas*, *streptokoklar* ve *stafilokok* suşlarına karşı oldukça etkilidir. Serumda yarılanma süresi 3-5 saattir. Serumda proteinlere bağlanma özelliği yaklaşık olarak % 30'dur [25].



Siprofloksasinin de içinde bulunduğu kinolon antibiyotik grubu üyeleri ultraviyole ışığa maruz bırakıldıklarında toksik ve mutagenik özellik göstermektedirler. Bu özelliğini örneğin siprofloksasin insan topoizomeraz II $\alpha$  enzimini inhibe ederek göstermektedir [46]. Siprofloksasin antibiyotiğinin katalitik DNA zincir pasaj aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur [47]. Ayrıca insan karaciğer mikrozomları ile yapılan doku kültürü çalışmalarında bu antibiyotiğin karaciğer metabolizmasında önemli bir yeri olan P-450 enzimlerinden CYP1A2 enziminin güçlü bir yarışmalı inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [48]

#### 1.5.1.10 Kerafloks (Prurifloksasin)

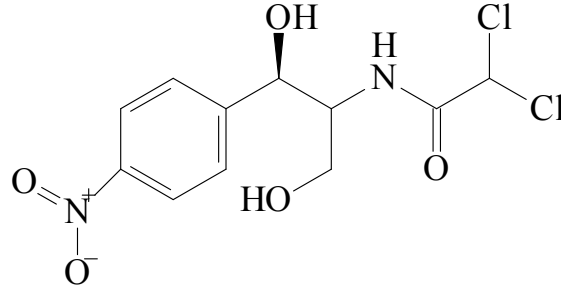
Kinolon grubundan olan Prurifloksasin'in molekül ağırlığı, 461.465 g/mol olup, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S1H,4H-(1,3)Thiazeto(3,2-a)quinolin-3-karboksilik asit, 6-fluoro-1-metil-7-(4-((5-metil-2-oxo-1,3-dioxol-4-yl)metil)-1-piperazinil)-4-oxo molekül formulüne sahiptir. Hücredeki etkisi DNA-Giraz inhibitörü olarak çalışır [44].





#### 1.5.1.11 Kemisetin Süksinat (Kloramfenikol)

Kloramfenikol, *in vitro* olarak birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakteriyostatik etkiye sahip *Rickottsiae*, *Lymphogranuloma-psittacosis* grubu ve vibrio cholera'ya karşı etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Özellikle *Salmonella* tipi ve *Hemophilus influenza*'ya karşı aktiftir. Tesirini sağlam hücrelerde ve hücre içermeyen sistemlerde protein sentezini etkileyerek veya inhibe ederek gösterir. Kloramfenikol intramusküler yoldan verildikten sonra süratle difüzyona uğrar ancak dağılımı tek tip değildir. Karaciğer böbreklerde yüksek konsantrasyonlara, beyin ve serebrospinal sıvıda ise düşük konsantrasyonlara ulaşır [25].



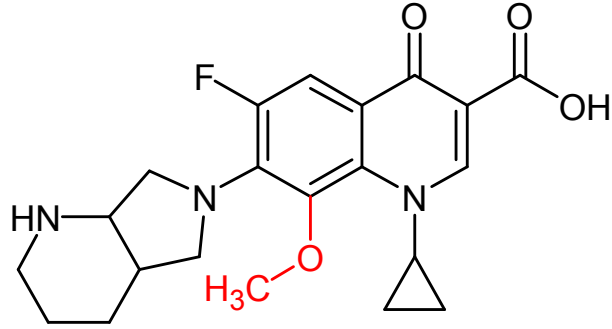
Yapılan bir çalışmada, kloramfenikol antibiyotiğinin sitokrom P-450 enziminin aktif bölgesindeki lizin aminoasidi ile kovalent amid bağı yaparak söz konusu enzimi dönüşümsüz inhibe ettiği bulunmuştur [45].

#### 1.4.1.12 Rosamisin (Eritromisin)

Rosamisin, *Micromonospora rosaria* türetilmiş makrolid bir antibiyotiktir. Eritromisin ile kimyasal ve biyolojik özellikleri paylaşırlar. Rosamicin bakteriyostatik olup, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, enterococci, viridans streptococci gibi bakteri zincirlerini inhibe eder. Rosamicin pH 7.2 ortamında *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* karşı Ertiromicinden daha etkili olup, bazik ortamda da gram-negatiflere karşı pH 7.6 ve 8.0'de daha etkilidir [46].

#### 1.4.1.13 Avalox (Moksiloksasin)

Moksiloksasin geniş spektrumlu aktiviteye sahip yeni bir florkinolon antibakteriyel ajanıdır. Gram pozitif bakterilerden staphylococci, streptococci, enterococci bakteri zincirlerini inhibe eder [25].



#### 1.5.1.14 Amoksilin

Antibakteriyel spektrumu geniş olan penisilin türevi Amoksisilin diğer penisilinlerin etki etmediği *E.coli*, shigella, influenza gibi mikroorganizmalara karşı da etkilidir. Amoksilin, gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı bakterisidal etki gösteren geniş spektrumlu, yarı-sentetik ampisilin analogu bir antibiyotiktir. Amoksilin, bakteri hücre duvarının mukopeptid sentezini inhibe ederek bakterisid etki oluşturur. Aşağıdaki mikroorganizmalar Amoksisilin'e duyarlıdır: *Gram pozitif mikroorganizmalar:* Streptococcus faecalis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus viridans, Staphylococcus aureus (penisiline duyarlı suşlar), Clostridium türleri, Corynebacterium türleri, Bacillus anthracis, Listeria monocytogenes. *Gram negatif mikroorganizmalar:* Haemophilus influenza, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Salmonella türleri, Shigella türleri, Bordetella pertussis, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Vibrio cholerae, Pasteurella septic [18].

### 1.5.1.15 Aksef (Sefuroksim aksetil)

Sefuroksim, beta laktamaz üreten suşlar dahil, sık rastlanılan yaygın patojenlerin çoğuna karşı bakterisid etkili bir antibakteriyel ajandır. Sefuroksim bakteriyel beta laktamazlara karşı iyi bir stabilite gösterir ve sonuç olarak ampisilin ve amoksisiline dirençli suşların çoğuna etkilidir. Sefuroksim esansiyel proteinlere bağlanarak bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe eder. Sefuroksim aksetil aşağıdaki mikroorganizmalara karşı etkilidir: Gram-negatifler: Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae, Haemophilus parainfluenzae, Branhamella catarrhalis. Gram-pozitifler: Staphylococcus aureus Steptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes (Grup A beta hemolitik Streptokok). Anaeroblar: Gram pozitif ve Gram negatif koklar (peptococcus ve peptostreptococcus türleri dahil); Gram-pozitif basiller (Clostridium türleri dahil) ve Gram-negatif basiller (Bacteroides ve Fusobacterium türleri dahil) [18].

### 1.6 Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA), bütün organizmalarda bulunan  $Zn^{+2}$  iyonlu bir metaloenzimdir (karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1). İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda  $CO_2$ 'in hidrasyonunu ve  $HCO_3^-$ 'in dehidrasyonunu katalizleyen bir enzimdir [47,48].



Karbonik anhidraz enzimi, genel olarak metabolik  $CO_2$  transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokularda  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metotlarla tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA 'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre

kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır [47,49,50,51].

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 14 farklı CA izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre belirlenmişlerdir. Temel olarak birkaç tanesi sitozolik formda (CA-I, CA-II ve CA-VII), 4 tanesi membrana bağlı (CA-IV, CA-IX, CA-XII ve CA-XIV) olarak bulunmuştur. CA-VI bir salgı enzimi ve CA-V'in ise bir mitokondriyal enzim olduğu tespit edilmiştir [47,49].

### 1.6.1 Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

İnsanda yedi farklı izoenziminin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Giriş kısmında da ifade edildiği gibi, bu dokuların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yolla çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO<sub>2</sub> ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transportu gibi fizyolojik olaylarda rol almalarının yanı sıra, kemik erimesi, kireçlenme, tümör oluşumu ve diğer patolojik ve fizyolojik işlemlerde de rol aldıkları açıklanmıştır [52,53,54]. CA enziminin fizyolojik fonksiyonları, genel olarak insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkarılmıştır. HCA-I izoenzimi, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir enzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında 12 mg/g Hb olarak bulunan bir izoenzimdir. Eritrositlerde HCA-I izoenzimi yanında, HCA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub> molekülünün, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> bileşiğine akciğer pulmoner kapilerde ise HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ı ise CO<sub>2</sub>' a dönüşmesini reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almaktadır.

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, HCA-I ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır [48].

Böbrek kortekslerinde ise membrana yapışık halde olan HCA-II izoenzimi ile  $\text{Na}^+$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ ' nun geri emilimini sağlamaktadır. HCA-II izoenzimi ile ilgili olarak CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da HCA-II izoenziminin kemik dokusu, böbrek ve beyin organları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır [55].

İskelet kasında CA enzimi olarak, HCA-III izoenzimi bulunmuş ve laktik asit laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [56].

HCA-IV ve HCA-VI ise, iki sinyal sekuens izoenzimleri olup, sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar [57].

HCA-V izoenzimi de, bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoilfosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlamasından dolayı, glukoneogenez ve ürogenizde rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca, lipogenez olayında da etkili olduğu bildirilmiştir [58].

Tükrük bezinde CA enzimi olarak, HCA-VI ve HCA-VII izoenzimi vardır. HCA-VI izoenzimi, tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığına inanılmaktadır. HCA-VII izoenzimi ise, tükrükte bikarbonat salgılanması için katkıda bulunmaktadır [59].

### **1.6.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar**

Karbonik anhidraz  $\text{CO}_2$  molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sulfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında (1), aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil

pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [60,61].

Çizelge 1.3 Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

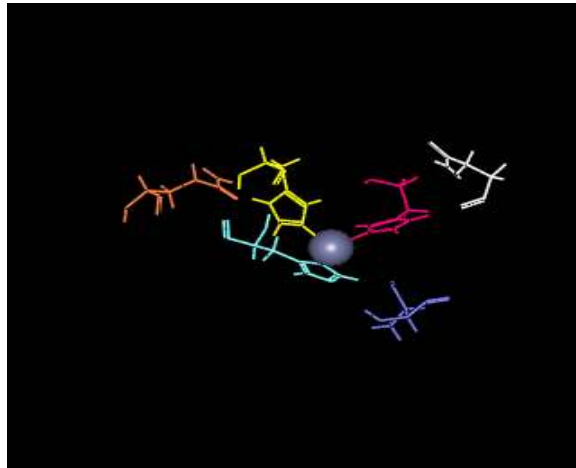
(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$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

### 1.6.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları

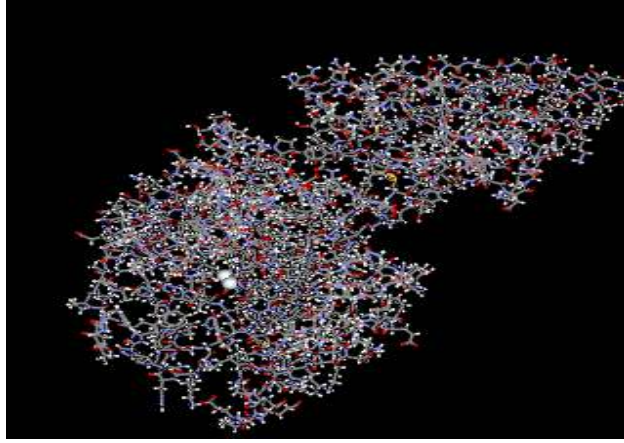
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin 3 boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. Özellikle, Şekil 1.4 ve Şekil 1.5'te gösterildiği üzere, BCA ve HCA-II izoenzimlerinin 3 boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına rağmen, aktif bölgelerdeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş  $Zn^{+2}$  iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden yoksundurlar [51,62,63,64].

İnsan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin amino asit dizilişlerinin tespiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına ait CA-I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA-II izoenzimlerinin amino asit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA-III izoenziminin amino asit dizilişi ise, insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir [65-71].

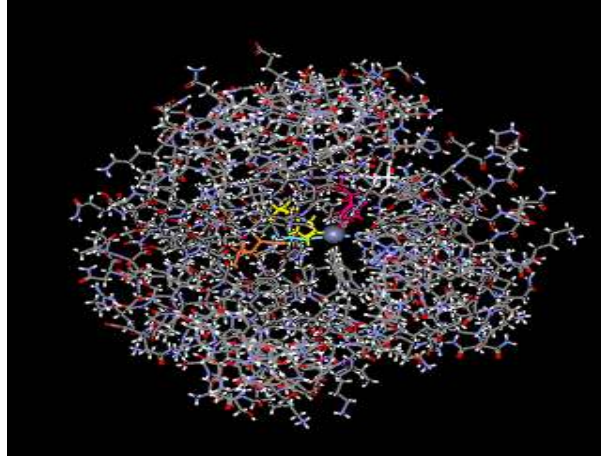
Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri çok farklıdır. CA-II izoenzimi CA-I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi (turnover sayısı) en yüksek olanıdır. CA-III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5'i kadardır [72,73]. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları, 28.000 dalton, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hegzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise 180.000 dalton olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, insan böbreğinde hücre zarına bağlı 66.000 dalton molekül ağırlığında ve yine tavşan eritrositlerinde 54.000 dalton molekül ağırlığında, karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır [67,68,74].



Şekil 1.3 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin katalitik bölgeleri His 94, sarı; His 96, pembe; His 119, turkuaz; Gln 92, kahverengi; Asn, 244 beyaz)



Şekil 1.4 BCA izoenziminin üç boyutlu yapısı



Şekil 1.5 HCA-II izoenziminin üç boyutlu yapısı

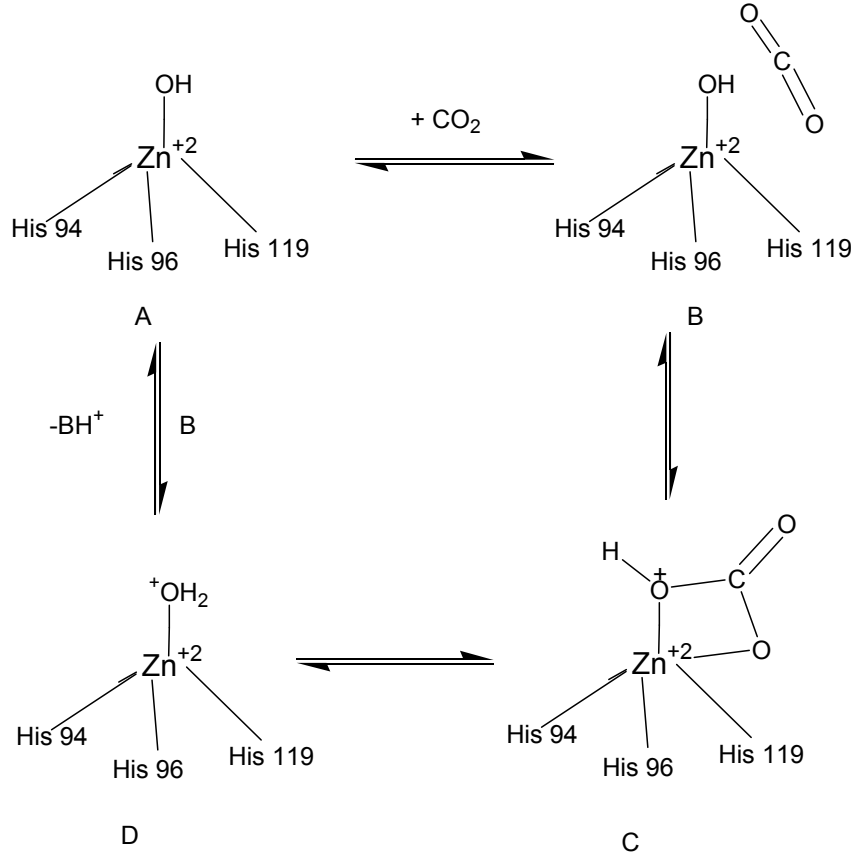
#### 1.6.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu, CA enziminin katalitik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Bölgede  $Zn^{+2}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir.



CA enziminin reaksiyonları katalizinde, Zn (II) iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  iyonu ve üç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119 ) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki  $15 \text{ \AA}^0$  derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir.

Çinko bağlı  $\text{H}_2\text{O}$ , Glu-106 nın karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr-199 un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki  $\text{CO}_2$ 'e doğru hareket etmektedir [47]. Zn (II) iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif bir formu oluşur (Şekil 1.4-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla  $\text{CO}_2$  molekülüne saldırır (Şekil 1.4-B). Bu da, Zn (II) iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.4-C). Daha sonra,  $\text{HCO}_3^-$  iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunu sonucunda,  $\text{Zn}^{+2}$  iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.4-D'de görüldüğü gibi, enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar [75].



Şekil 1.6 Karbonik anhidraz enziminin  $\text{CO}_2$ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi

### 1.6.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler R-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> kimyasal yapısına sahiptir. Burada R, genellikle aromatik ve heteroaromatik halka sistemidir. K<sub>i</sub> sabitleri (CA-II için) 10<sup>-5</sup> ile 10<sup>-10</sup> arasında değişmektedir. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi:

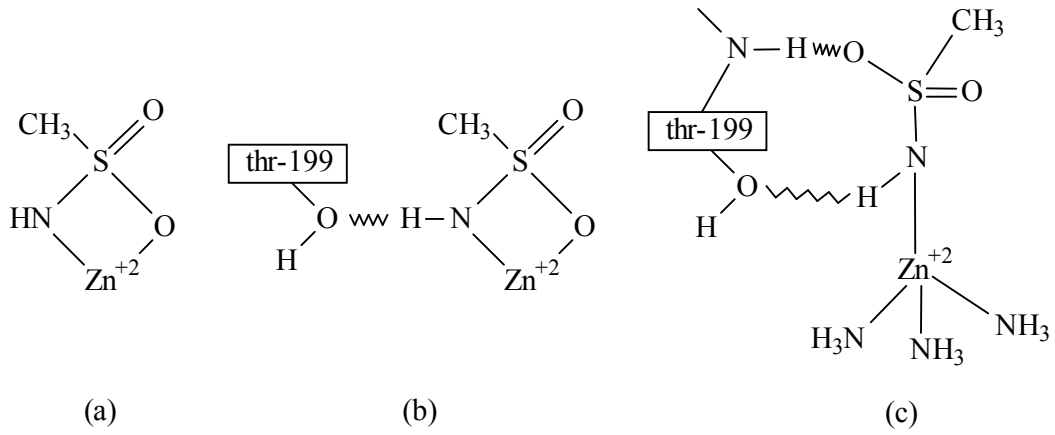


denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO<sub>2</sub>NH<sup>-</sup> bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn<sup>+2</sup> ile iyonik bir bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur [76,77].

Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Nitekim, süstitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grubu taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise yalnızca hidrofilik bağlanma sonucu, CA için sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevi üstlenemezler [78].

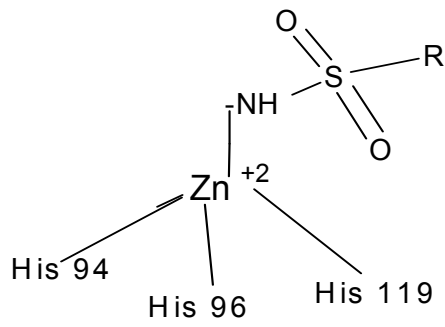
Sülfonamidlerin CA enzimine bağlanması konusundaki teorik bir çalışmada, ilk olarak Zn<sup>+2</sup> tek başına düşünüldüğü zaman, metal iyonuna azot ve oksijen atomlarından koordine olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.5a). İkinci olarak, bu bağlanmaya aktif bölgede bulunan tirozin (Thr-199)'de düşünüldüğünde sülfonamid molekülündeki -NH grubu ile Thr-199 arasında bir hidrojen bağı oluşarak daha kararlı bir yapı meydana gelmektedir (Şekil 1.5b). Son olarak, CA enziminin aktif bölgesindeki bağlanmada rol alan Thr-199'un yanında, üç histidin grubu da

düşünülerek yapılan çalışmalarda, Zn-OH bağı kararsız hale geçerek, tetra koordinasyon metal kompleksi oluşur. Bunun sonucu olarak sülfonamid oksijeni, Thr-199'un NH grubu ile bir hidrojen bağı yaparak, en kararlı konformasyonu meydana getirmektedir (Şekil 1.5c). Bu teorik hesaplamalar, enzim-inhibitör kompleksinin (HCA-II-asetazolamid) X-ray yapı analizi ile uyum halindedir. Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını ortaya koymak için, Richelds ve arkadaşları, yapı aktivite ilişkileri ve enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjilerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı şekilde van-der Vals etkileşmelerinden dolayı  $K_i$  değerlerinde önemli fark olduğunu göstermiştir [79].



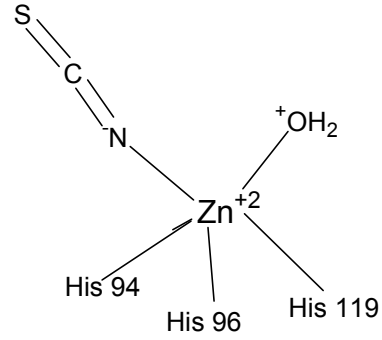
Şekil 1.7 Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması

Zn (II) iyonuna koordine olmuş sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn (II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 1.6.A ). Anyonlar ise Şekil 1.6.B'de görüldüğü gibi, hem metal iyonun tetrahedral geometrisinde, hem de tiyosiyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipiramidal yapıda bağlanabilirler [80].



Tetrahedral Yapı  
(sülfonamid)

A



Trigonal-bipramidal Yapı  
(tiyosiyanat)

B

Şekil 1.8 Anyonik inhibitörler ve sülfonamidler tarafından CA enziminin inhibisyonu mekanizması

Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, glaucoma 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 glaucoma 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 [47].

### **1.6.6 Karbonik anhidraz IX ve XII İzoenzimleri (CA-IX ve CA-XII)**

Kanser, hücre değişiminin ve çoğalmasının kontrolden çıkması ile gelişen bir hastalıktır. Çoğu kanser hücre tipleri, kitlelere neden olur ve buna tümör ismi verilir.

CA-IX ve CA-XII izoenzimleri tümörlü hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserle ilişkili olan izoenzimler olarak tespit edilmişlerdir [81,82].

#### **1.6.6.1 CA-IX**

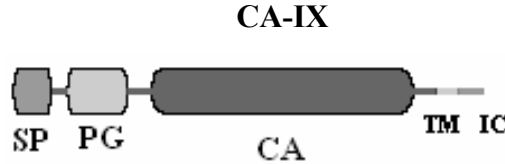
CA-IX membran bağlı izoenzimi normal hücrelerde aktivite göstermeyip tümüyle kanserli hücrelerde ekspre olan tümör ilişkili karbonik anhidraz izoenzimidir. Bu özelliği ile potansiyel bir kanser biomarkerı olarak önem taşır.

Klasik karbonik anhidraz enzim aktivitesinin yanı sıra, hücre adezyon işleminin modülasyonu ve hypoxik çevredeki tümörün ilerleyip hücredeki artışının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [83].

CA-IX membrana bağlı ve hücre yüzeyinde olan katı tümörlerde görüldüğü için özellikle böbrekle ilgili hücre karsinomlarında (RCC), servik, over, kolon, baş, boyun karsinomlarında ekspre olmaktadır. Hücre yüzeyinde aktivite göstermesi CO<sub>2</sub>'in hidratasyon ve dehidratasyonu sonucunda klorür-anyon değiştiricisi olarak hücre membranında yer alması CA-IX'un HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonlarının tekrar sitoplazmaya taşınmasında önemli bir rol üstlenmektedir. Bu membran bağlı tümör ilişkili izoenzimin ekstrasellüler asiditeyi kontrol ettiği ve böylelikle katepsin B ve matriks metaloproteaz B (MMP-9) gibi hücre yüzey proteazlarının aktivasyonuna etkimesi bu enzimin sadece hypoxia için ayrıca kanser terapisi için de önemli olduğunu göstermektedir [84].

Sonuç olarak, enzimatik aktivitesinin dışında CA katalitik bölgesi ve protoglikan bölgesi (PG) ile birlikte CA-IX hücre-hücre etkileşmelerinin düzenlenmesinde görev alır,ancak sahip olduğu sitoplazmik kuyrukların sinyal

uyumunda bir etkisi bilinmemesine rağmen bu konuda çalışmalar yapılmakta ve hücre yüzeyinde buluna kanser ilişkili karbonik anhidrazların inhibisyonu ile elde edilecek terapötik yararın ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır [85]. CA-IX, yapı olarak bir sinyal peptid, protoglikan bölge, CA aktif bölgesi, transmembran bölgeleri ve hücre içi intrastoplazmik kuyruklara sahiptir.



(**SP**: sinyal peptid bölgesi , **PG**: protoglikan bölge, **CA** : karbonik anhidraz aktif bölgesi  
**TM**: trans membran bölge, **IC**: intrastoplazmik kuyruklar,)

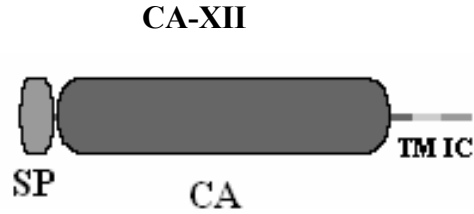
- İlk olarak, tümör bağlı transmembran proteini olan CA-IX izoenzimi keşfedilmiştir. Bu izoenzimin aktivitesi ile interselüler iletişim ve asit-baz dengesini sağlama fonksiyonu gözlenmiştir [86].
- CA-IX, 54 ve 58 kDa ağırlığında bir glikoprotein olup epitel hücrelerin basolateral plazma membranında ve bazı durumlarda çekirdekte de ekspre edildiği gözlenmektedir, ayrıca bu enzimin geni kromozom 17 de haritalanmaktadır [87].

#### 1.6.6.2 CA-XII

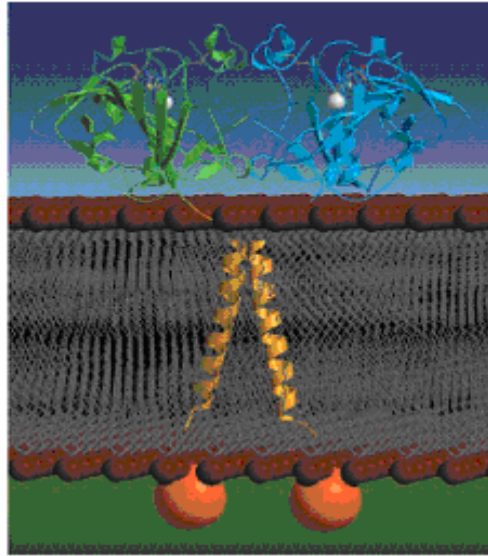
CA-IX izoenzimden sonra ikinci olarak tümör ilişkili izoenzim olan CA-XII böbrek kanser hücrelerinde % 10 olarak ekspre edildiği Sly ve ark. Tarafından kanıtlanmıştır [88]. Ivanov ve grubu tarafından klonlanan bu izoenzim Sly ve grubu ile birlikte yeni von-Hippel-Lindau (VHL) hedefi olarak belirlenmiş ve ekspresyonun VHL'nin doğal tipi tarafından RCC'de güçlüce inhibe edildiği ve ayrıca diğer tümör ilişkili CA-IX gibi aynı regülasyona sahip olduğu tespit edilmiştir [89]. CA-IX gibi hypoxia ile regüle edilme benzerliği olmasına karşın etkin oldukları biyokimyasal yolların farklı olduğu anlaşılmaktadır [90].

İlk çalışmalarda CA-XII mRNA'sı düşük seviyelerde normal erişkin böbrek, pankreas, kolon, prostat, over, testis, akciğer ve beyinde tespit edilmiştir. Sıvı

konsantrasyonu ve iyon transportunda fizyolojik bir role sahiptir. Yapılan son çalışmalarda CA-XII yüksek bir seviyede glokom hastalarında göze çarpmaktadır [91]. Bundan dolayı, bu izoenzimin glokom tedavisinde HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri gibi önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir. Sly ve grubu CA-XII izoenziminin karakterizasyonu sonucunda sitozolik HCA-I ve HCA-IV izoenzimleriyle aynı katalitik aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir [92]. CA-IX ve sitozolik HCA-II izoenzimlerine göre düşük bir aktiviteye sahiptir ancak gene de kanser tedavisinde önemli bir tümör marker olarak kullanılabilceği yapılan çalışmalarda gösterilmektedir.



(**SP**: sinyal peptid bölgesi ,**TM**: trans membran bölge,  
**IC**: intrastoplazmik kuyruklar, **CA** : karbonik anhidraz aktif bölgesi )



Şekil 1.9 CA-XII izoenziminin yapısı, yeşil ve mavi sarmallar CA katalitik bölgesini,içerisindeki beyaz topla Zn metalini, sarı heliks C-terminal uçları,turuncu toplar intesellüler membran uçları göstermektedir.

- Diğer aktif bir transmembran, bazı insan renal kanser hücrelerinde ekspres edilen CA-XII'dir. Bu izoenzim aynı zamanda akciğer kanserinde de ekspres edilmektedir [93].
- CA-XII karakterize edildiğinde yapı olarak CA-IX'a benzerlikleri gözlenmiştir. Ancak yapıda farklı olarak protoglikan bölge bulunmamaktadır.
- CA-XII, cDNA sekansının 39,448 kDa ağırlığında 354 aminoasit polipeptidi ihtiva ettiği tahmin edilmektedir. Enzimin geni kromozom 15 de haritalanmaktadır [94].

Prof. Supuran ve grubunun 1999 yılı başlarında CA-IX izoenziminin, lipofilik kuyruklara sahip aromatik ve heterosiklik sülfonamidlerle inhibisyonu ile ilgili çalışmaları bulunmaktadır [95]. Ancak şu ana kadar bu CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin farklı sülfonamidlerle inhibisyonu hakkında veriler sınırlı olmasına rağmen bu izoenzimlerin inhibisyonun klinik olarak yeni antikanser terapilerin düzenlenmesi için önemli olacağı düşünülmektedir.

### **1.6.7 Hipoksi (Hypoxia )**

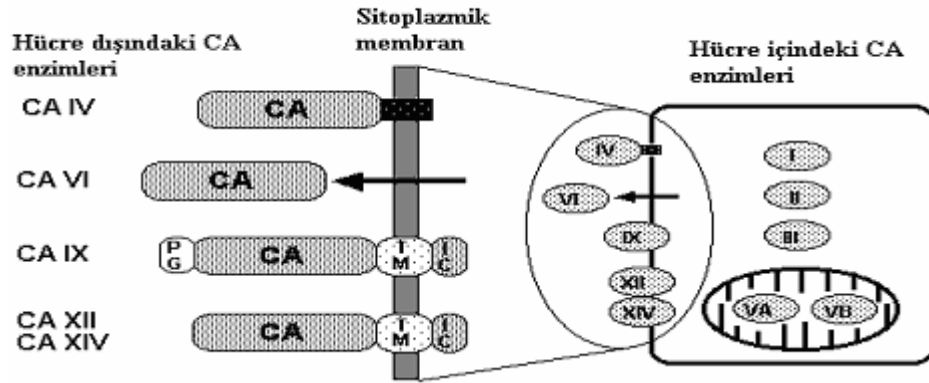
CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin, hastalık ilerlemesi ve tedavi sonucunu büyük ölçüde etkileyen klinik olarak tümör biyolojisinde önemli bir faktör olan HİPOKSİ ile indüklenmesi ayrıca önem taşımaktadır [96].

Asidik ekstrasellüler pH (Phe) tümör mikroçevresinde tipik bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. pHe angiogenik faktörler ve proteazların düzenlenesinde, bozulan immün sistemlerinde önemli etkilere sahiptir [97]. Hipoksi, tümör saldırısını kolaylaştıran hücre dışı ortamın asidifikasyonu ile bağlantılıdır [98]. Tümör çevresinde asidifikasyon genellikle glikolizde aşırı üretilen laktik asit birikimi ortaya çıkmaktadır. Yüksek glikoliz hızı, özellikle enerji üretiminden anaerobik metabolizmaya bağlı olan hiposik hücreler için önemlidir. Böylelikle yapılan çalışmalarda laktik asidin üretilmesi sonucu tümör asidifikasyonuna glikoliz-eksik hücrelerinin etkinliğinin yanısıra in vivo asidik tümörlerinde katkısı ortaya

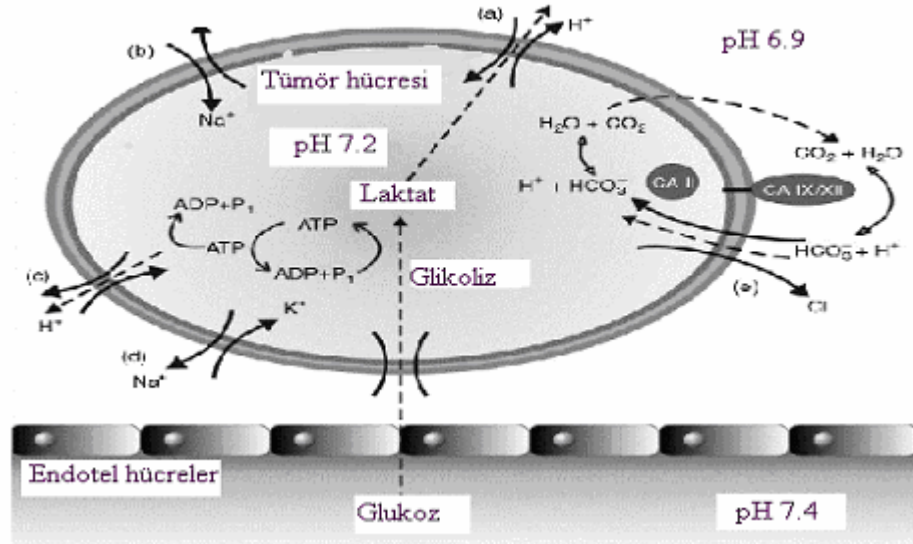


konmuştur [99]. Bu kanıtlarda CO<sub>2</sub>'in dehidratasyon ve hidratasyonu katalizleyen karbonik anhidrazın etkisi son derece önemlidir.

Sonuç olarak, CA-IX integral bir plazma proteini olup CA ailesi içinde en yüksek proton transfer hızı, tümör pH'sının kontrol etme yeteneği ve yüksek katalitik aktivitesine sahip olması tümör mikroçevresinde en iyi rolü üstlenecek izoenzim olarak aday olmasını mümkün kılar [100].



Şekil 1.10 CA İzoenzimlerinin Hücredeki Yerleşimleri



Şekil 1.11 CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin tümörlerde ki pH regülasyonu ve iyon transportuna etkisi

## 1.7 Karbonik Anhidraz Enzim Aktivite Tayin Metodları

### 1.7.1 CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz aktivitesi, enzimin CO<sub>2</sub>'i hidratasyonu, HCO<sub>3</sub>'ı dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi özelliklerinden yararlanılarak belirlenmektedir [47].

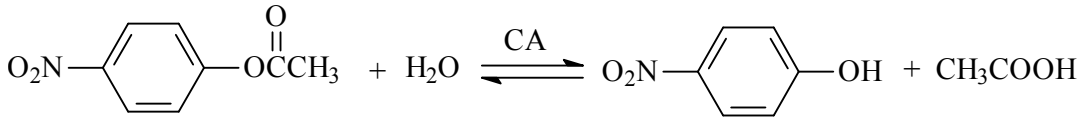


Reaksiyonunda görüldüğü gibi, ortama göre (1) CO<sub>2</sub> gazı açığa çıkmakta veya haracanmakta, (2) H<sup>+</sup> konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. (1) olayı kantitatif olarak monometrik yollarla tespit edilebilir. Fakat manometrik metodun, reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub> molekülünün suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır.

(2) olayından yararlanılarak, belirli bir pH düşmesi veya yükselmesi için geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO<sub>2</sub> molekülünün suda sınırlı çözülmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır [101-105]. Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit bir pH'da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metodlarla enzimin Km ve Vmax gibi parametrelerinin bulunmasında kullanılmaktadır. Fakat enzimin saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından, Wilbur-Anderson metoduyla yapılmaktadır. Bu yöntemde, CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO<sub>2</sub> hidratasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süreleri (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın (t<sub>c</sub>)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Yani, E.U = [(t<sub>0</sub>) - (t<sub>c</sub>)] / (t<sub>c</sub>) olur. [105].

### 1.7.2 Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda, CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapılmaktadır. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır [106]. Prensipte olarak, karbonik anhidraz substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitro fenol ve p-nitro fenolata hidroliz etmekte ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon vermektedir. Reaksiyon denklemi şöyledir;



Ölçümü yapılan 348 nm'deki dalga boyu, p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun izosbestlik olduğu, yani her ikisinin de aynı absorpsiyon verdiğini göstermektedir. Fenol grupları asidik oldukları için ortamın pH'sına göre, değişen oranda, fenolat ve H<sup>+</sup> iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitro fenol ve p-nitro fenolat iyonunun absorpsiyonları aynı anda okunabildiği için bu durum absorpsiyon ölçümünü etkilemez. p-nitro fenol bileşiğinin molar ekstiriksiyon katsayısı,  $\epsilon_{348} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  'dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve  $\epsilon_{348} = 0.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$  molar ekstiriksiyon katsayısına sahiptir.

### 1.9 Afinitive Kromatografisi

Afinitive kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, bir biyolojik ligand (örneğin; substrat, koenzim, hormon, antikor, nükleik asit v.b.) ya da onun sentetik bir analogu ile protein molekülü üzerindeki komplementer bağlanma bölgesi arasındaki spesifik etkileşimi esas alan, güçlü bir protein saflaştırma tekniğidir [107,108].

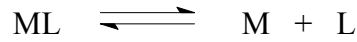
Bu sayede, çok yorucu, zor ve bazı hallerde imkansız olan birçok ayırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilmekte ve yüksek bir verimde binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir [109].

Afinitive kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nişastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır. Fakat, kovalent olarak

ligandların bağlanabileceği dayanıklı matrikslerin bulunmayışından, bu tekniğin yaygın halde uygulanması 1967 den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte, primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyano bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş polisakkarit matriks üzerine kovalent bağlanabileceği gösterilmiştir [109].

Ayrıca literatürde, afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, oksiran aktifleştirilmesi, karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirilme yöntemleri de kullanılmıştır [109]. Bu keşiften sonra afinite kromatografisinden yararlanarak, biyospesifik ligandlarla antikolar, bazı taşıyıcı proteinler, enzimler, nükleik asitler ve hatta bir takım hücrelerde çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır.

Afinite Kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisinin özel bir çeşididir. Bu teknikte matriks denilen katı destek materyaline ligand adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bu spesifik molekül, saflaştırılmak istenen materyale karşı biyolojik ilgi duyarak onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamalıdır.



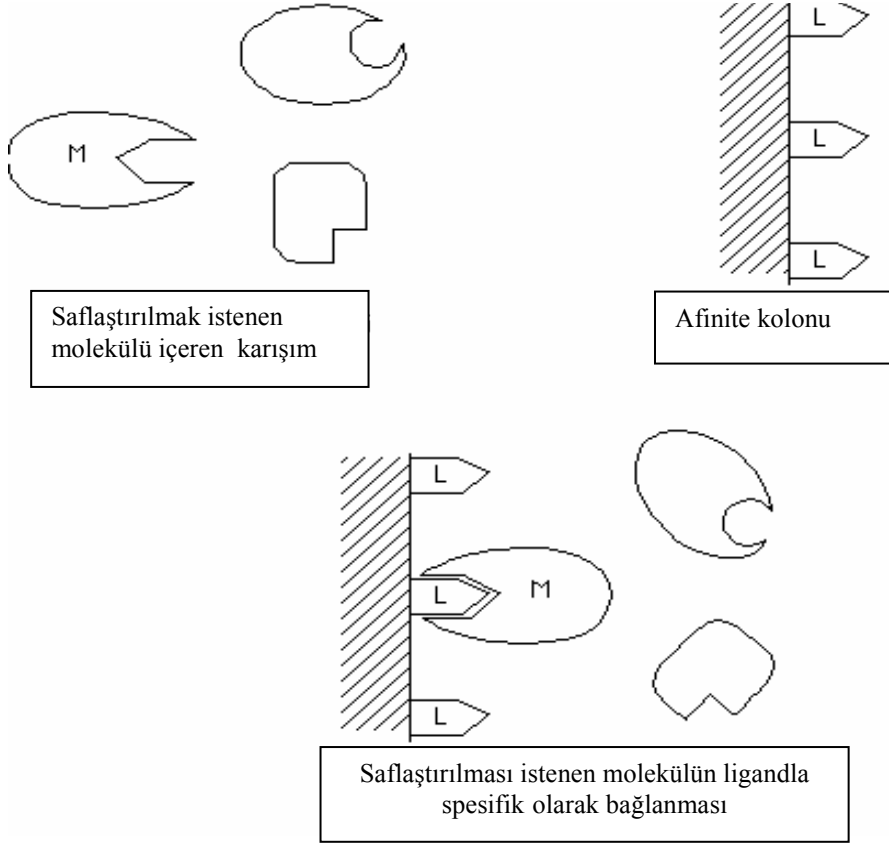
M= Makromolekül

L=Ligand

$$K = \frac{[M][L]}{[ML]} = 10^{-4} - 10^{-8} \text{ M arasında olmalıdır.}$$

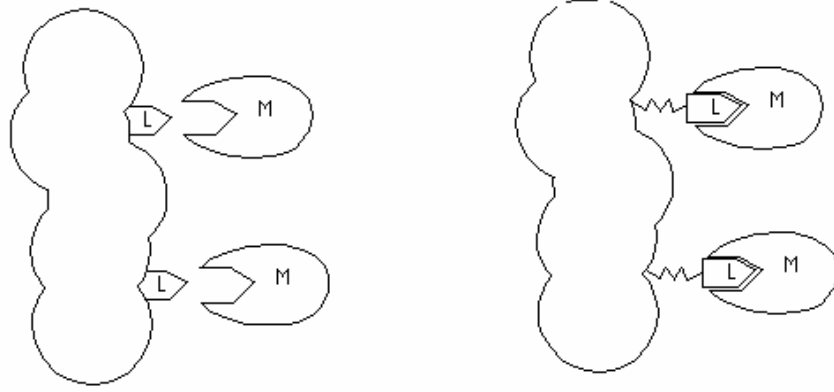
Ligandın, uygun yöntemlerle suda çözülmeyen Sephadex ve Sepharose gibi katı destek materyaline (matriks) bağlanarak hazırlanması sonucu oluşturulan bir afinite kolonundan, saflaştırılması düşünülen bir molekül karışımı geçirilirse sadece istenilen molekül ligant tarafından kolonda tutulur. İstenmeyen bütün safsızlıklar, kolondan uygun bir tampon geçirilerek uzaklaştırılır. Kolonda tutunan ilgili molekül, spesifik elüsyonla kolondan alınır. Spesifik elüsyon, ilgili moleküle liganttan daha yüksek afiniteye sahip madde içeren tampon çözelti ile gerçekleştirilir. Bu metotla, tek basamakta yüzlerce kat saflaştırma yapılır [110].

Bir afinite kromatografisi kolonunun hazırlanış ve çalışması şematik olarak Şekil 1.12' de gösterilmiştir.



Şekil 1.12 Afinite kromatografisinin şematik gösterimi

Saflaştırılması istenen molekülün kolonda liganda bağlanması, çoğu durumda matriks ile ilgili molekül arasındaki sterik engelden dolayı zorlaşmakta ve kolon verimi düşmektedir. Bu problem, uygun uzantı kolu kullanılarak ortadan kaldırılabılır ( Şekil 1.13).



Şekil 1.13 Afinite kromatografisinde uzantı kolunun şematik gösterimi (L: Ligand; M: molekül)

Buna göre bir afinite kromatografi işlemi; uygun bir ligandın seçimi, taşıyıcı matris üzerine ligand immobilizasyonu, protein karışımının matris ile temas ettirilmesi, istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması ve ilgilenilen proteinin saf olarak elüsyonu olmak üzere alt basamakları içerir.

Sonuç olarak, proteinlerin aktive edilmiş matritelere bağlanmasındaki koşullar proteinin denatürasyonuna ya da inaktivasyonuna neden olmamalıdır. Genelde bağlanma protein molekülünün dış yüzeyindeki lizin rezidüleri, ya da başka bir amin grubu ile olur. Bu grup nükleofilik yani protonlanmamış halde bulunacağı yüksek bir değerde olmalı fakat inaktivasyona neden olacak kadar da yüksek olmamalıdır. Tüm bu özellikler göz önüne alınırsa, bir afinite kolunun verimli olabilmesi için matrisin iyi akış özelliklerine sahip, ligandı bağlama ve elüsyon işlemlerine dayanıklı ve akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda olması, ligandın ise adsorbe edeceği bileşikle  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M arasında değişen bir afinitesi olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolunun kapasitesi artar ve istenilen protein yüksek derecede saflaştırılmış olarak elde edilir [109].

### 1.9.1 Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için, en çok uygulanan metot, afinite kromatografisidir. Bu metotla, hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek bir verimle binlerce kez saflaştırılmış şekilde elde edilmektedir [111].

CA enziminin afinite kromatografisi, ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tekniğe yönelik çalışmalar, 1974 yılında Whitney, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşları aynı yıl Osborne ve Tashian, 1976 yılında Champagnol ve aynı yılı takiben Johansen, 1977 yılında Khalifah ve arkadaşları, 1980 yıllarında Wistrand ve aynı yılda Keha'nın araştırmalarını takiben 1987 yılında Kaul ve Mattiasson 1995 yılında Arslan ve arkadaşları, 2000 yılında ise Demir ve arkadaşlarının araştırmalarıyla devam etmiştir [112-117]. Champagnol dışında diğer araştırmacılar ligand olarak, benzen sülfonamid türevleri, Champagnol ise bir heteroaromatik sülfonamid bileşiği olan asetazolamidi kullanmıştır [109,116]. Ozensoy ve ark. 2004 yılında Eupergit C-250 L polimer materyalinin aktif oksiran gruplarına, karbonik anhidrazın güçlü inhibitörü olan *p*-aminobenzensülfonamid direkt olarak bağlanmıştır [117]. Literatürde, Eupergit C-250 L polimer bileşiği kullanılarak, afinite kromatografisi üzerine yapılan çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır [118-121].

## 2. MATERYAL ve YÖNTEMLER

### 2.1 MATERYALLER

CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin; klonlama, expressiyonu ve saflaştırılması için, ekspresyon sonrası saflaştırılması Affinity<sup>R</sup> Protein Expression and Purification System and Affinity<sup>R</sup> Protein Expression vektörleri Stratagene (Milano/İtalya)'dan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan saf HCA-I ve HCA-II izoenzimleri ticari olarak Sigma Co.ltd/Milano'dan temin edilmiştir. Daha sonraki saflaştırma için Sepharoz-4B-L-tirozin-sulfonilamid afinite jeli BUTAM Biyoloji laboratuvarında sentezlenmiştir.

Çalışmalarımızda kullanılan, standart serum albumin, N, N, N', N'- tetra metil etilendiamin (TEMED), akrilamid, Coomassie brilliant blue G-250, Coomassie brilliant blue R-250, fenol-red, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, SDS, β-merkapt etanol, glisin Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum karbonat, trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, amonyum sülfat, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, sodyum nitrat, sodyum tiyosiyanat, sodyum siyanür, p-nitrofenilasetat, HEPES, sodyum sülfat Merck A.G'den; sodyum mono hidrojen fosfat, sodyum di hidrojen fosfat, metanol, etanol, amonyum per sülfat, potasyum iyodür, dekstroz Riel de Haen A.G'den, karbondioksit gazı piyasadan temin edilmiştir. Diğer kullanılan tüm malzemeler analitik saflıkta kullanılmış ve Sigma Co. Ltd. tarafından Almanyadan temin edilmiştir.

pCAL-n-FLAG vektörü için spesifik primerler, Strategene (Milan/Italy)'den temin edilmiştir.



### 2.1.1 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmalar esnasında, aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

UV-Spektrometresi	: CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN
Masa Santrifüjü	: Hettich zentrifugen EBA 12 R
Soğutmalı santrifüj	: Sigma Laborzentrifugen 3K 15 / 10706 / 10707
pH-metre	: Orion- model 920A
Elektroforez tankı	: Hoefer, HSI
Peristaltik pompa	: Pharmacia Fine Chemicals (Chromatograph Attd.S1211)
Hassas terazi	: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Kromatografi kolonu	: Pharmacia Fine Chemicals
Kronometre	: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Medisis, Gilson
Magnetik karıştırıcı	: ARE magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Çalkalayıcı	: Biolab 1575-2B shaker
Otoklav	: Hirayama (Hiclave HV-85)
Buz makinesi	: Fiocchetti Scotsman Automatic ice machine AF 10
Vorteks	: Fisons Whirli Mixer
Etüv	: Elektromag
Sabit sıcaklık sirkülatörü	: Techne-Tempette Junior TE-8J
Stop-Flow Kinetic Instrument	SX.18MV-R Applied Photophysics

### 2.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

#### CA-CO<sub>2</sub> Hidrataz Enzim Aktivitesi için Kullanılan Tamponlar

- *0.1M NaHCO<sub>3</sub> tamponu (pH 10.0)*; 8,401g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH'sı 10,0'a getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.
- *Stop-Flow ve Maren metodu için CO<sub>2</sub> çözeltisi*; 20°C'de bidestile su içinden CO<sub>2</sub> geçirilerek hazırlanır.

- *Stop-Flow Tampon çözeltisi*; 0.01 M HEPES 4-(hidroksil etil)-1-Piperazin-etansulfonik asit 0.01 M Tris[hidroksimetil]aminometan hidroklorür (TRIZMA HIDROKLORÜR) , 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 7.5.
- *Stop-Flow Fenol-red çözeltisi*; 0.2 mM fenol red alınarak (pH 6.8-8.4) HEPES tamponu içerisine katılır.
- *Stop-Flow Stok CA enzim çözeltileri*; Ticari CA I için 0.09 µM; CA II için 0.06 µM; Saflaştırılmış CAIX ve CA XII için 4 x10<sup>-6</sup> M olarak kullanılmıştır.
- *Stop-Flow Stok inhibitör çözeltileri*; Stok inhibitör çözeltiler 1 M olarak hazırlandıktan sonra, antibiyotik ve kemoterapi ilaçlarının dozajları insan vücudun alımına esasına bağlı olarak, 0.1; 0.01; 0.001 ve 1 M olarak hazırlanarak kullanılmıştır.

#### Sepharoz 4B-L-tirozin-sulfonamid Afinite Jel Tamponları

- *Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon çözelti*; 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8.7: 3.0275 g (25 mmol ) Tris ve 14.2 g (0.1 mol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH 8.7 yapılarak, son hacim 1 litreye tamamlandı.
- *Hemolizat tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti*; 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (pH= 8.7) 3.0275 g (25 mmol ) Tris ve 3.124 g (22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH 8.7'e getirildi ve daha sonra son hacim 1 litreye tamamlandı.
- *Afinite jeline adsorbe olan CA izoenzimlerinin elüsyonu için kullanılan çözelti*; 0.1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0.5 M NaClO<sub>4</sub>, pH=5.6, 9.187 g (0.075 mol) NaClO<sub>4</sub> ve 2.04 g (0.15 mol) NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O, 120 mL destile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5.6'ya kadar titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

#### Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti

- 100 mg Coomassie brillant blue G-250, 50 mL etanol de çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 1L'ye tamamlandı

- Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi ( 1 mg/mL) 25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözüldü.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan Tamponlar

- *Numune Tamponu;*

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL
% 10'luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
$\beta$ -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromfenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

- *Tank Tamponu;*

Tris-HCl	3 g
Glisin	14,4 g
SDS-	1,0 g

- *SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı;* SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1'de verilmektedir.

Çizelge 2.1 SDS-elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığma Jeli
	% 10	% 3
<u>Akril amid/Bis (% 30)</u>		
Akril amid 15 g		
Bis 0.4 g	16.65 mL	2.6 mL

Son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.		
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<u>1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)</u> Tris-HCl 11.82 g pH:8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	12.5 mL	–
<u>0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)</u> Tris-HCl 3.94 g pH:6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.	–	5 mL
<u>% 10'luk SDS</u> SDS 1 g Son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<u>% 10'luk amonyum persulfat</u> Amonyum persulfat 1 g Son hacim destile su ile 10 mL olur	750 µL	400 µL

#### SDS-PAGE protein Jeli Boyama Yöntemleri

- *SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan boyama çözeltisi ; 0.66 g Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözüldü Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.*
- *SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24*

mL saf asetik asit ve 120 mL distile su ilave edildi.

➤ *SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi*; Hacimce % 7,5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87,5 mL distile su içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

➤ *AgBr boyama ile SDS PAGE jelinin boyanması için kullanılan tamponlar*; SERVA Silver Staining Kit for SDS PAGE (Cat. No. 35076.01) gümüş boyama kiti kullanılmıştır [122]. Çizelge 2.2’de boyama kiti reaktif kullanım miktarları verilmiştir.

Çizelge 2.2 SERVA gümüş boyama kiti inkübasyon zamanları

Basamak		Çözelti	İnkübasyon zamanı
1.	Tutunma	Tutunma çözeltisi 100 ml	≥ 20 dak.
2.	yıkama	30 % (v/v) Etanol	2 x 10 dak.
3.	İlk Uygulama	Sodyumtiosulfat . pentahidrat reaktifinden 30 mg alınarak 100 ml H <sub>2</sub> O dest.suda çözünür	1 dak.
4.	Yıkama	H <sub>2</sub> O dest.	3 x 10 sn. (durdur ve izle)
5.	Boyama	10 mL gümüş nitrat çözeltisinden alınarak 100mL H <sub>2</sub> O dest. su ile tamamlanır	15 dak.
6.	Yıkama	H <sub>2</sub> O dest.	2 x 10 sn. (durdur ve izle)
7.	Geliştirme	Sitrik asit çözeltisinden 20 mL alınarak 100 ml H <sub>2</sub> O dest.+ 50 µl Formaldehyde 37% ile çözelti hazırlanır	1-5 dak.

8.	Yıkama	H <sub>2</sub> O dest.	1 x 10 sn.
9.	Sonlanma	Sitrik asit çözeltisinden 20 ml alınır 100 ml H <sub>2</sub> O dest. su ile tamamlanır.	5 dak.
10.	Uzun süre saklama için	2 % (w/v) Gliserin	10 dak.

#### Kalmodulin Afinite jeli tamponları

- *CaCl<sub>2</sub> bağlama tamponu*; 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM β-merkaptotanol, 1.0 mM magnezyum asetat, 1.0 mM imidazol, 2 mM CaCl<sub>2</sub> 250 mL olarak hazırlanır.
- *Elüsyon tamponu*; 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM β-merkaptotanol, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl 250 mL olarak hazırlanır.
- *Enterokinaz kesme tamponu*; 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 % Tween-20 250 mL olarak hazırlanır.
- *Rejenerasyon tamponları*; Kalmodulin afinite jeli, 3 kez 2 mM EGTA içerikli 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.6) yıkama tamponu ile yıkanır. Daha sonra 3 kez 2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 1 M NaCl ile yıkanır. Bu yıkamadan sonra kolon jeli 3 defa 2 mM CaCl<sub>2</sub> içerikli 0.1 M asetat (pH 4.4) tamponu ile yıkanır. En son olarak da 1 kez 1–2 mM CaCl<sub>2</sub> içerikli bağlama tamponu ile dengelenerek CaM afinite jeli 4°C’de 20% (v/v) etanol içerisinde saklanır.

#### Hücre kültür Tamponları

- *LB Broth pH 7.0 (1 Litre)*; 10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, Tüm bu maddeler karıştırılarak hazırlanan tampon otoklavlandı.
- *LB Agar pH 7.0 (1 Litre)*; 10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 20 g agar. Hazırlanan LB Agar otoklavlandıktan sonra petri kaplarına (~25 ml/100-mm plaka) döküldü.
- *LB–Ampisilin Broth (1 Litre)*; 1 litre otoklavlanmış LB broth tamponu 55°C’ye soğutulurken, içine 10 ml 10-mg/ml filtre-sterilize edilmiş ampisilin

eklenmiştir.

- *LB–Ampisilin Agar (1 Litre)*; 1 litre LB agar otoklavlandıktan sonra 55°C soğutulduktan sonra, içine 10 ml 10-mg/ml filtre-sterilize edilmiş ampisilin eklenerek elde edilen karışım ~25 ml/100-mm plakalı petri kaplara döküldü.
- *SOB Medium*;; 20.0 g tripton, 5.0 g maya ekstraktı, 0.5 g NaCl. Hazırlanan SOB medyum otoklavlandıktan sonra hemen içine 10 mL 1 M MgCl<sub>2</sub> ve 10 mL 1 M MgSO<sub>4</sub> eklendikten sonra sterilizasyon için filtreden geçirilir ve 100 mL tampon hazırlanır.
- *SOC Medium*; SOB medyum içine 1 ml 2 M filtre edilmiş sterilize glukoz çözeltisi ya da 2 ml 20% (w/v) glukoz eklenerek tekrar sterilizasyon için filtre edilerek 100 mL tampon hazırlanmış olur.
- *TE Tamponu*; 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA 1L olarak hazırlanır.

#### GST-Sepharose Afinite jeli Tamponları

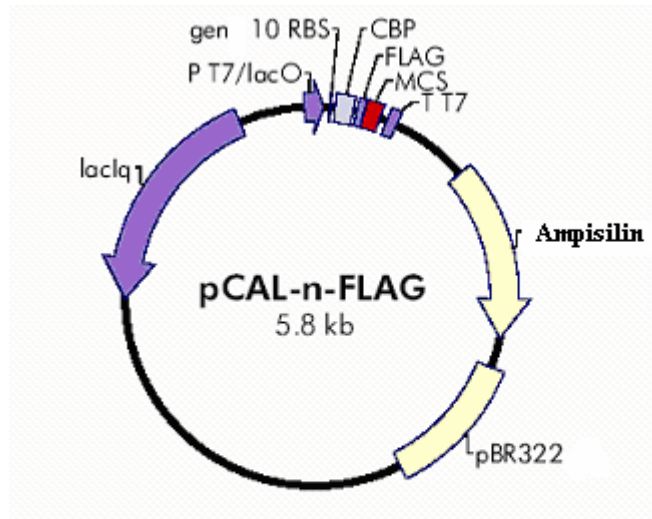
- *Thrombin Kesme Tamponu*; 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> toplam hacim 250 mL olarak hazırlanır.
- *PBS Tamponu*; 150 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1litre hazırlanmak suretiyle son çözelti pH'sı 7.4'e ayarlanır ve 1 L olarak hazırlanır.
- *BLB*; 1M Tris-HCl pH: 7.5 (100 mL): 2 mL alınır, 0.5 M pH 8.0 stok EDTA çözeltisi (100 mL): 400 µL alınır, Triton X-100 %20 (100 mL): 2 mL, 4 M stok NaCl (500 mL): 25 mL alınarak çözeltiliye 170.6 mL destile su eklenerek 200 mL tampon elde edilir.
- *Lizis tamponu*; 1M Tris-HCl (pH 7,9); 1M KCl; 0.5m EDTA; %20 Tween 20; %50 Nonidet-P 40 (İgepal) alınarak 1 litre tampon hazırlanır.

## 2.2 CA-IX ve CA-XII Proteinlerinin E.coli'de Ekspresyonu

### 2.2.1 CA-IX ve CA-XII Proteinlerinin Ekspresyon Plazmidleri

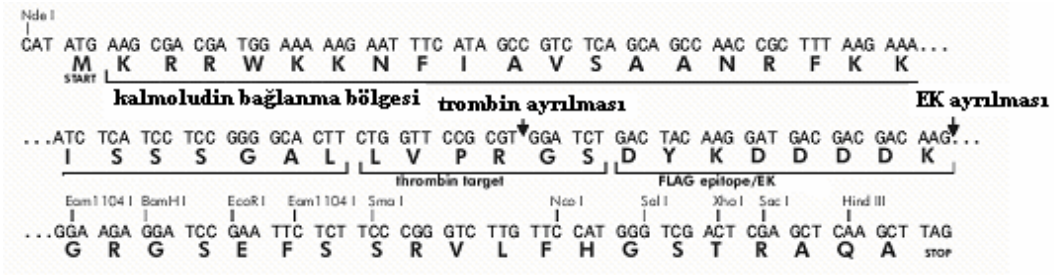
Daha önceden PCR ile çoğaltılan CA-IX ve CA-XII cDNA'ları pCAL-n-FLAG vektörü içine klonlanmıştır [123]. pCAL-n-FLAG protein ekspresyon vektörü, üretilen proteinin amino ucunun önünde afinite ucu N ve C terminusunun ilgili protein kodlu sekansının CBP(Calmodulin-Binding-Peptide) içerir ve bu da füzyon proteinini oluşturur. Bu vektör, T7 10 promotordur ve RNA polimerazın seçiciliğine izin verir. Bu da ekspre edilecek proteinin kararlılığını artırır, aynı zamanda IPTG ile indüklenebilir.

*E. coli*'de CBP ucunun etkili translasyonu, N ucunda CBP içeren füzyon proteinlerinin yüksek seviyelerde ekspre edilmesine neden olur. Trombin için tanıma bölgesi CBP-sekansı ve MCS arasındadır. Trombinle birlikte saflaştırılmış füzyon proteinin sindirimi arjinin ve glisin rezidüleri arasında meydana gelir.



Şekil 2.1 pCAL-n-FLAG vektörü (Stratagene) pET-11a vektörlerinden türetilmiştir.





Şekil 2.2 pCAL-n-FLAG Çoklu Klonlanma bölgesi [86-274 sekanslarının açılımı]

Çizelge 2.3 pCAL-n-FLAG vektöründe bulunan bazı bölgeler ve nükleotid durumları

Özellik	Nükleotid durumu
T7 promotör ( <i>lac</i> operatörü ile birlikte)	1-44
10 ribozom bağlama bölgesi T7 geni	74-80
Kalmodulin bağlama peptid (CBP)	92-169
Trombin hedefi	170-187
FLAG ucu	188-211
Enterokinaz (EK) hedef	197-211
Klonlanma bölge	218-272
T7 terminatör	342-393
Ampisilin direnç ( <i>bla</i> ) ORF	805-1662
pBR322 replikasyon orijini	1813-2480
<i>lacIq</i> represör ORF	4360-5448

### 2.2.2 IPTG Kullanılarak Hedef Proteinin İndüklenmesi

Ekspresyonu T7 promotör sistemi ile başlatılması için, CA-IX ve CA-XII genleri BL21(DE3) *E. Coli* soyuna transforme edilmiştir [123].

CA-IX ve CA-XII ekspresyon plazmidlerini taşıyan BL21(DE3) hücreleri, 100 µg/mL ampisilin içeren 100 mL LB medyum içine aşılanarak 16 saat yavaş hızda karıştırmak suretiyle inkübasyona bırakılır.

100 µg/mL Ampisilin ve  $ZnCl_2$   $1.0 \times 10^{-4}$  M içerikli 2.5 L LB medyumunu tekrar hazırlanarak bakteri büyüme kontrolü  $\lambda=600$  nm dalga boyunda OD 0.5 olana kadar izlenir. Daha sonra 1 mM IPTG eklenerek 3-4 saat inkübasyona bırakılır. Son olarak, kültür 7000 g, 5 dak. , 4°C’de santrifüj edilir ve elde edilen pellet –20°C de saklanır.

### **2.2.3 Protein ekstraktlarının Hazırlanması**

CA-IX ve CA-XII protein ekstraktları Strategene ekspresyon sisteminde belirtildiği gibi yapılmıştır [123].

1 litre indüklenmiş hücre kültürü için, elde edilmiş pellet 30 mL  $CaCl_2$  bağlama tamponu ile çözünür. Çözünen pellet üzerine 200 µg/mL lizozim eklenerek mekanik olarak tüp 15 dak. vortexlenir. Daha sonra örnek 30 saniye ara hızda sonike edilir. Sonike edilen örnek 3-5 dak. buz üzerinde soğutularak 4 kez daha sonikasyon işlemi tekrarlanır. Sonikasyon bittikten sonra örnek 15 dak. yüksek hızda santrifüj edilir ve süpernatant yeni bir tüpe CaM afinite jeli ile saflaştırmak için transfer edilir. Kalan pellet –80°C de muhafaza edilir. Bunun saklanmasıdaki neden ise ileri analiz safhasında çözünmemiş füzyon proteinin tekrar elde edilmesidir. Tüm işlemler, 4°C de yapılmalıdır.

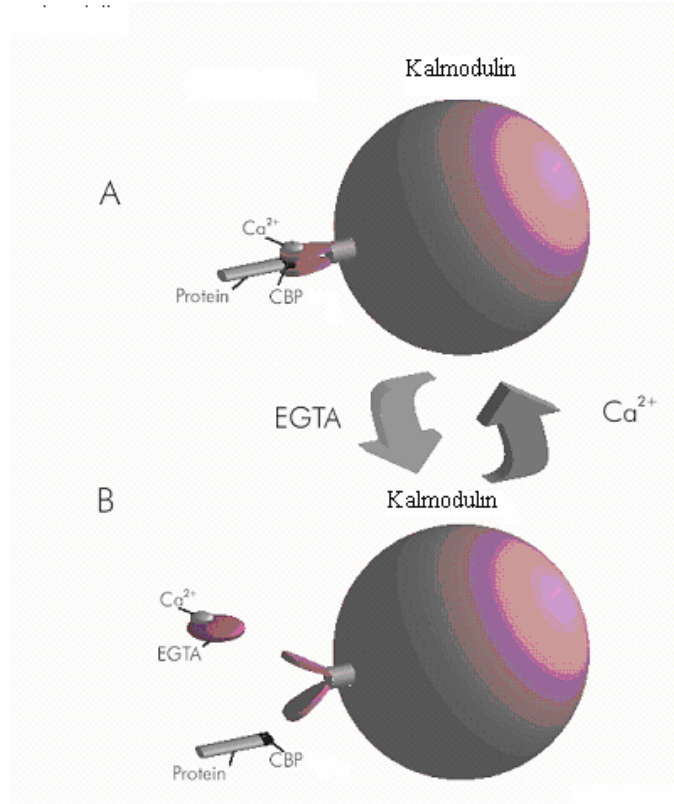
### **2.2.4 Ekspresyon sonucu üretilen Proteinlerin Saflaştırılması**

Farklı ekspresyon sistemleri sonucu üretilen CA-IX ve CA-XII proteinleri öncelikli olarak, ayrı ayrı Kalmodulin ve GST-Sepharose ticari afinite jelleri saflaştırılmıştır [123]. Daha sonra elde edilen proteinler, Sepharose-4B-L-tirozin-sulfonamid afinite jeli ile ikinci bir saflaştırma işlemine maruz bırakılmıştır [124].

### 2.2.4.1 Kalmodulin Afiniteli Jeli ile Saflaştırma Basamakları

Kalmodulin-bağlı peptit füzyon proteini, ham hücre ekstraktlarından alınarak pH 7’de CaM afiniteli jelinden saflaştırılabilir [123].

CBP CAM proteininin N terminus bölgesinde bulunan 26 aminoasit büyüklüğünde ve kalsiyum bağlı olan bir ligandır (Şekil 2.3). Afiniteli protein ekspresyon ve saflaştırma sisteminde CBP afiniteli ucu CaM’a bağlanarak elüsyon gerçekleştirilene kadar yüksek afiniteli tutunur.



Şekil 2.3 Afiniteli protein ekspresyonu ve saflaştırma sistemi. Jelde bulunan protein kalmodulin CBP-uçlu füzyon proteine düşük derişimde kalsiyum varlığında nötral pH’da bağlanır (A). Füzyon proteini, nötral pH’da 2 mM EGTA ile birlikte elüe edilir (B). Saflaştırılan protein, istenilirse saklanır ya da proteolitik ayrılma için trombin ya da entokinaz EK ile kesilir.

İzole edilen proteinlerin saflık kontrolleri %10’luk SDS poliakrilamid jel elektrofezi ile birlikte kontrol edilir. Elde edilen enzimlerin beklenen moleköl

ağırlıkları 33 kDa civarındadır. Bu proteinlerin amino terminal uçları, sekansı çıkarılmıştır. Her bir hazırlamadaki protein miktarı, spektrofotometrik olarak belirlenir ve enzim aktiviteleri CO<sub>2</sub> substrat alınarak stop-flow enzimatik aktivite yöntemiyle elde edilir [123].

#### 2.2.4.1.1 Kalmodulin Afinite Jelinin Hazırlanması

Kalmodulin afinite jeli etanol ile dekante edilir. Jel, CaCl<sub>2</sub> bağlama tamponunun 5 mL'si ile tekrar dengeleme yapılır. Kalmodulin afinite jelinden süpernatant tekrar dekante edilir ve bir kez daha 5 mL CaCl<sub>2</sub> bağlama tamponu ile yıkanır. Dengelemeyi tamamlamak için, yukarıda verilen 2 basamak 3defa tekrarlanır.

Çizelge 2.4 Ticari Kalmodulin Afinite Reçinesine uyumlu reaktifler ve kullanım uyarıları

Reaktifler	Kullanım Miktarı
Sodyum klorür (NaCl)	50-300 mM
Potasyum klorür (KCl)	50-300 mM
Dithiothreitol (DDT)	5 mM
β-merkaptotanol	10 mM
Amonyum sülfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50-300 mM
Nonidet P-40 (NP-40)	% 0.1 (v/v)
% 1 Triton X-100	% 0.1 (v/v)
Protease inhibitörleri (2µg/mL leupetin, 2µg/mL pepstatin ve 1mMbenzamidin)	Protease inhibitörleri rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak EGTA ve EDTA gibi metal-iyonu şelatlayıcı reaktifler sadece elüsyonda kullanılmalıdır
İmidazol	1 mM

#### **2.2.4.1.1.2 Standard Kolon Metodu**

Dengelenmiş kalmodulin afinite jeli hava kabarcıklarından arındırılır. Kolon içerisindeki hava boşluklarını ortadan kaldırmak için kolonun % 10'u CaCl<sub>2</sub> bağlama tamponu ile doldurulur. Kalmodulin afinite jelinin kolona iyi paketlenmesi ve de hava kabarcıklarının oluşmaması için cam bir baget yardımıyla jel hafifi vuruşlarla kolona paketlenir. Hemen sonra kolonun 80%'i CaCl<sub>2</sub> bağlama tamponu ile doldurulurak kolon peristaltik pompaya bağlanır. Kolonun alt kısmı açılarak yatak hacminin istenilen hızda tutulması için pompa ayarlanır. Paketleme tamamlandığında pompa kapatılır ve kolonun üst kısmı jelin iyice oturup oturmaması için kontrol edilir. Kolona lizat yüklemeye hazır konuma getirilmiştir. Örneğin yüklenmesinden sonra, kolon istanmeyen diğer maddelerin ayrılması için 5-10 kez CaCl<sub>2</sub> bağlama tamponu ile yıkanır. Proteinler, kalmodulin afinite jelinden kalsiyumun ayrılması ile kolon matriksinden elüsyonla ayrılırlar. Kalsiyum varlığında kalmodulin afinite uçlu füzyon proteinin ayrılması ile konformasyonel bir değişime uğrar. Kalsiyum ayrılmasının tercihi EGTA ile şelat oluşturmasıdır. 2 mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM β-mercaptoetanol, 2 mM EDTA, ve 150 mM NaCl elüsyon tamponu da kullanılabilir [123].

#### **2.2.5. ENTEROKINASE ile Saflaştırılmış CBP Ucunun Ayrılması**

##### **2.2.5.1. Füzyon Proteinin Ayrılması**

pCAL-n-FLAG vektörü bir EK tanıma bölgesi içerir. Aşağıda verilen protokol füzyon proteinin ayrılması ve ayrılan proteinin uzaklaştırılması için uygulanmıştır [123].

CBP füzyon proteini EK ayrılma tamponu içerisinde dializ edilir. Her bir 100 µg füzyon proteini içerisine bir birim EK eklenir ve 24 saat oda sıcaklığında ayrılma tamamlanana kadar reaksiyon inkübasyona bırakılır.

### **2.2.5.2 Enterokinaz ile Ayrılan Ürünün Uzaklaştırılması**

Reaksiyonun NaCl derişimi 200 mM olarak ayarlanır. Kalmodulin afinite jeli ve STI–agaroz karışımı iyice bulamaç haline getirilerek homojen bir karışım oluşturulur. Bu karışım, EK ile etkileştirilmeden önce iyice 200mM NaCl içeren EK tamponu ile yıkanır. Tamponla yıkanan jel karışımı mekaniksel olarak 4°C’de 30 dak. karıştırılır ve jel düşük hızda (~1000 rpm) 2–3 dak. santrifüj edilir.

### **2.2.5.3 GST- CA IX ve CA-XII Proteinlerinin İzolasyon Protokolü**

Pastorek ve grubunun kullandığı Glutathione-S Transferase (GST)-CA (IX-XII) afinite jeli ile CA-IX ve CA-XII izoenzimleri saflaştırılmaya çalışılmıştır [125]. IPTG kullanılarak hedef proteinin indüklenmesi bakteri kolonundan 1 koloni LB agar plakasına ekilmek için alınır. 100 µg/mL ampicilin içerikli 5 mL LB medyuma ekilen bakteriler bir gece 37°C’de bekletilir. 1 gün sonra elde edilen gece kültürünün 50 mL’sinden 100 µl bakteri 500 mL hacimli otoklavlanmış şişeye aktarılır ve 30°C’de OD<sub>600</sub>=0.3-0.4 olana kadar bekletilir. Daha sonra son derişimi 0.5 mM olan IPTG kültür ortamına eklenerek 2 saat daha 30°C’de inkübasyona bırakılır. Son olarak elde edilen kültür, 5 dak./3000 rpm/4°C de santrifüjlenir ve pelletler alınarak soğuk PBS ile 2 kez yıkanır. Pellet hemen kullanılmayacaksa -20°C’de saklanır.

### **2.2.6 Protein Ekstraktlarının Hazırlanması**

Elde edilen bakteri, lizis tamponu (10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100) içerisine alınarak üzerine 0.01 g lizozim eklenir ve 30 dak. proteaz Complete<sup>TM</sup> inhibitörleri ile buz üzerinde son derişim 0.2 mM olana dek bekletilir. Daha sonra, 5 kez 1 dak. arayla sonikasyon yapılır. En son olarak da sonike edilen hücreler, 30 dak/10000 rpm/4°C de santrifüj edilir.

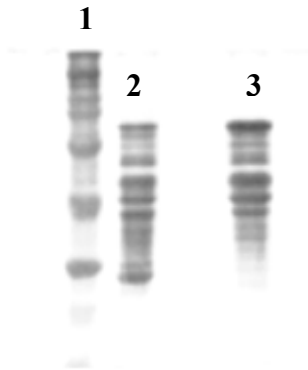
## 2.2.7 Proteinin Saflaştırılması

### 2.2.7.1 GST-Sepharose Ticari Afinite Jeli ile İzoenzimlerin Saflaştırılması

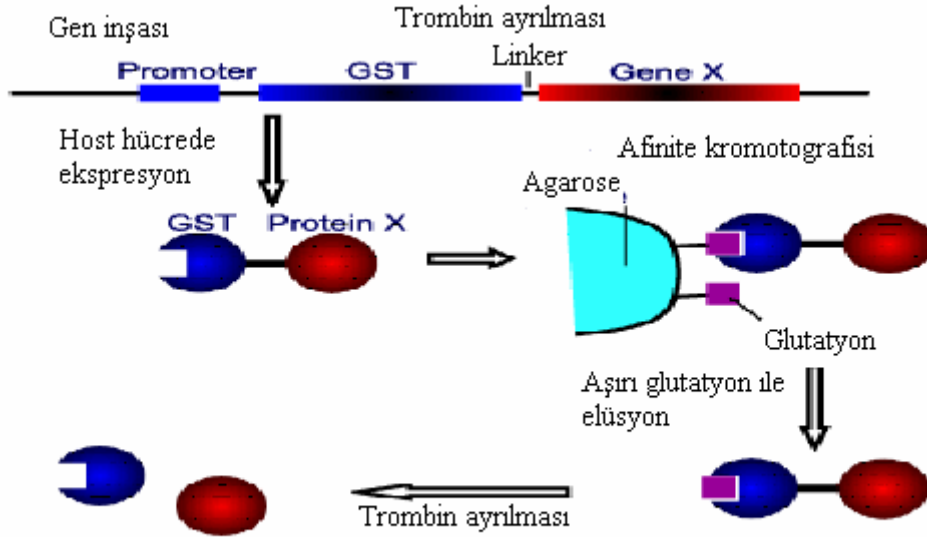
Elde edilen süpernatant kolona yüklenmeden önce kolon jeli 3 defa PBS tamponu ile ve 1 kez de lizis tamponu ile yıkanarak 2 saat buz üzerinde bekletilir. Yıkama ve elüsyon kullanılan kolonun fiziksel özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle kolon, GST-agaroz, GST-sepharoz, sulfonamid agaroz ya da CNBr ile aktifleştirilmiş anti-CA antibody kolonu olmalıdır.

GST-sepharoz, agaroz kolonları için yıkama tamponu 50 mL lizis tamponu ve 50 mL PBS tamponundan oluşur. Sulfonamid agaroz, CNBr ile aktifleştirilmiş anti-CA antibody yıkama tamponu ise 100 ml PBS tamponudur.

Şekil 2.5'ten de görüldüğü üzere uygulanan saflaştırma prosedürü tek bir basamakta yeterli olmadığından ikinci bir saflaştırma için Sepharose-4B-L-tirozin-sulfonamid afinite jeli kullanılmıştır [124].



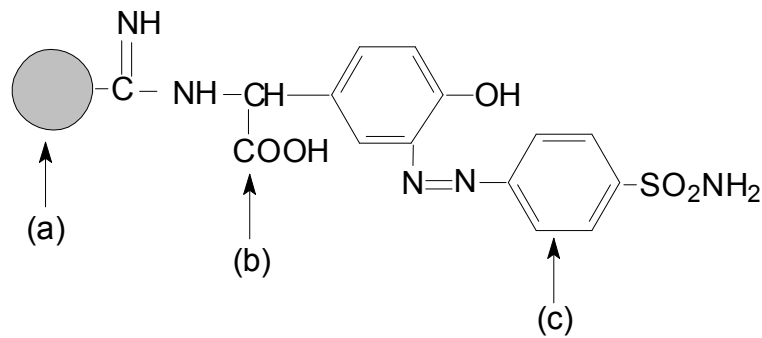
Şekil 2.4 Elektroforez jel GST-MN9. 1) Marker –Sigma, 2) BL21 içerisindeki GST-MN9, 3) BL21 Codon Plus içerisindeki GST-MN9 ; Görüntüleme Coomasie BB ile yapılmıştır.



Şekil 2.5 GST-Afinite saflaştırma tekniği ile Trombin Ayrılması

### 2.2.7.2 Sepharose 4B-L-tirozin-sulfonamid Afinite Jelinin Sentezi

CA izoenzimlerinin 2. adımıdaki saflaştırılması için, afinite jelinin organik sentezi yapılmıştır [124]. Matriks olarak kullanılan Sepharose-4B'de ki serbest hidroksit grupları, siyanojen bromürle aktive edilecektir. Daha sonra, matriksle enzim arasındaki sterik engeli azaltmak amacı ile L-tirozin uzantı kolu aktive edilmiş matrikse bağlanacaktır. Bundan sonraki adım ise, ligandın (p-aminobenzen-sulfonamid) uzantı koluna bağlanmasıdır. Çalışma için sentezlenen afinite jelinin yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.





Şekil 2.6 Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için kullanılan afinite jelinin kimyasal yapısı.a) Matriks, Sepharose-4B b) Uzantı kolu, L-tirozin c) Karbonik anhidrazın spesifik inhibitörü olan sülfanilamid

Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunun, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlanmıştır.

#### • Sepharose-4B'nin Aktifleştirilmesi ve Tirozin Bağlanması

10 mL Sepharose-4B jeli, destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna, 4 g toz haline getirilmiş CNBr'ün hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dak.). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir Buchner hunisine nakledildi. Daha sonra, 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi (pH 10.0) ile yıkandı. 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edilerek 90 dakika yavaş tempoda karıştırıldı. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda, absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.80) tamponu ile tekrarlandı. Tirozinle modifiye edilen Sepharose-4B aynı tamponun 40 mL'si içine alındı [124].

#### • p-aminobenzensülfonamidin Kenetlenmesi

25 mg p-aminobenzensülfonamid, 0°C civarında 10 mL 1M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO<sub>2</sub> ihtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzensülfonamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5' a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra, 1 litre

destile su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7.5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi [126-128].

### **2.2.7.2.1 GST-Sepharose Afinite Jeli ile Saflaştırılan Izoenzimlerin Sepharose 4B-L-tyrosine-sulfonamid Afinite Jeline Tatbik Edilmesi**

#### **2.2.7.2.2 Numune Hazırlanması**

Numunelerin Sepharose 4B-L-tyrosine-sulfonamid jeline tatbikinden önce pH'ları 8.7'e Tris-base ile ayarlandı.

#### **2.2.7.2.3 Numunelerin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu**

Hazırlanan afinite jeli, 1.8 cm x 12 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 8.7) tampon çözeltisi ile dengelendi. pH 'sı 8.7 'ye ayarlanmış hemolizat kolona tatbik edildi. 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH=8.7) çözeltisi ile kolon yıkanarak, affinite jeline tutunmuş olan karbonik anhidrazın dışındaki safsızlıklar uzaklaştırılmış olur. Daha sonra 0.1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0.5 M NaClO<sub>4</sub>, (pH 5.6) çözeltisi kolona tatbik edilerek, saf haldeki enzim elüe edildi. Bu elüsyon çözeltisi ile alınan enzim çözeltisi, 5'er mL fraksiyonlar tüplere alınarak peristaltik pompa yardımıyla, kolonun akış hızı 20 mL / saat olarak ayarlandı. Tüplere alınan her bir eluatta, 280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini ve CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi tayini yapıldı [105]. Daha sonra aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilerek, saf enzim ve hemolizatta Bradford yöntemiyle, kantitatif olarak protein miktarı belirlendi ve ayrı ayrı spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma oranı bulundu. Saflaştırılan enzim çözeltisi önce destile suya karşı 6 saat kadar iki defa suyu değiştirilerek daha sonra, 0.1 M HEPES (pH=7.5) çözeltisine karşı 3 saat 1 defa tampon değiştirilerek diyaliz edildi [123].

## **2.3 Yöntemler**

### **2.3.1 Protein Tayini**

#### **2.3.1.1 Kalitatif Protein Tayini**

Kromotografi işlemleri sonunda, eluatlar eşit hacimde alınarak bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı [103]. Bu metodun esası, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi prensibine dayanmaktadır. Kolon fraksiyonları eşit hacimde kuvars küvetlere alınarak, absorbandsları UV-spektrofotometrede köre karşı okundu.

#### **2.3.1.2 Bradford Yöntemiyle Protein Tayini**

Bu yöntemle, afinite kromotografisi ile saflaştırılan enzim çözeltileri ve hemolizatlardaki protein miktarları belirlendi. Bu yöntem, coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanma esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands gösterir. Proteine boyanın bağlanması, 2 dakika gibi çok hızlı bir zamanda gerçekleşir. Bu yöntemin hassasiyeti, 1-100 µg arasındadır [129].

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltilerinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve destile su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 mL'ye tamamlandı. 5 ml Coomassie reaktifi her bir tüpe ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra, 595 nm dalga boyunda 3 mL'lik kuvars 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 olarak elde edildi.

## 2.4 Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

### 2.4.1 CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi (Maren Metodu)

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması esnasındaki aktivite ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları bu yöntem, CA enziminin saflaştırılması esnasında hemen hemen tüm araştırmacılar tarafından uygulanmıştır. Bu yöntem, CO<sub>2</sub>'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> sebebiyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibindedir. Burada indikatör olarak, pH=7.4'de renk değiştiren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponundan (0.15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) yararlanıldı [103].

Deney prosedürü, şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1.5 mL doymuş CO<sub>2</sub> çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, kolondan alınmış enzim çözeltisinden 0.1 mL ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0.4 ml karbonat tamponu katılarak, kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre, kronometre ile belirlendi (tc). Aynı işlemler, her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0.1 mL destile su konularak, yapıldı (to). Bu yöntemle göre, CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$EU = (to - tc) / tc$$

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

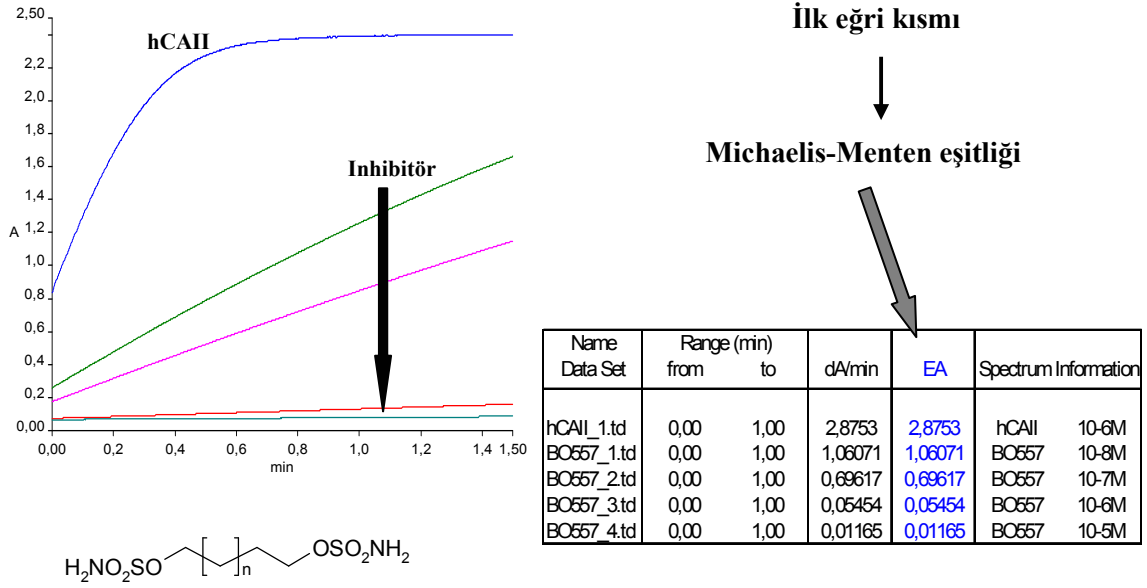
### 2.4.2 CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi (Stop Flow Kinetik Alet)

SX.18MV-R Applied Photophysics stopped-flow aleti CA-CO<sub>2</sub> hidrasyon aktivitesi için kullanılmıştır [123]. Bu alet, hızlı kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik reaksiyonların stop-flow ile başlamalarına izin verir. Bu aletin asıl prensibi adsorpsiyon metoduna dayanır.

Temel avantajları arasında, fizyolojik şartlar altında pH ve sıcaklık, reaksiyon zamanlarının ve reaktif miktarlarının indirgemesine sahip olma, tekrarlanabilir üretim verilebilir. Stop-Flow aletinde veri analizi aşağıda görülen spektrumdan anlaşılacağı üzere,HCA-II enziminin bir sülfonamid türevi ile birlikte ve tek başına olan ilk kısımdaki eğri azalışı fark edilmektedir (Şekil 2.7). dA/dak. oranından  $K_1$  değeri Michelis Menten eşitliği kullanılarak hesaplanır.



Şekil 2.7 Stop-Flow Aleti



Şekil 2.8 CA II enziminin tek başına (mavi çizgi) olan adsorpsiyon spektrumu, ve disülfonamid türeviyle beraber olan artışı

## 2.5 Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel (SDS-PAGE) Elektrofrez ile Enzim Saflığının Kontrolü

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra % 3-10 kesikli sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE), Laemmli tarafından belirtilen yöntemle yapıldı [130].

Bunun için, elektrofrez plakaları önce su, sonra alkol ile yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara, vazelin ince bir tabaka halinde sürüldü. İki cam plaka, birbiri üstüne konuldu ve kıskaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu.

Ayırma jeli hazırlanarak, plakalar arasına enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için, % 0.1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşmaya kadar beklendi (30 dak.). Ayırma jelinin katılaşmasından sonra, jelin düzgünleştirilmesi için konan % 0.1'lik SDS döküldü ve daha sonra yığıma jeli, tarağın yerleştirilmesine izin verecek bir şekilde plakaların üst yüzeyine kadar dolduruldu. Tarak, üzerine dikkatli

bir şekilde yerleştirilerek bir süre tarağın kuyucuklarının oluşması için bekletildi ve daha sonra tarak dikkatlice çıkarılarak oluşan kuyucuklar işaretlendi. Jelin üstü önce saf su, daha sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Elektroforez kuyucuklarına uygulanacak numunelerin her biri, 20 µg protein ihtiva edecek şekilde hazırlandı. Toplam hacim, 100 µL olacak şekilde 1/ 1 oranında hazırlanan numunelere numune tamponu katıldı. Bu numuneler, üç dakika kaynar su banyosunda inkübe edildi. Daha sonra numuneler soğutulurken, elektroforez kuyucuklarına çok ince bir enjektör yardımıyla uygulandı. Tank kapağı kapatılarak, alt taraftan (+) kablo (anod), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Elektroforeze takılan güç kaynağı, önce 80 volt da yarım saat bekletildi ve daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında tatbik edildi. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu, tekrar kullanılmak üzere özel kabına konuldu.

## **2.5.1 SDS-PAGE jelinin Boyanması İşlemleri**

### **2.5.1.1 Coomassie Brilliant Blue ile Boyama Yöntemi**

Jel de, özel kabına konularak renklendirme çözeltisi üstünü örtünceye kadar dolduruldu. 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine konuldu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Renksizleştirme çözeltisi aktif karbon üzerinden geçirilerek, tekrar tekrar kullanıldı. Jel, renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi .

### **2.5.1.2 AgBr Boyama Yöntemi**

Protein jelinin boyanması, SERVA Silver Staining Kit for SDS PAGE (Cat. No. 35076.01) gümüş boyama kitiyle yapılmıştır [122].

Kit içeriği, 500 ml Fixing çözeltilisi, 25 x 30 mg sodyumtiosülfate . 5 H<sub>2</sub>O, 250 mL gümüş nitrat çözeltilisi, 1.5 mL formaldehit, 500 mL sodyum karbonat çözeltilisi, 500 mL sitrik asit çözeltilisi içermektedir. Aşağıdaki protokol, 100 mL çözeltili için (125 x 125 mm) boyutlarındaki elektroforez aleti için kullanılmıştır. İnkübasyon ve yıkama basamakları zamanı akrilamid jellerinin 0.3 - 0.5 mm kalınlığına göre optimize edilmiştir. Tüm boyama işlemlerinde bir çalkalayıcı kullanılmalıdır. Çalkalama hızı, 50 - 100 rpm arasında olursa iyice tutunma ve boyama gerçekleşir. Gümüş boyama en hassas metottur. Tüm işlemlerde destile su kullanılması ve boyama plaklarının ise camdan olmasına dikkat edilmelidir. Buna göre protein jelinin boyanması için tutunma, yıkama ve boyama işlemlerinin inkübasyon zamanları Çizelge 2.2’de verilmektedir.

## **2.6 Antibiyotikler ve Kemoterapi ilaçları için I<sub>50</sub> Değerlerinin Bulunması**

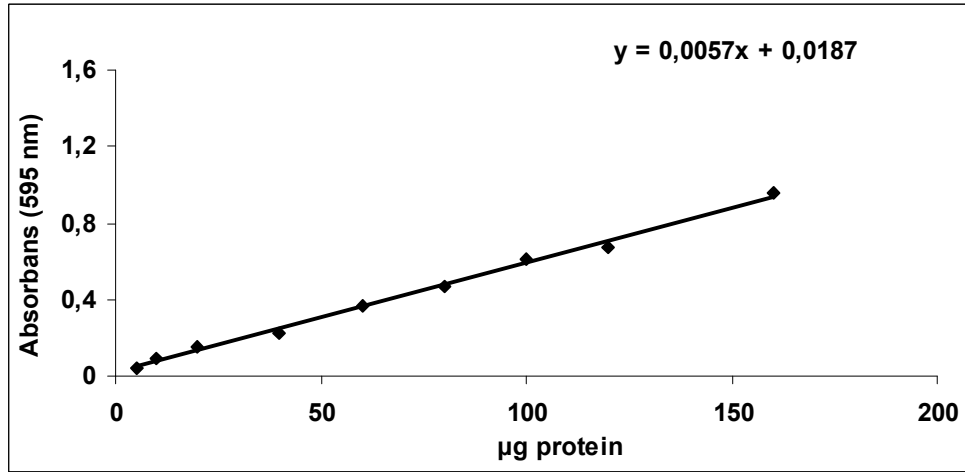
Farklı antibiyotikler ve kemoterapi ilaçlarının I<sub>50</sub> değerlerini bulmak için, optimum şartlarda CO<sub>2</sub> substratının 70 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce antibiyotiksiz ve kemoterapi ilaçları olmadan ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik antibiyotik konsantrasyonları ve kemoterapi ilaçlarına karşılık gelen absorbanslar Stop Flow aletinde 557 nm’de HEPES tamponuna karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktivite hesaplandı. % Aktivite -[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak her bir antibiyotik ve kemoterapi ilacı için I<sub>50</sub> değerleri hesaplandı.



### 3. BULGULAR

#### 3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayini tümör ilişkili CA izoenzimleri için, Bradford yöntemi ile yapıldı [129]. 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 değerleri, Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



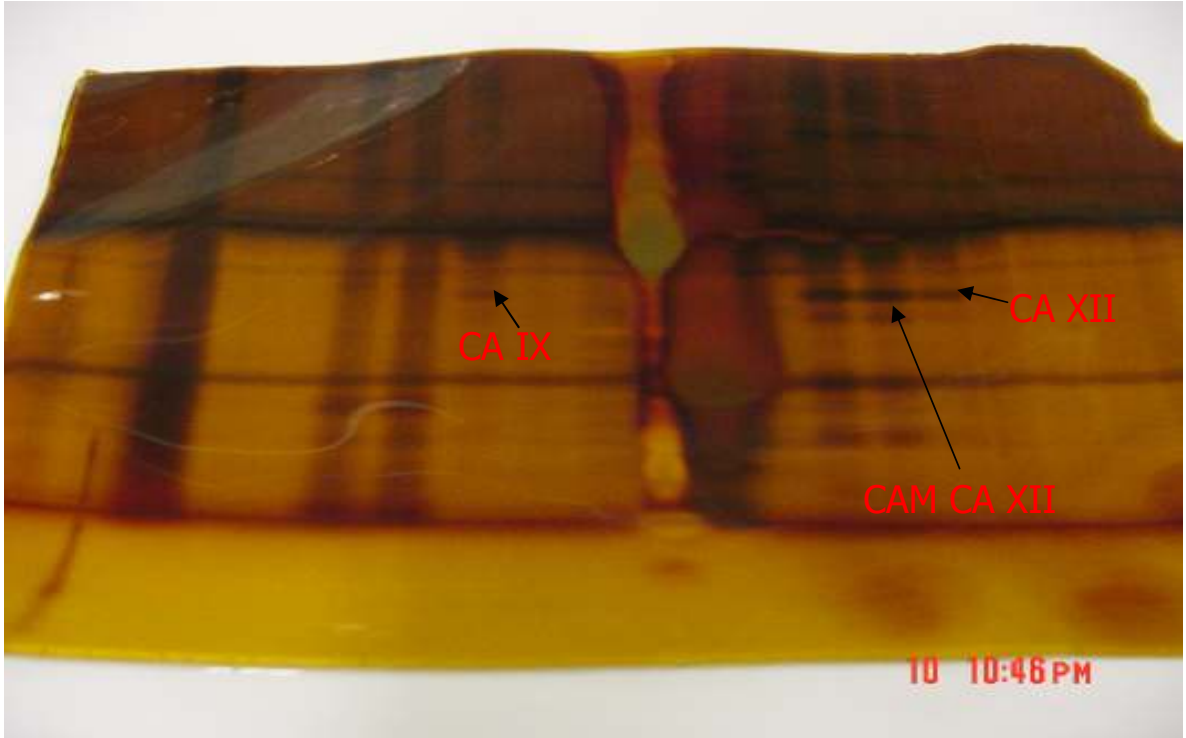
Şekil 3.1 Bradford yöntemi ile protein tayini için hazırlanan standart grafik

#### 3.2 CA-IX ve CA-XII Izoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Tümör mikroçevresinde asidifikasyondan sorumlu ve tümüyle kanserli hücrelerde aktivite gösteren CA-IX ve CA-XII izoenzimlerin kanser dokusundan izolasyonu son derece güç bazı durumlarda ise imkansız olduğu bilinmektedir. Enzimin

saflığı inhibisyonu önemli derecede etkilediği düşünüldüğünde daha sağlıklı sonuçların elde edilebilmesi için enzimin saflaştırılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin *E.Coli*'de ekspresyonu sonucu elde edilen enzim, afinite kromatografi tekniği ile saflaştırılmıştır [124]. Saf izoenzimler üzerinde kanser tedavisinde kullanılan 11 çeşit kemoterapi ilacı ve farklı gruplarda 15 çeşit antibiyotik ile inhibiyon çalışmaları yapılmıştır.

Şekil 3.2 ve 3.3'de farklı boyama teknikleri sonucu elde edilen SDS-PAGE fotoğrafları görülmektedir. Şekil 3.2'de SDS-PAGE fotoğrafında, ticari kalmodulin afinite jeli ile saflaştırılmış CA-IX bandı gözlenemezken CA-XII bandı gözlenmiştir. Aynı zamanda fotoğrafta, Sepharoz-4B-L-tirozin-sulfonamid afinite jeli saflaştırılmış CA-IX ve CA-XII izoenzim bandlarının karşılaştırılması görülmektedir



Şekil 3.2 Sepharose 4B-L-tirozin-sulfonamid ile saflaştırılan CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin AgBr Tekniği ile boyanmış SDS-PAGE fotoğrafı



Şekil 3.3 CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin Comassie Blue boyası ile boyanmış SDS-PAGE fotoğrafı

Şekil 3.2 ve 3.3'den anlaşılacağı üzere CA-IX ve CA-XII izoenzimleri afinite kromatografi tekniğine göre saflaştırılarak enzim saflıkları SDS-PAGE protein jel elektroforezine göre ölçülmüştür. AgBr tekniğinin daha duyarlı olduğu elde edilen keskin bantlar sonucu daha iyi anlaşılmaktadır. Protein jel elektroforezinde ticari afinite jeli Glutatyon-Sepharoz-4B ile saflaştırılan CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin, tarafımızdan sentezlenmiş olan Sepharoz 4B-L-tirozin-sulfonamid afinite jeli ile kıyaslaması görülmektedir.

Çizelge 3.1 Sepharoz-4B-tirozin-sulfonamid afinite jeliyle saflaştırılan CA-IX izoenziminin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite	Saflaştırma Derecesi	% Verim
CA-IX	Ekstrakt (10 mL)	65	6.5	10.58	0.614	-----	100
	Enzim (12 mL)	28	2.3	0.029	79.3	129.15	43

Çizelge 3.2 Sepharoz-4B-tirozin-sulfonamid afinite jeliyle saflaştırılan CA-XII izoenziminin Saflaştırma Tablosu

Enzim	Fraksiyon	Toplam Aktivite (U)	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite	Saflaştırma Derecesi	% Verim
CA-XII	Ekstrakt (10 mL)	57	5.7	8.70	0.655	-----	100
	Enzim (12 mL)	16	1.33	0.022	60.45	92.29	28

Çizelge 3.1 ve 3.2 Sepharoz -4B-L-tirozin-sulfonamid jeli ile saflaştırılmış CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin saflaştırma tablosu görülmektedir. Tablolardaki verilerden CA-IX ve CA-XII izoenzimleri için sırasıyla % 43 ve % 28 verimle 129.15, 92.29 kat saflaştırma elde edildiği belirtilmektedir.

### **3.3 CA-IX ve CA-XII Izoenzimlerinin Farklı Antibiyotik ve Kemoterapi İlaçları Üzerindeki İnhibisyon Değerleri**

Afinite tekniği ile saflaştırılan CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin 15 adet antibiyotik ve 11 adet kemoterapi ilaçlarıyla denenmiş her bir ilaç için 4 farklı CA izoenzimiyle olan inhibisyonu, Şekil 3.4-3.107 grafikleri ile verilmektedir.

Bakterileri öldüren ya da çoğalmalarını önleyen ilaçlar olarak bilinen antibiyotikler çalışmamızda aminoglikozid, beta-laktam, makrolid, rifamisin ve tetrasiklin grupları olmak üzere 15 çeşit antibiyotik tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ve sitozolik ticari CA-I, CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen verilerden 4 izoenzim üzerinde etkili olan ansamisinler grubundan Rifocine, makrolit grubuna sahip ve protein sentezinde görev alan Rosamicine, pensilin grubundan olan ve hücre duvarı sentezi görevine sahip Amplital, kinolon grubundan olan DNA-Giraz inhibitörü olan Avalox ve aminoglikozit grubundan olup protein sentezinde görev alan Genta antibiyotiklerinin etkili inhibisyon gösterdiği anlaşılmaktadır.

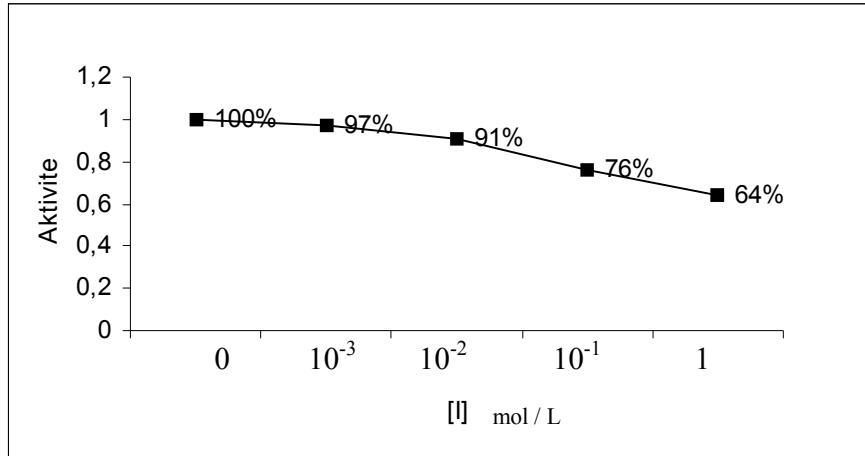
Çalışmanın diğer inhibisyon verileri kemoterapi ilaçları üzerinde araştırılmıştır. Antikanser ilaçları olarak da bilinen kemoterapi ilaçlarının değişik sınıflandırmalara sahip olduğu ve metabolizmada etkilerinin farklı olduğu vurgulanmaktadır. Söz konusu çalışmamızda CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ve sitozolik ticari CA-I, CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri belirlenmiş ve en iyi inhibisyon verileri; Carboplatin/EBEWE, Cis-platin/ EBEWE, 5-Fluorouracil Biocyn ve Ampto (irronetokon) ilaçlarından elde edilmiştir.

### 3.3.1 Antibiyotikler

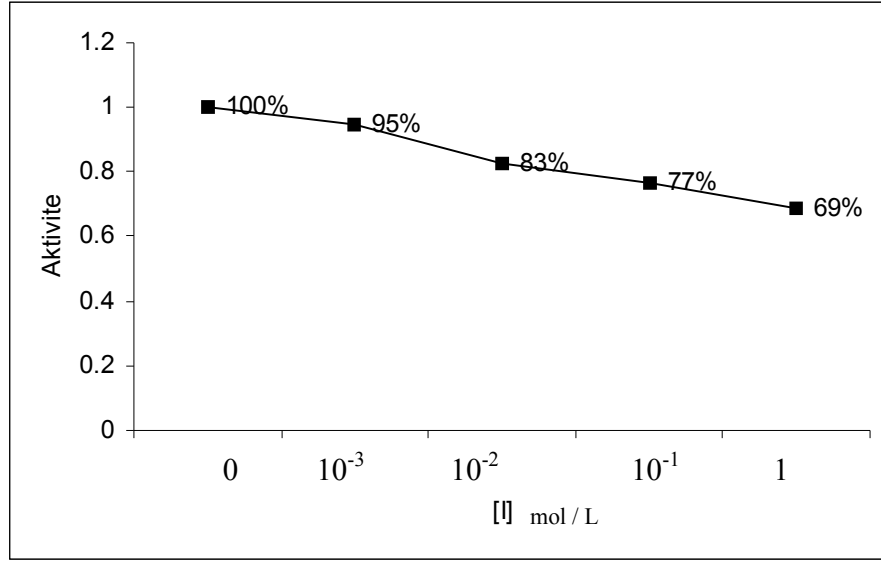
Tümör ilişkili HCA-IX, HCA-XII izoenzimleri ve sitozolik karbonik anhidraz HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin antibiyotikler üzerindeki inhibisyon etkileri, Şekil 3.4- Şekil 3.63 grafiklerinde gösterilmektedir.

#### 3.3.1.1 Kemisetin Süksinat

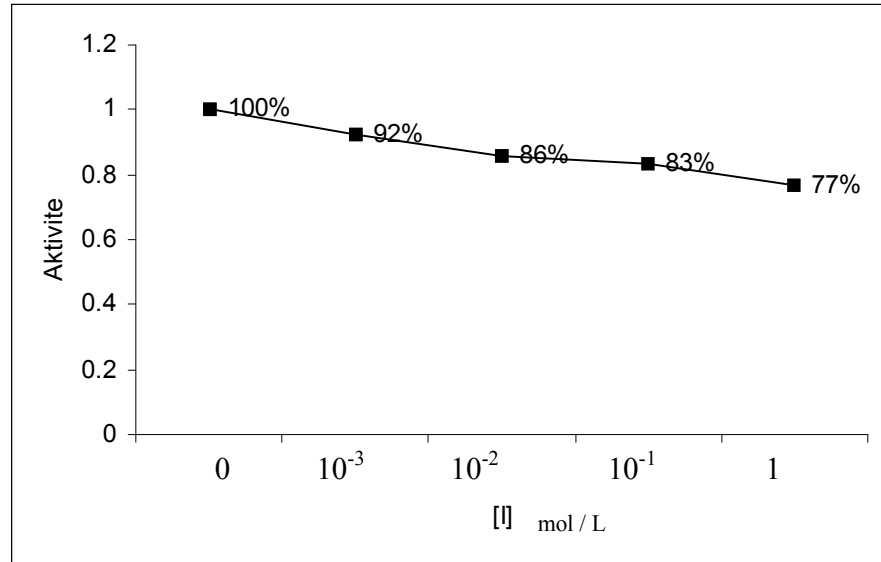
Tesirini sağlam hücrelerde ve hücre içermeyen sistemlerde protein sentezini etkileyerek veya inhibe ederek gösteren kemisetin süksinat, *in vitro* olarak birçok gram-negatif ve gram-pozitif bakteri üzerinde bakteriyostatik etkiye sahip *Rickottsiae*, *Lymphogranuloma-psittacosis* grubu ve vibrio cholera'ya karşı etkili, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.4-3.7'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.3'te ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



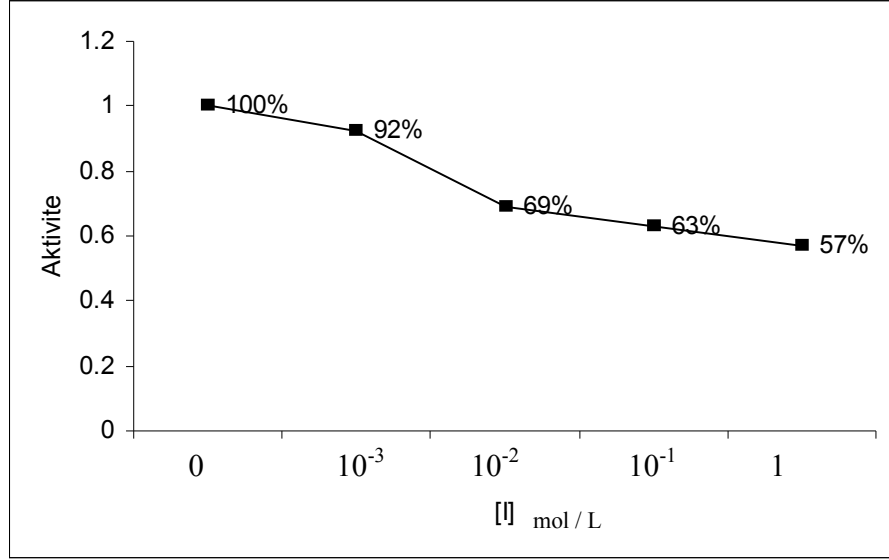
Şekil 3.4 Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.5 Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.6 Kemisetin süksinat antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.7 Kemacetine süksinat antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

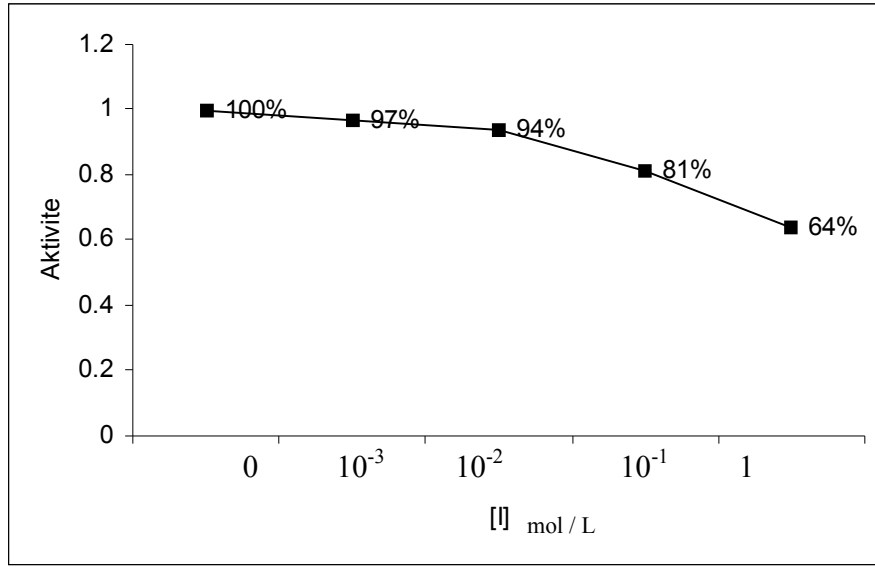
Çizelge 3.3 Kemisetin süksinat antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
4,72	2,08	2,06	3,18

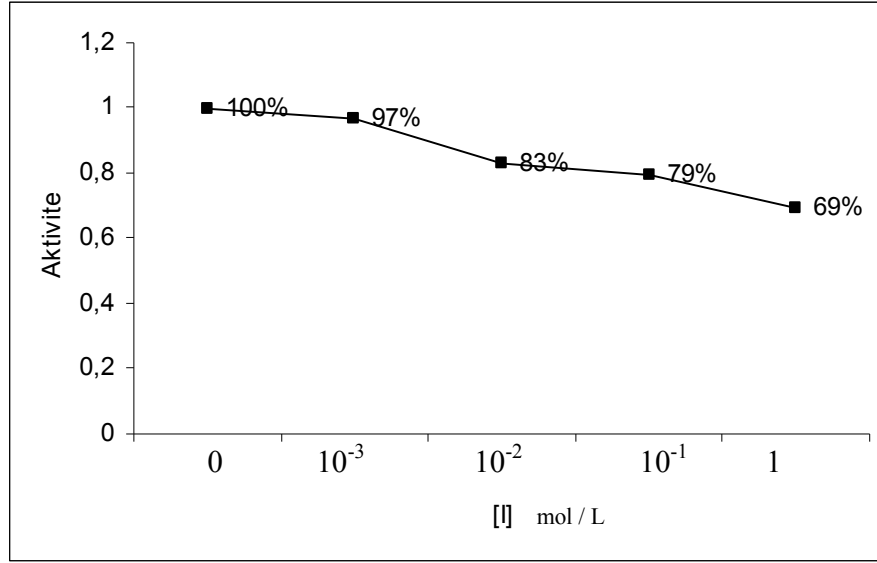


### 3.4.1.2 Amoklavın BID

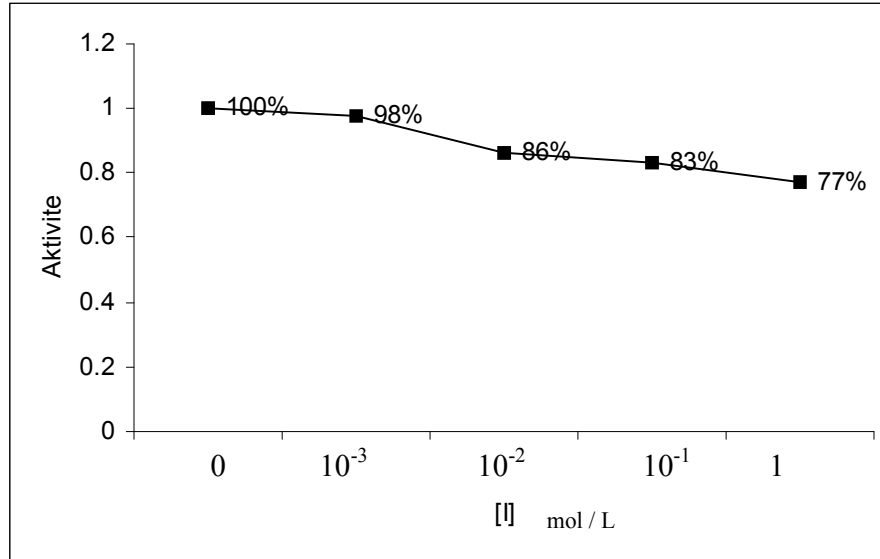
Amoklavın antibiyotiği, yarısentetik amoksilin antibiyotiği ve bir laktamaz inhibitörü olan klavanatın (klavanik asidin potasyum tuzu) kombinasyonunu içerir. Amoksilin ampisilinin bir anlağu olup, temelinde penisilin çekirdeği 6-aminopenisillanik asitten türemiştir. Amoksilinin moleküler formülü,  $C_{16}H_{19}N_3O_5S^{\circ} \cdot 3H_2O$  ve moleküler ağırlığı 419.46 g/mol olarak bilinmektedir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.8-3.11'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.4'te ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



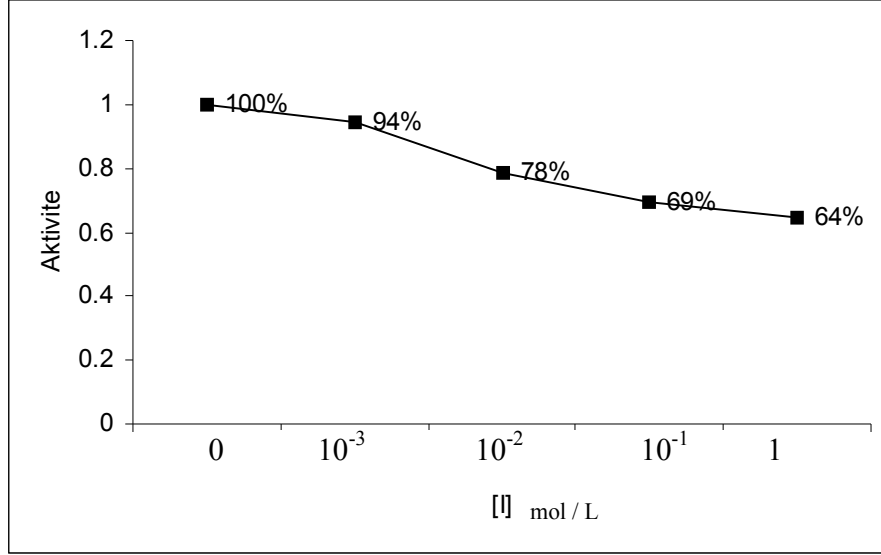
Şekil 3.8 Amoklavın BID antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.9 Amoklavine BID antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.10 Amoklavine BID antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



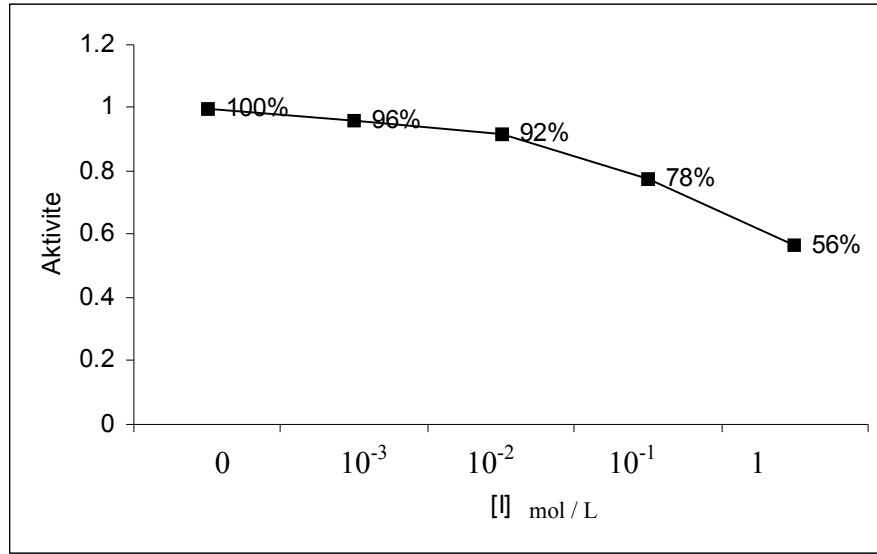
Şekil 3.11 Amoklavine BID antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.4 Amoklavine BID antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

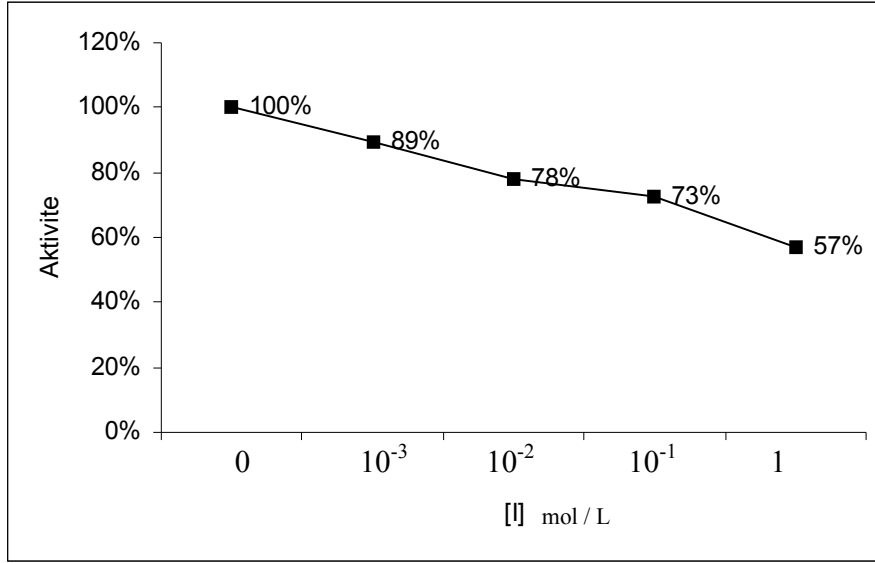
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
4,96	3,74	1,73	2,68

### 3.4.1.3 Rifosin (Rifamisin SV)

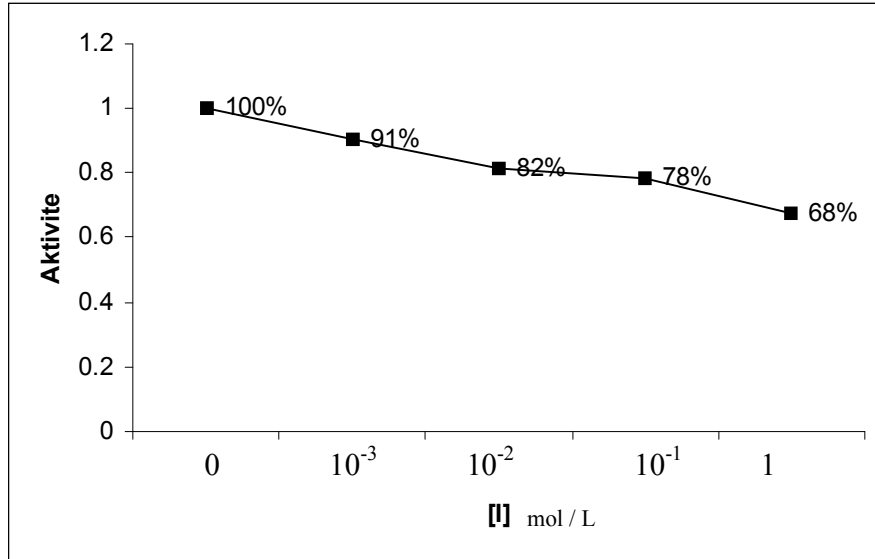
Rifamisin SV, yüksek bakterisit etkiye sahip bir antibiyotiktir. *In vitro* antimikrobiyel etkisi diğer antibiyotiklere karşı dirençli olsa bile, gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde çok düşük konsantrasyonlarda ve gram-negatif mikroorganizmalar üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda kendini gösterir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen Şekil 3.12-3.15’de inhibisyon grafikleri 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.5’da ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



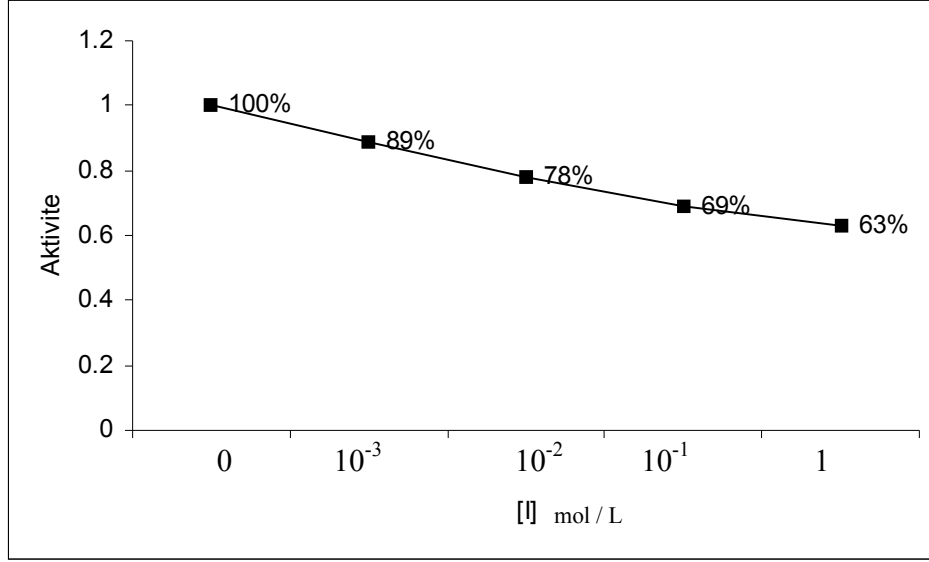
Şekil 3.12 Rifosine antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.13 Rifosin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.14 Rifosin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



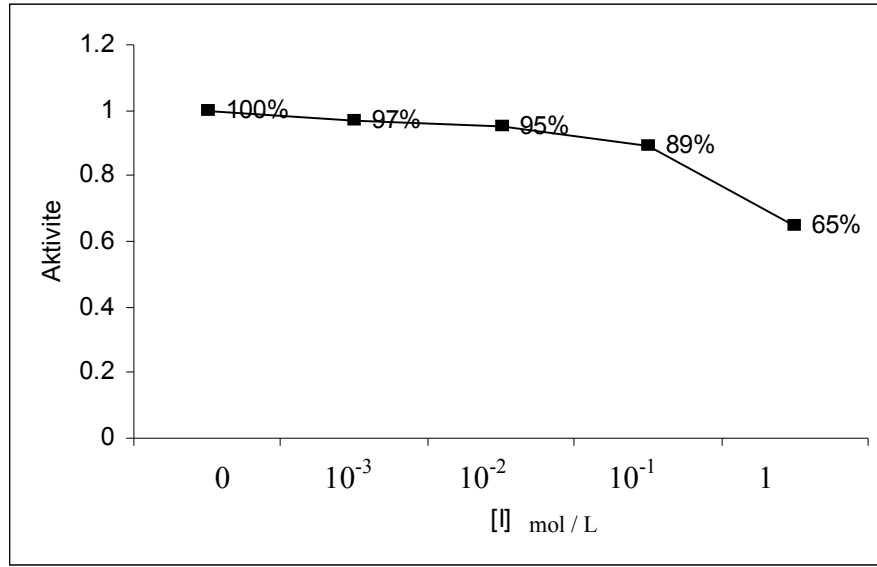
Şekil 3.15 Rifosin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.5 Rifosin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

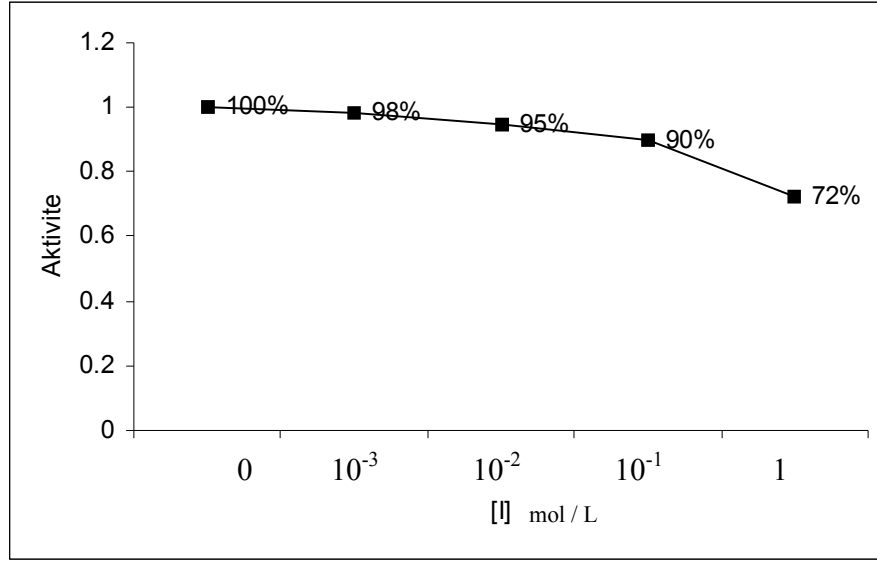
<i><b><math>I_{50}</math> Değerleri M(mol/L)</b></i>			
<b>CA-I</b>	<b>CA-II</b>	<b>CA-IX</b>	<b>CA-XII</b>
2,52	1,02	1,27	1,41

#### 3.4.1.4 Sefamezin (Sefazolin sodyum)

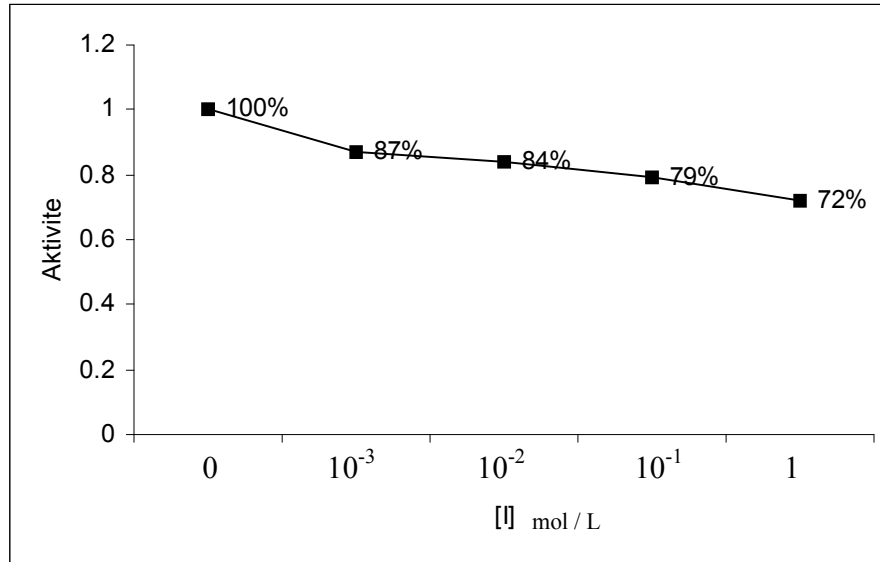
Sefazolin sodyum bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisit etki gösteren bir sefalosporindir. Sefazolin sodyum enjeksiyondan sonra kanda hızla yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Böbrek, karaciğer ve akciğer dokularına kolaylıkla geçer. Sefazolin sodyumun % 90'dan fazlası idrarda değişmeden dışarı atılır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.16-3.19'da 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.6'da ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



Şekil 3.16 Sefamezin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

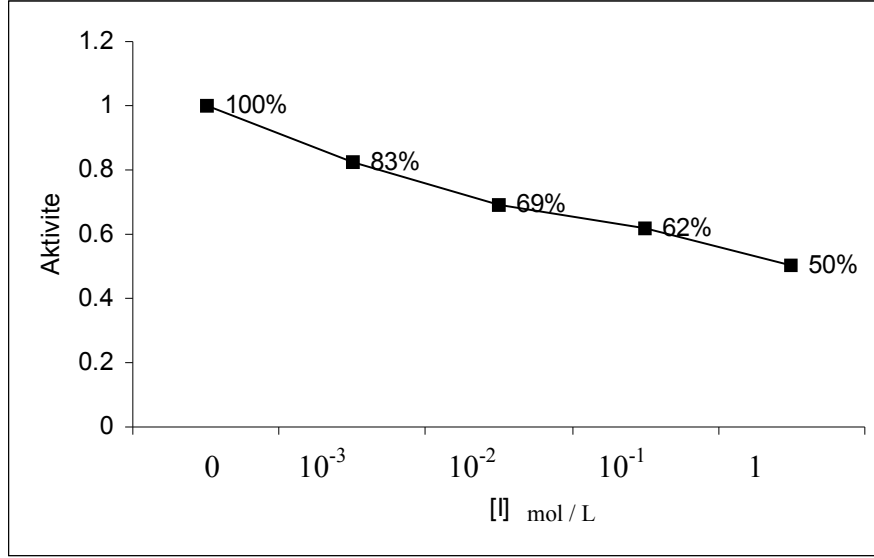


Şekil 3.17 Sefamizin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.18 Sefamizine antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi





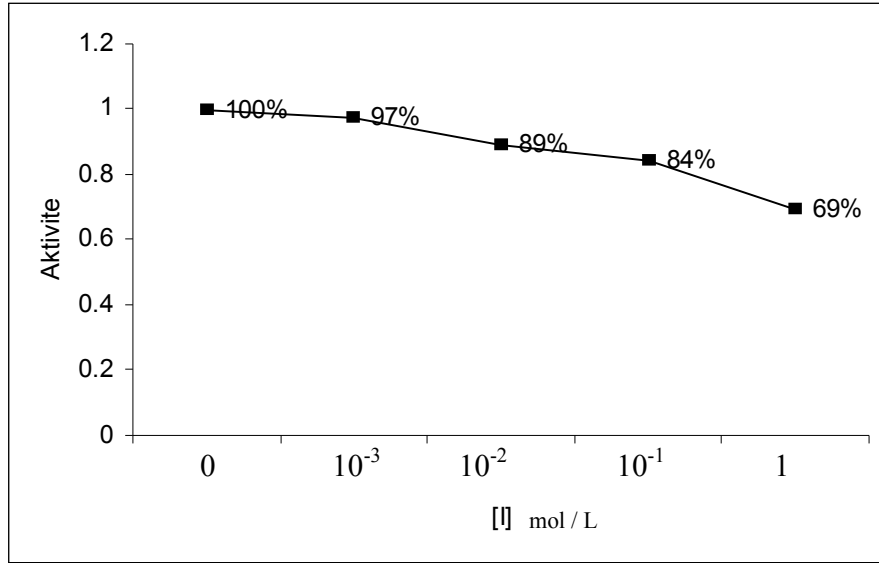
Şekil 3.19 Sefamizine antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.6 Sefamizine antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

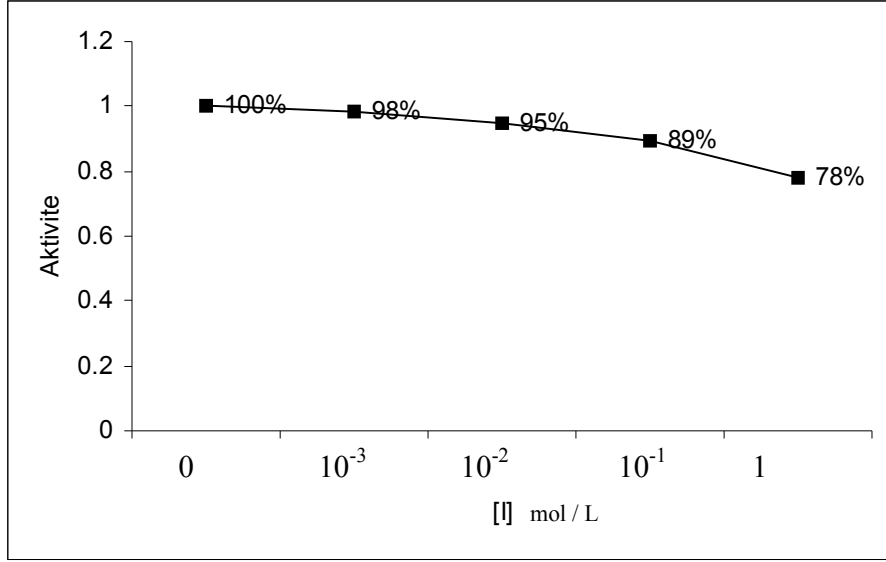
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
3,58	3,08	1,54	2,17

### 3.4.1.5 Gentamisin Sülfat

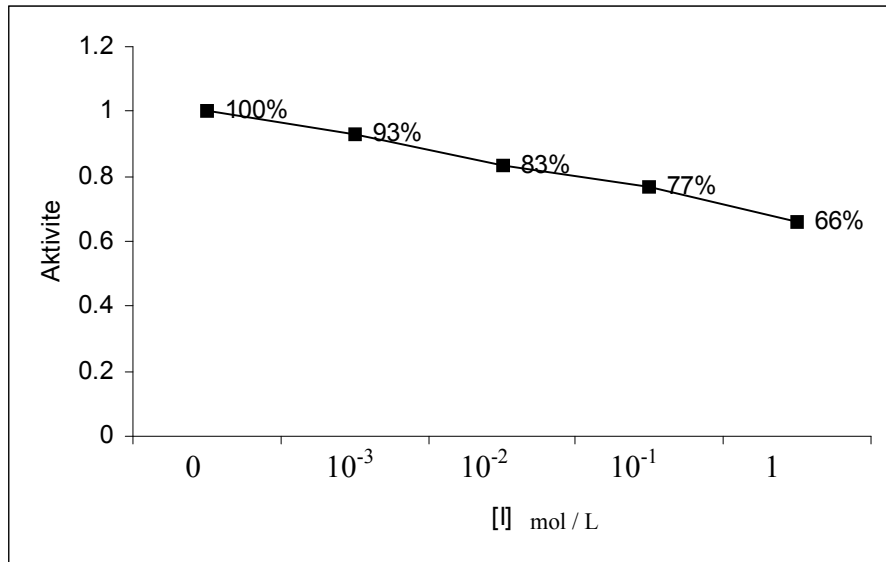
Gentamisin, bir aktinomiset olan *Mikromonospora purpurea*'dan elde edilen, duyarlı bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bakterisid etkili bir aminoglikozid antibiyotığıdır. Gentamisin hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotikler ile kombine kullanıldığı zaman D grubu streptokok suşları üzerinde sinerjik bir etki göstermektedir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.20-3.23'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.7'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



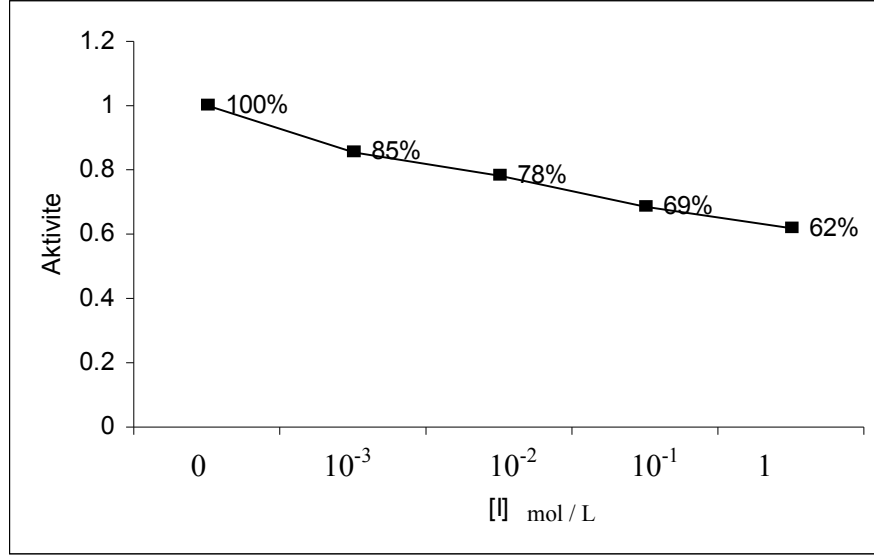
Şekil 3.20 Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.21 Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.22 Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



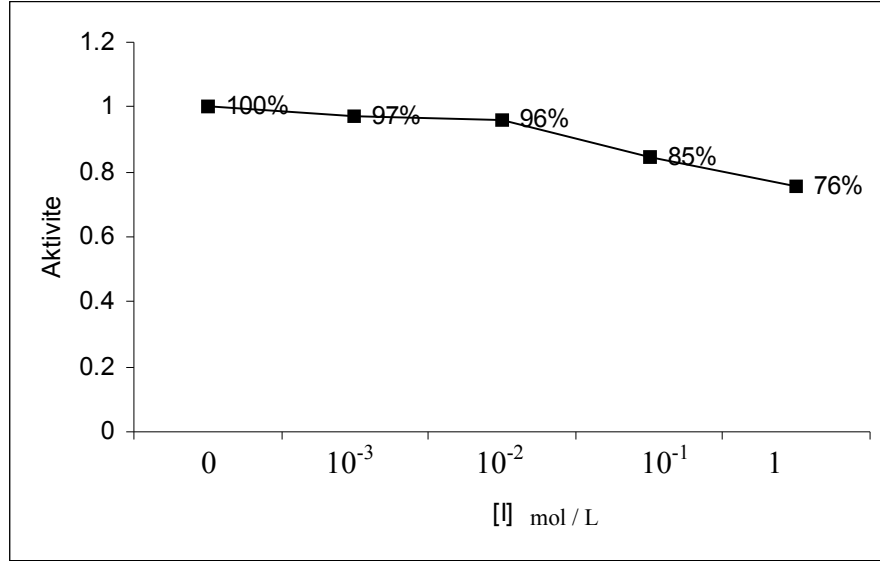
Şekil 3.23 Genta 80 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.7 Gentamisin sülfat antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

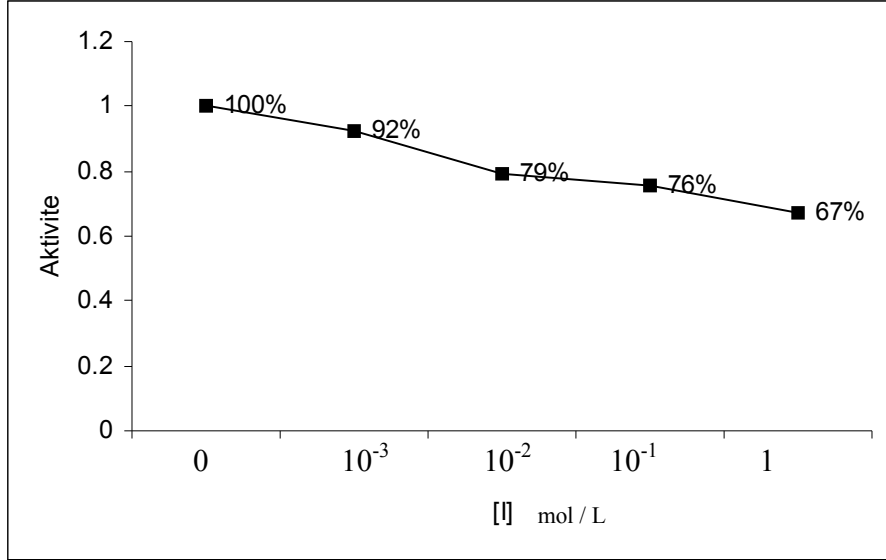
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
2,35	2,53	2,16	3,16

### 3.4.1.6 Klindaver (Klindamisin fosfat)

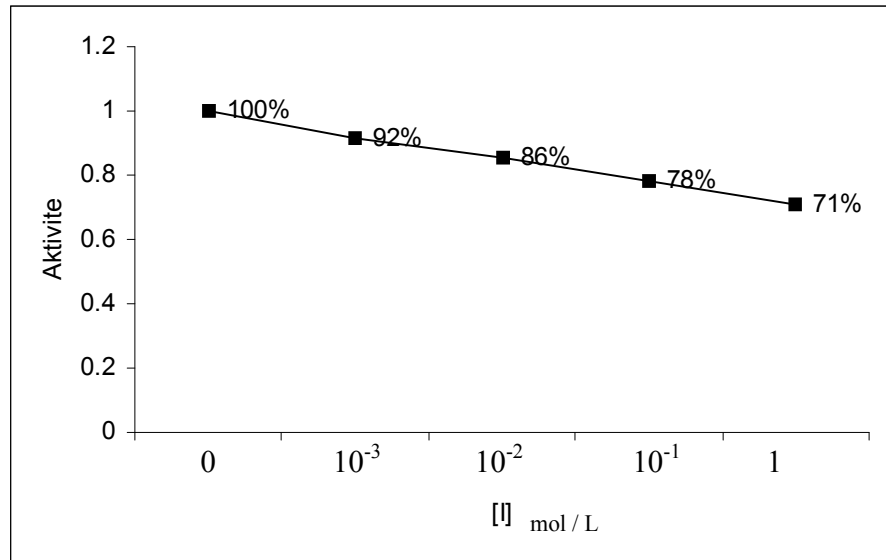
Klindamisin fosfat, *in vivo* koşullarda hızla hidroliz olarak antibakteriyel etkiye sahip klindamisine dönüşür. Klindamisin, makrolidlere benzer şekilde bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanarak, protein sentezinin ilk aşamasını inhibe eder. Temel olarak bakteriyostatik olmakla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda duyarlı suşlara karşı bakterisid etki gösterir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.24-3.27’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.8’de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



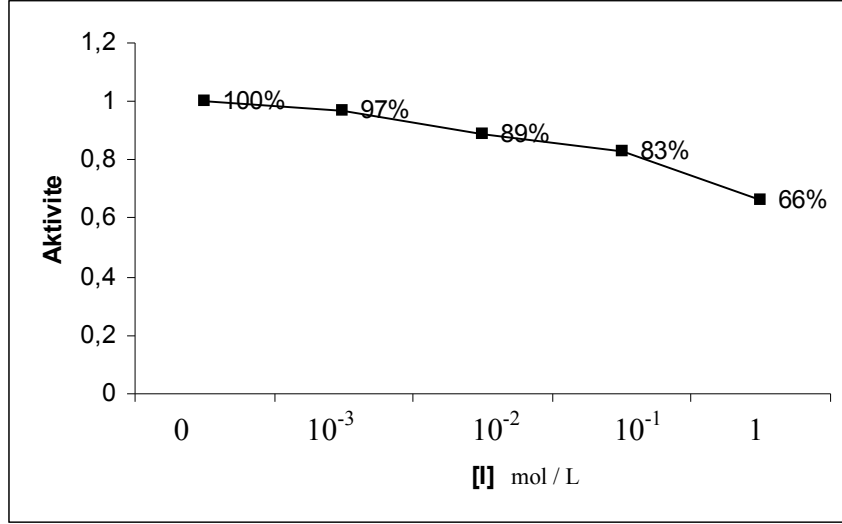
Şekil 3.24 Klindaver 60 mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.25 Klindaver 600 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.26 Klindaver 600 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



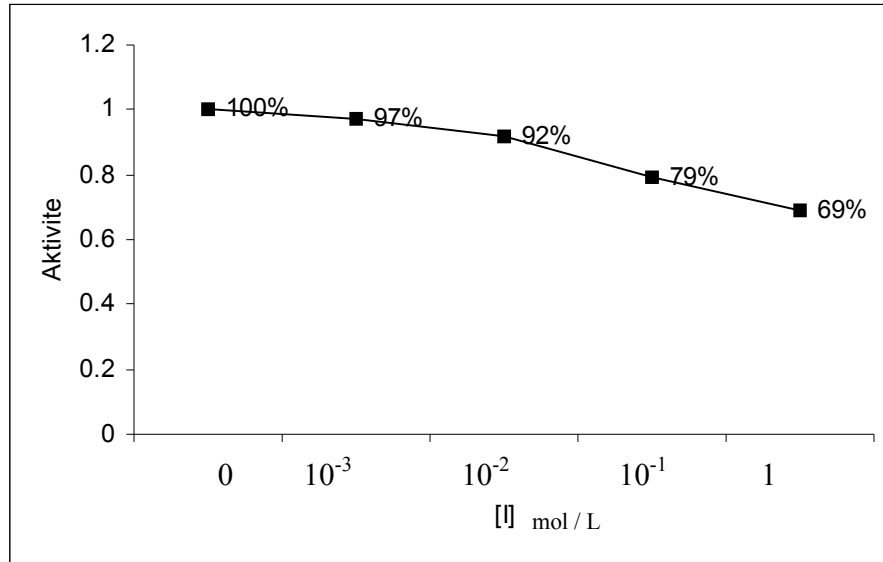
Şekil 3.27 Klindaver 600 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.8 Klindamisin fosfat antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
3,41	1,89	3,56	2,92

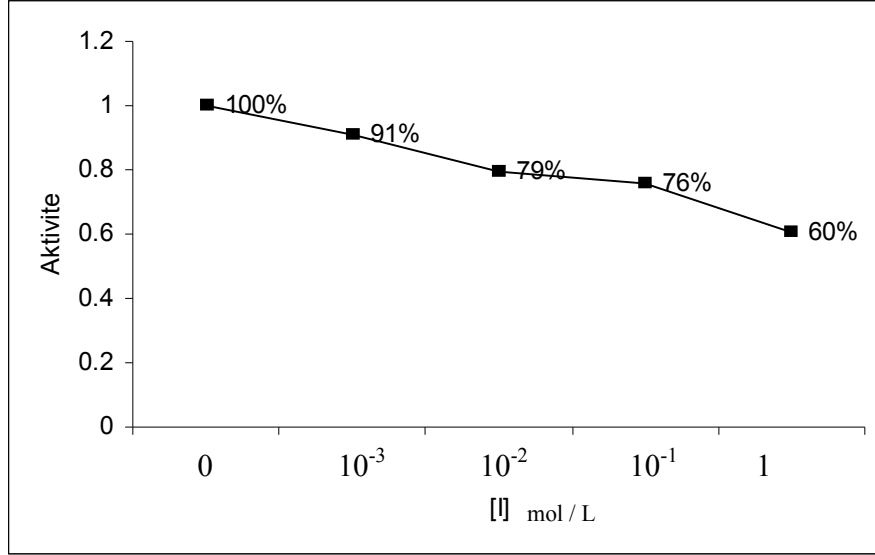
### 3.4.1.7 Avaloks (Moksiloksasin)

Moksiloksasin geniş spektrumlu aktiviteye sahip yeni bir florokinolon antibakteriyel ajanıdır. Gram pozitif bakterilerden staphylococci, streptococci, enterococci bakteri zincirlerini inhibe eder. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.28-3.31’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.9’da ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.

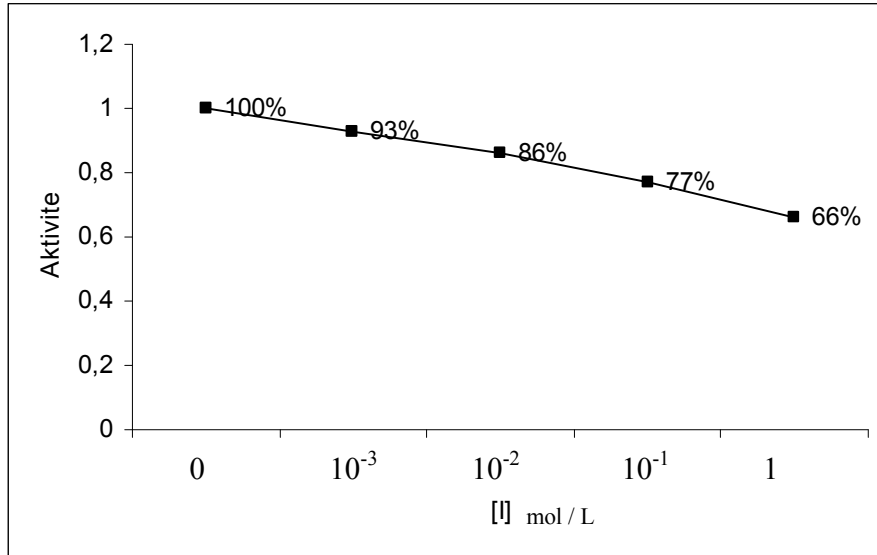


Şekil 3.28 Avaloks 400mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

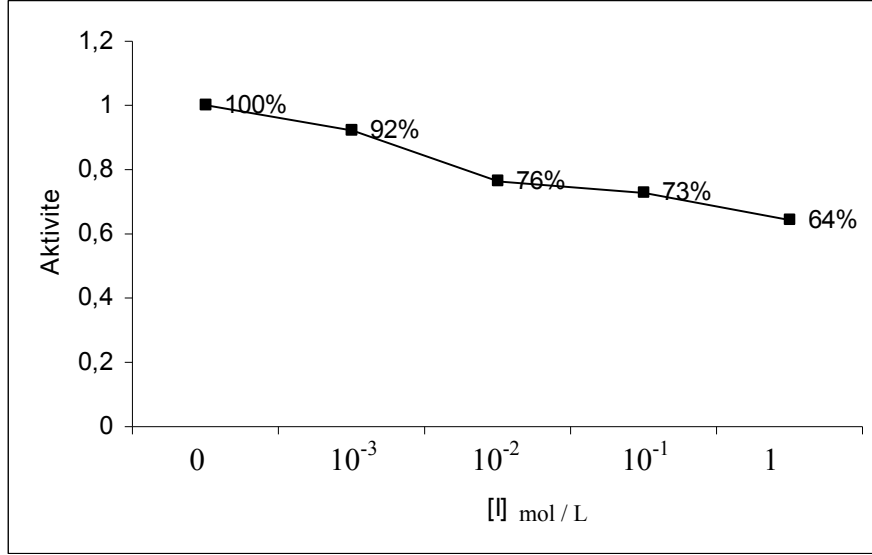




Şekil 3.29 Avaloks 400 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.30 Avaloks 400 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



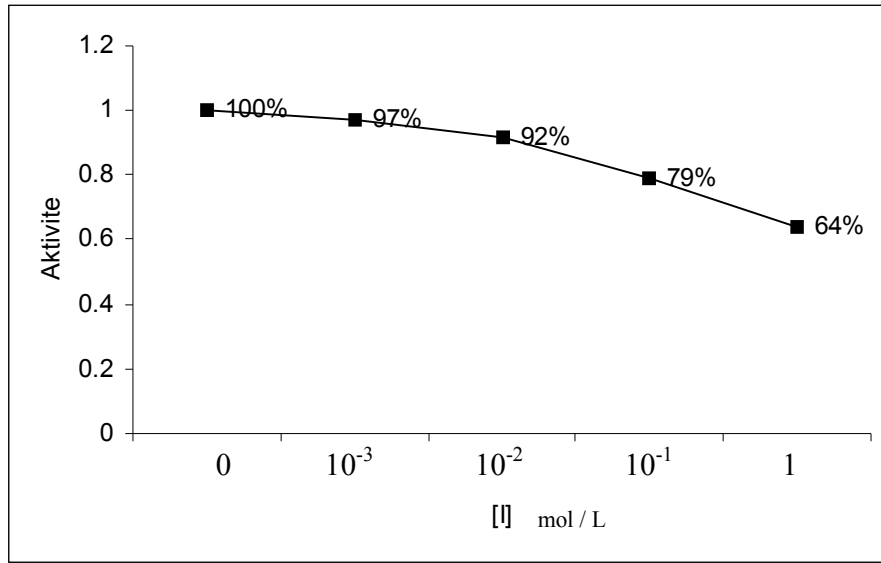
Şekil 3.31 Avaloks 400 mg antibiyotığının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.9 Moksiloksasin antibiyotığının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

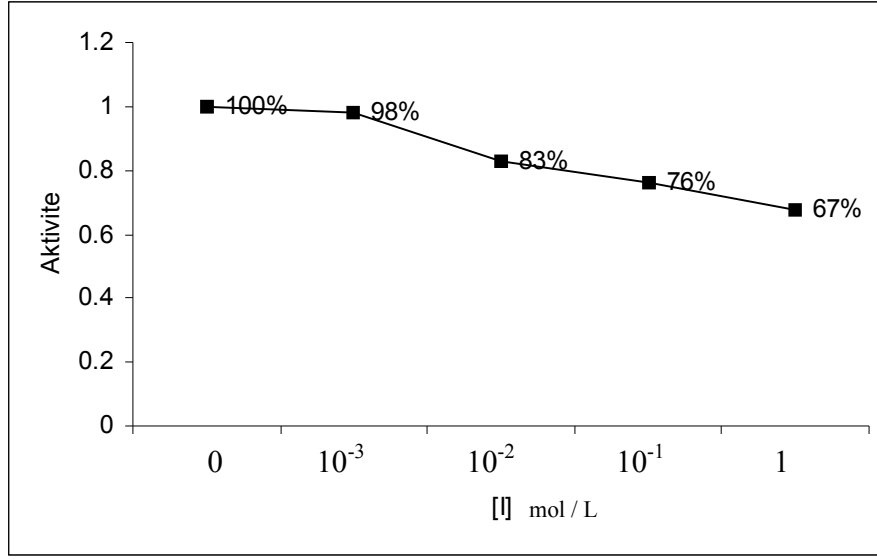
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
2,37	2,60	2,70	1,60

### 3.4.1.8 Kerafloks

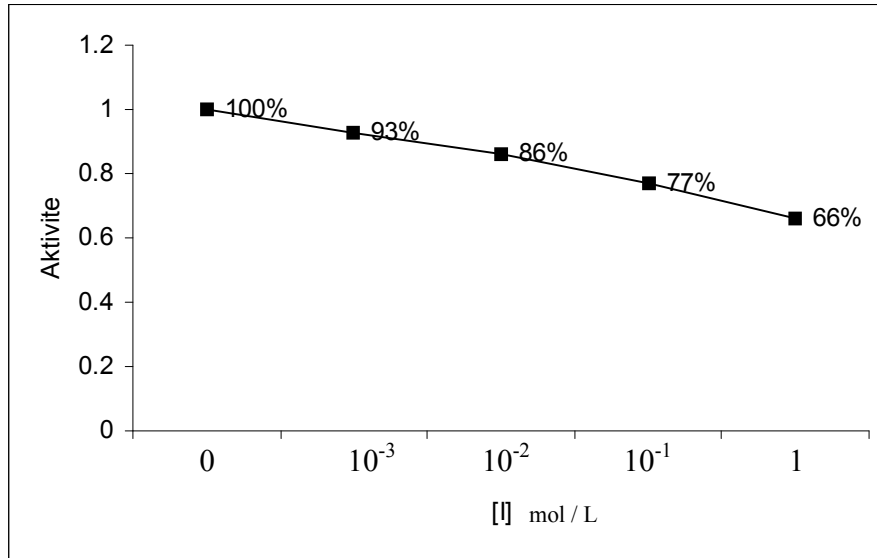
Kinolon grubundan olan Prurifloxacin hücrede DNA-Giraz inhibitörü olarak çalışır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.32-3.35’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.10’da ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



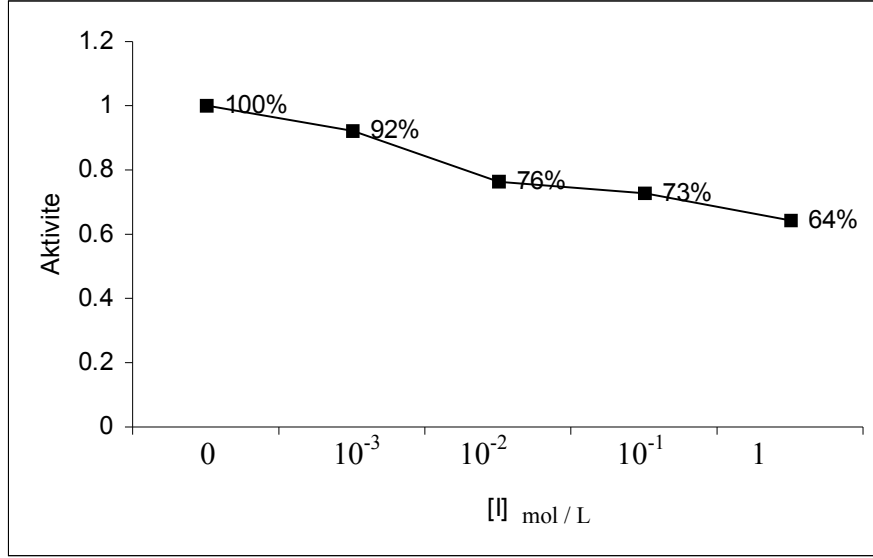
Şekil 3.32 Kerafloks 600mg antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.33 Kerafloks 600 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.34 Kerafloks 600 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



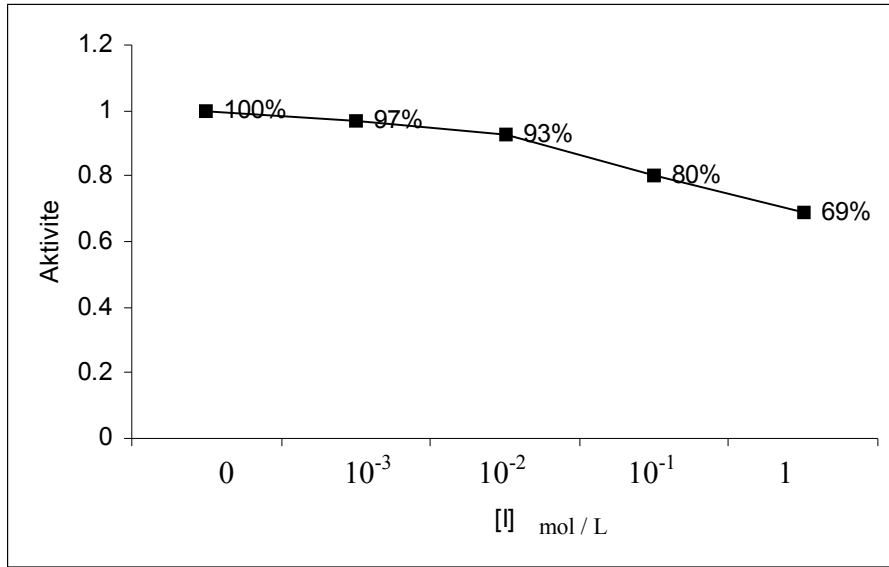
Şekil 3.35 Kerafloks 600 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.10 Kerafloks antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

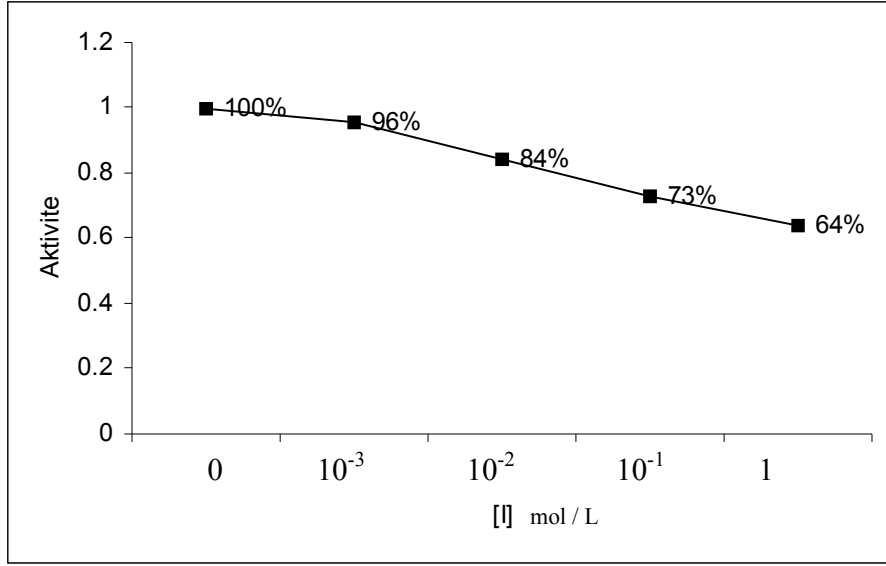
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
2,86	4,81	1,83	2,87

### 3.4.1.9 Klasid(Klaritromisin)

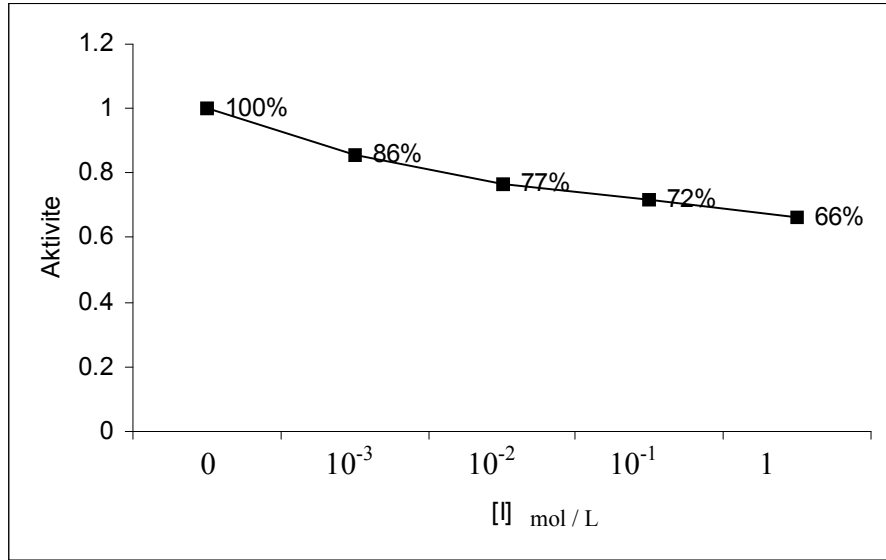
Klaritromisin bir semi-sentetik makrolid antibiyotiktir. Klaritromisin ve metaboliti 14-OH klaritromisin vücut dokularına ve sıvılarına kolayca dağılır. Yüksek intraselüler konsantrasyonundan dolayı, doku konsantrasyonları, serum konsantrasyonlarından daha yüksektir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.36-3.39'da 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.11'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



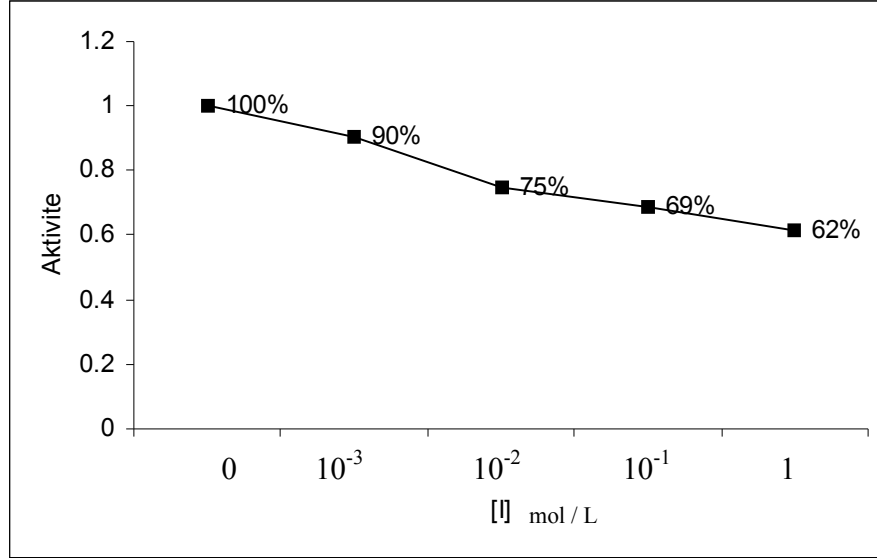
Şekil 3.36 Klasid 500mg antibiyotığının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.37 Klasid 500 mg antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.38 Klasid 500 mg antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.39 Klasid 500 mg antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

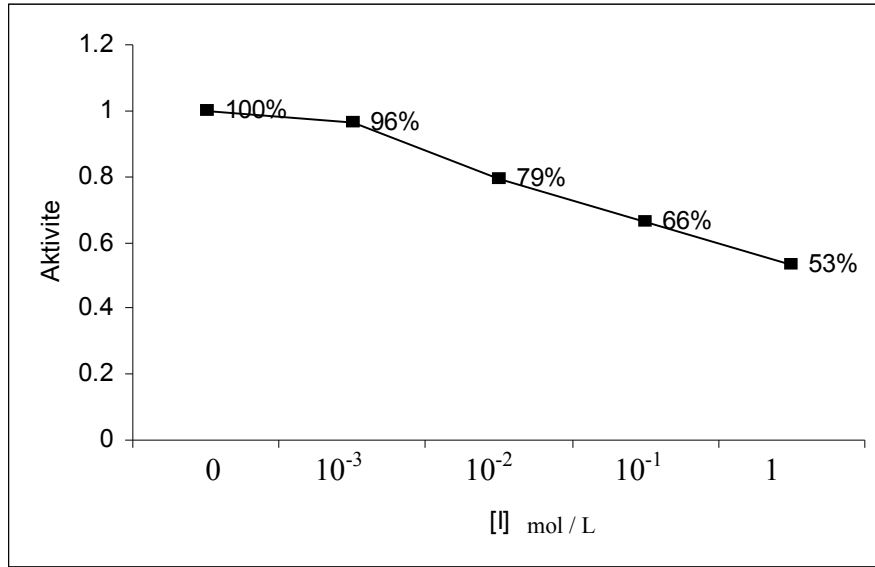
Çizelge 3.11 Klasid 500 mg antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
3,52	2,53	2,55	2,47

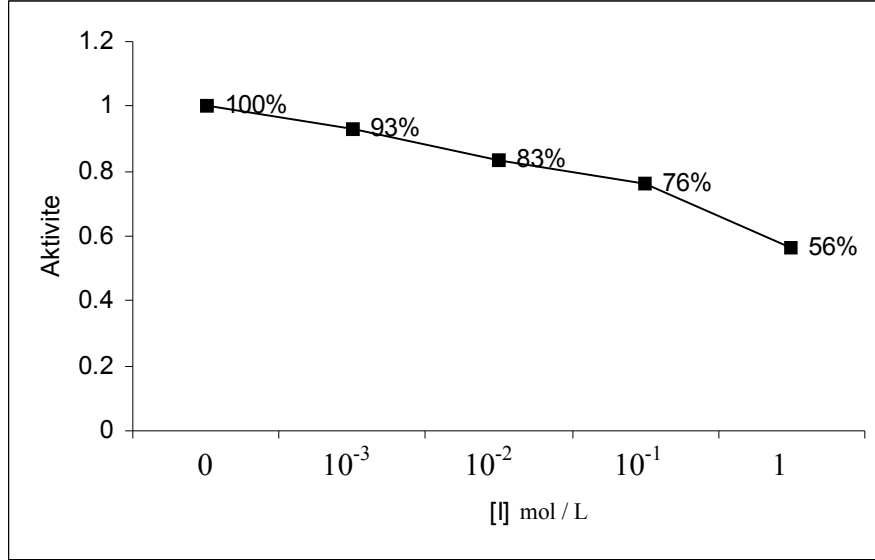


### 3.4.1.10 Rozamisin

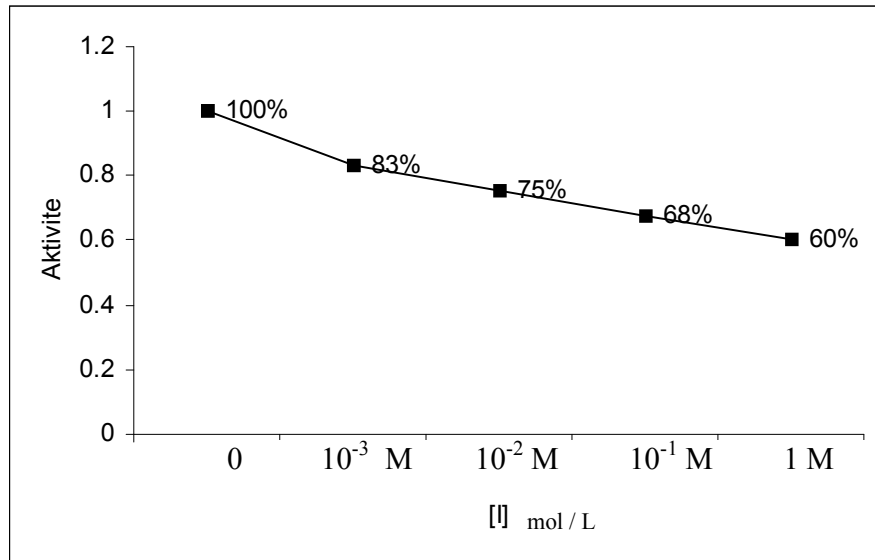
Rozamisin, *Micromonospora rosaria* türetilmiş makrolid bir antibiyotiktir. Eritromisin ile kimyasal ve biyolojik özellikleri paylaşır. Rosamicin bakteriyostatik olup, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, enterococci, viridans streptococci gibi bakteri zincirlerini inhibe eder. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.40-3.43'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.12'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



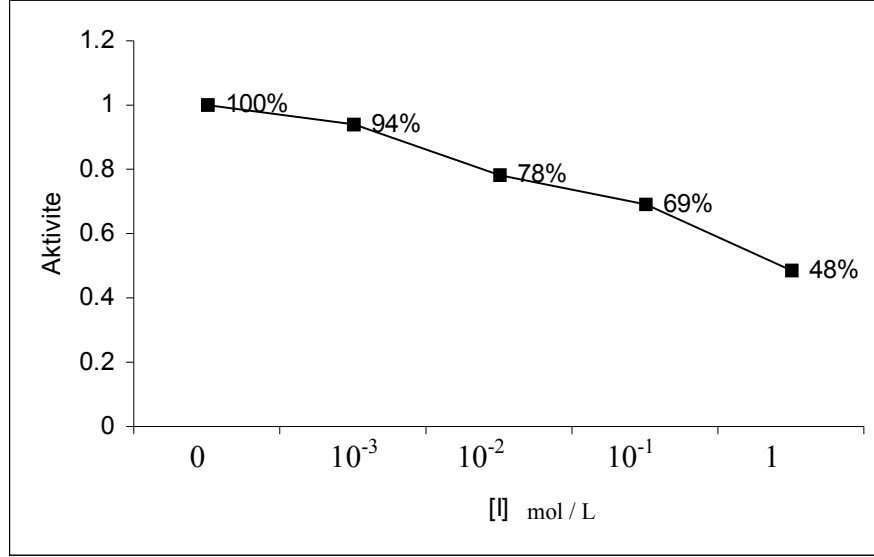
Şekil 3.40 Rozamisin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.41 Rozamisin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.42 Rozamisin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



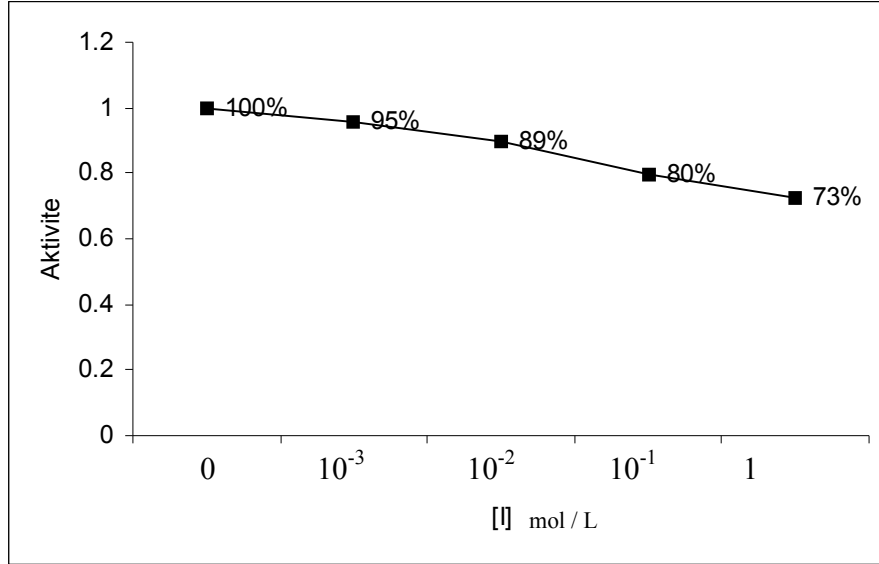
Şekil 3.43 Rozamisin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.12 Rozamisin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

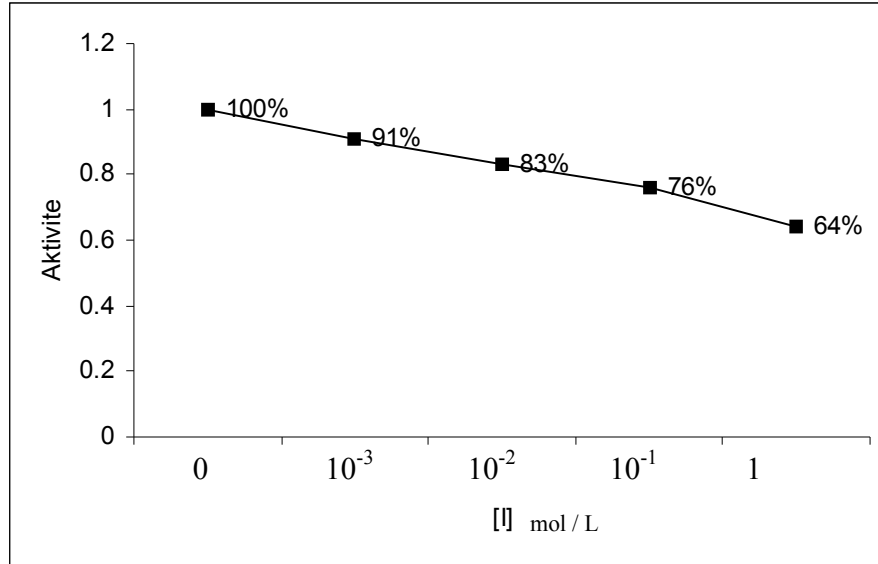
<i><b><math>I_{50}</math> Değerleri M(mol/L)</b></i>			
<b>CA-I</b>	<b>CA-II</b>	<b>CA-IX</b>	<b>CA-XII</b>
2,27	0,92	1,23	1,28

### 3.4.1.11 Baktrim

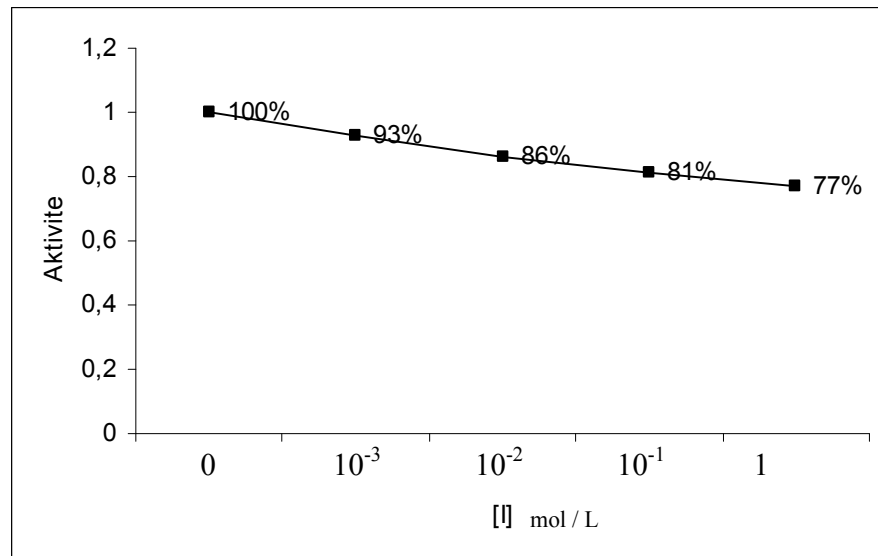
Baktrim, trimethoprim ve sulfamethoxazole'den türemiş sentetik bir antibiyotiktir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.44-3.47'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.13'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



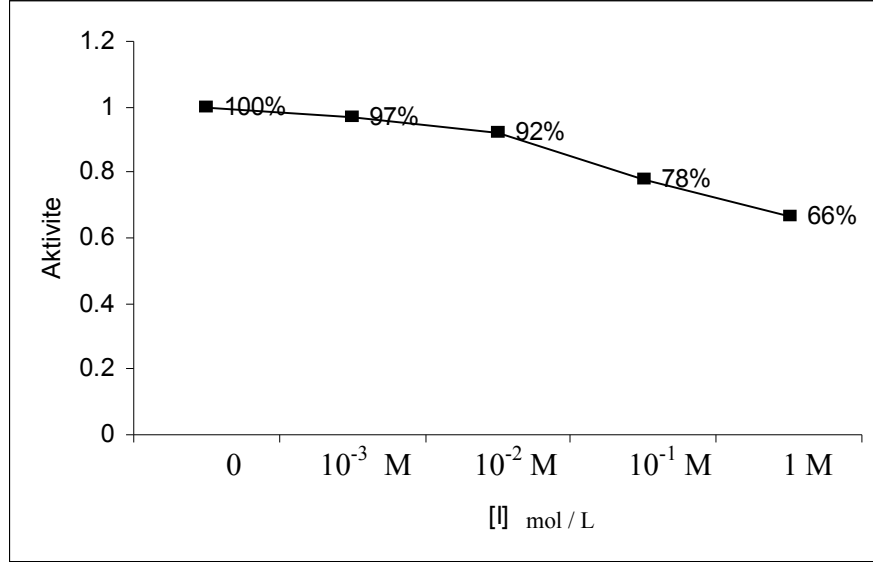
Şekil 3.44 Baktrim antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.45 Baktrim antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.46 Baktrim antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



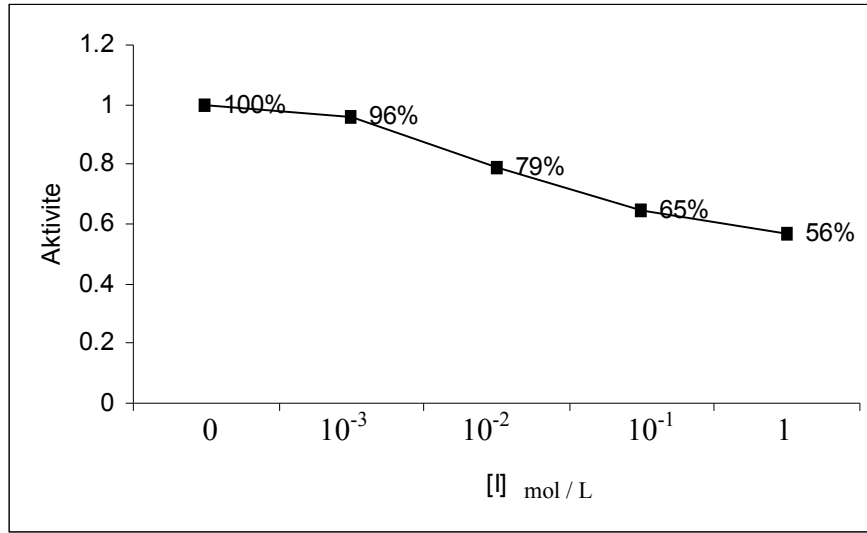
Şekil 3.47 Baktrim antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.13 Baktrim antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

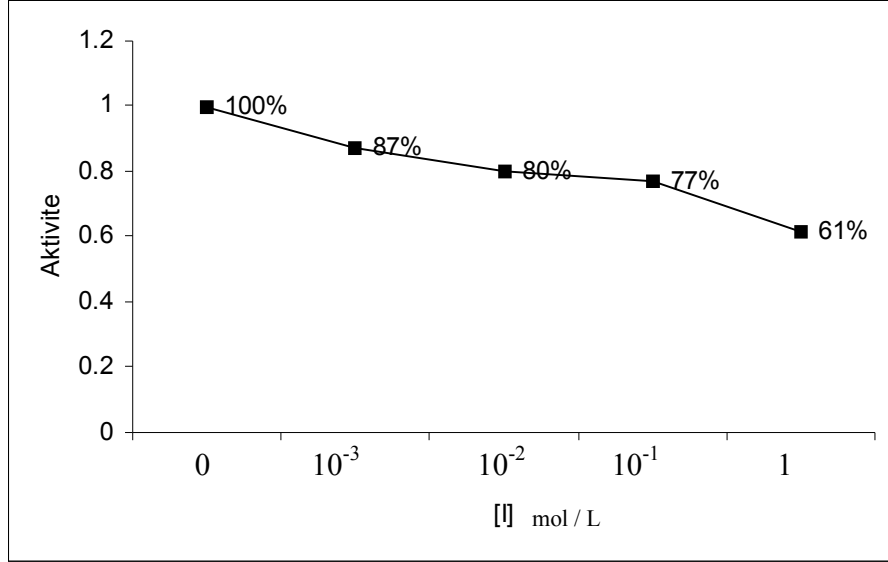
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
7,16	2,25	3,90	2,07

### 3.4.1.12 Amplital ( Sodyum Ampisilin)

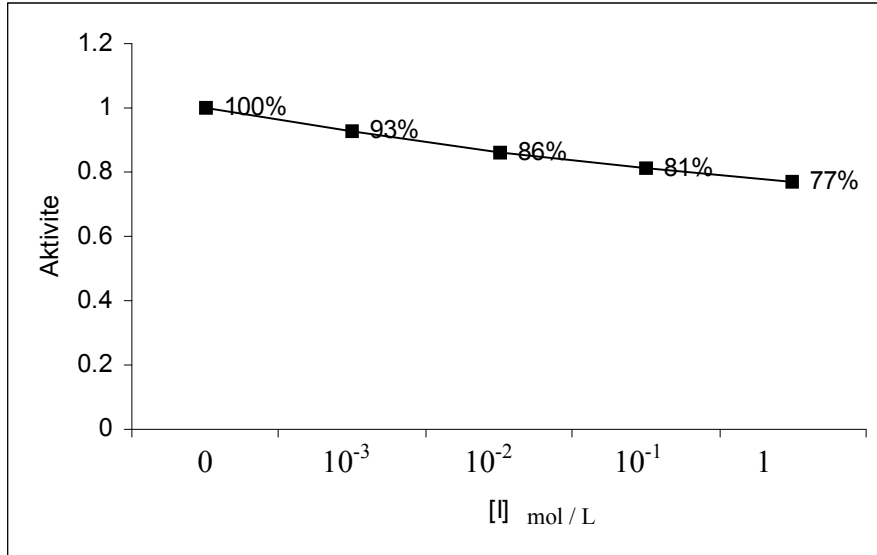
Bir aminopenisilanik asit türevi olan ampisilin geniş bir spektruma sahip olup gram (+) ve gram (-) aerob ve anerob mikroorganizmalara karşı bakterisit etkilidir; bu etkisini bakterilerin hücre duvarı mukopeptit biyosentezini inhibe ederek gösterir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.48-3.51’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.14’de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



Şekil 3.48 Amplital antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

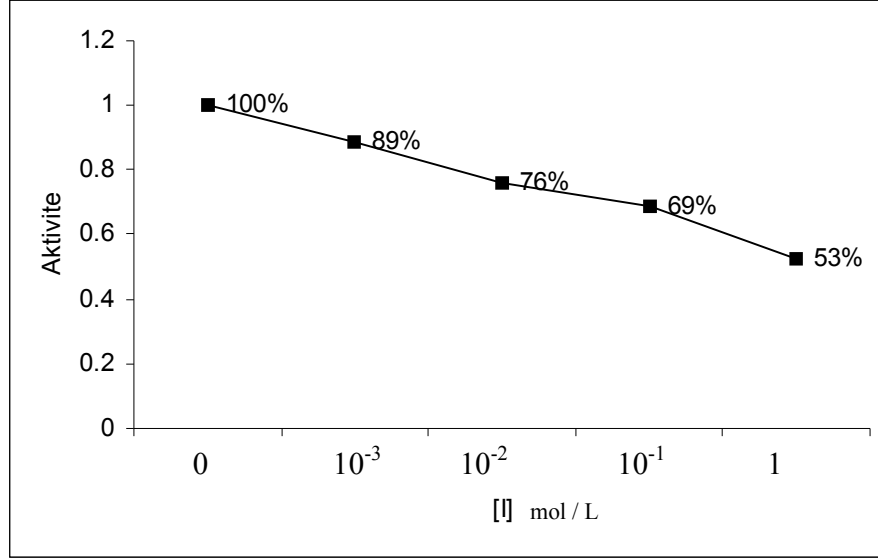


Şekil 3.49 Amplital antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.50 Amplital antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi





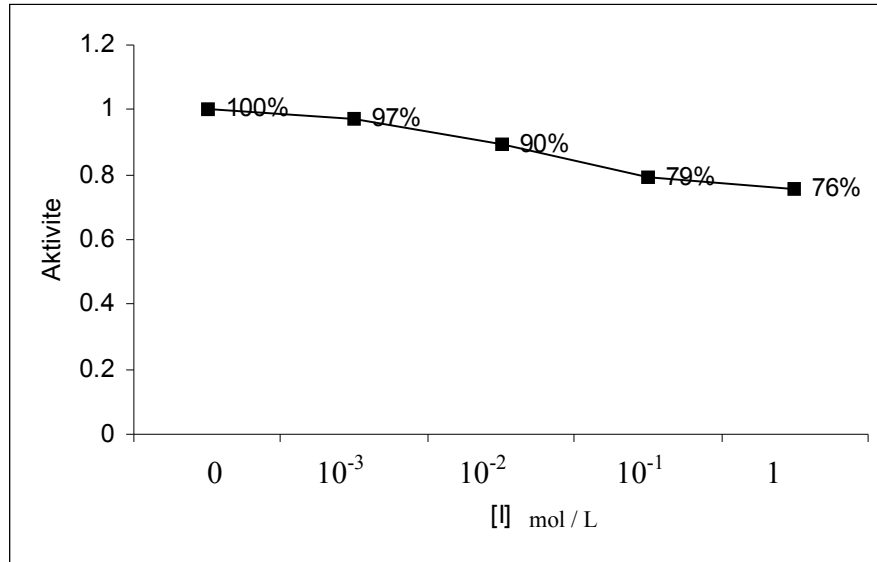
Şekil 3.51 Amplital antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.14 Amplital antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

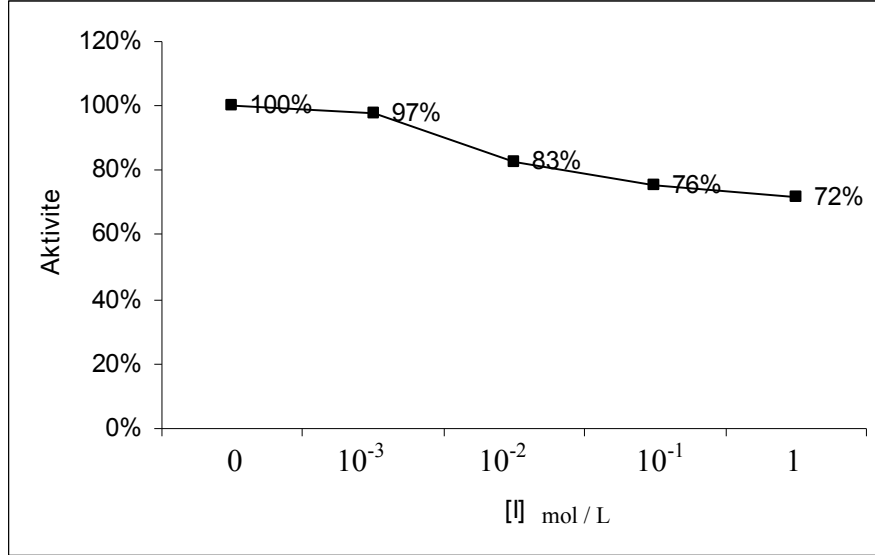
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
1,63	1,14	1,69	1,66

### 3.4.1.13 Aksef (Sefuroksim aksetil)

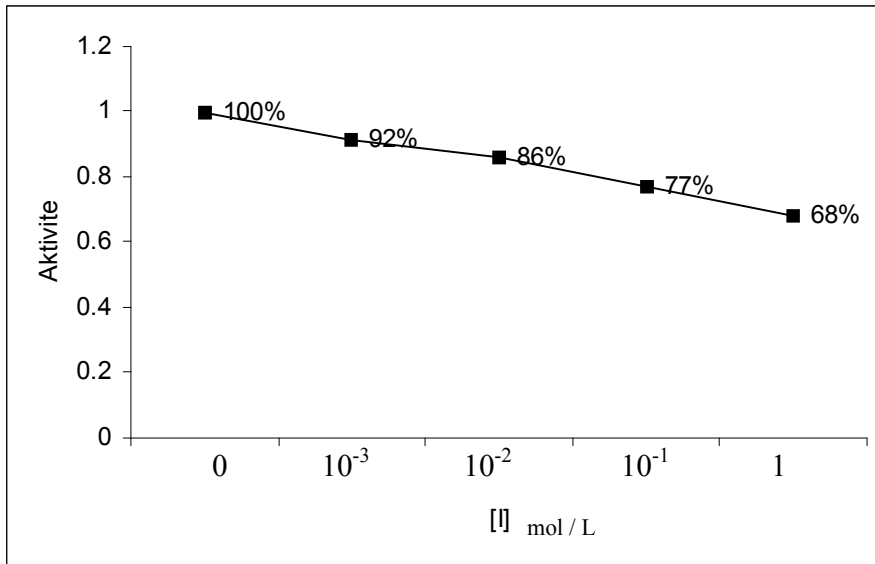
Sefuroksim, beta laktamaz üreten suşlar dahil, sık rastlanılan yaygın patojenlerin çoğuna karşı bakterisid etkili bir antibakteriyel ajandır. Sefuroksim bakteriyel beta laktamazlara karşı iyi bir stabilite gösterir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.52-3.55’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.15’de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



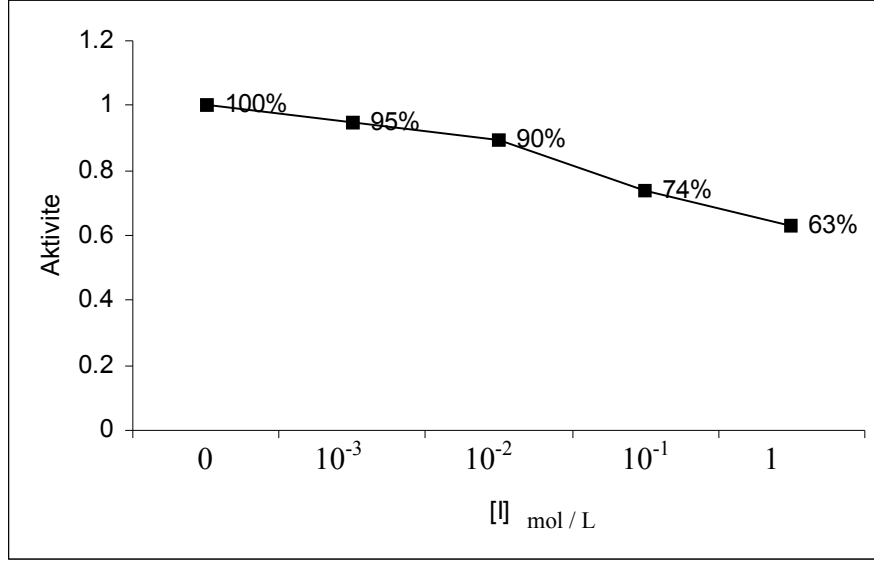
Şekil 3.52 Aksef antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.53 Aksef antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.54 Aksef antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



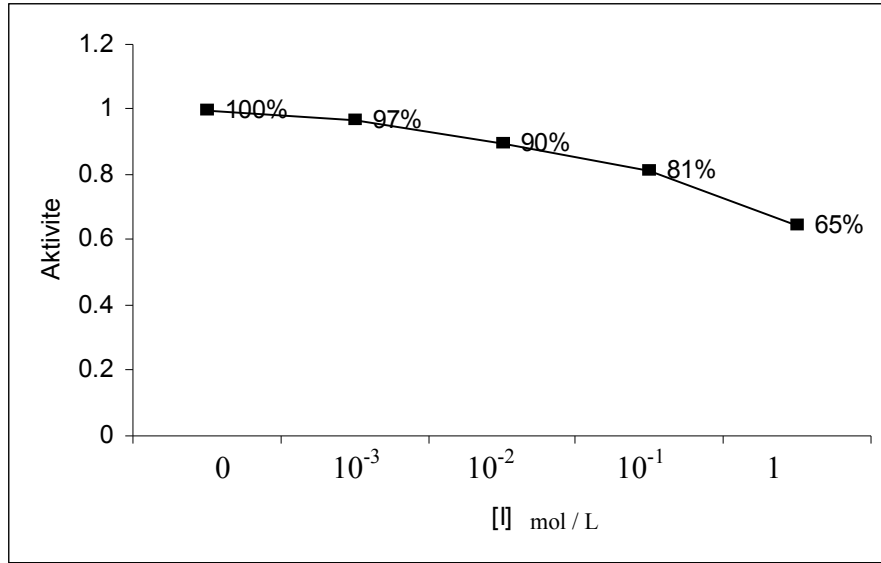
Şekil 3.55 Aksef antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.15 Aksef antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

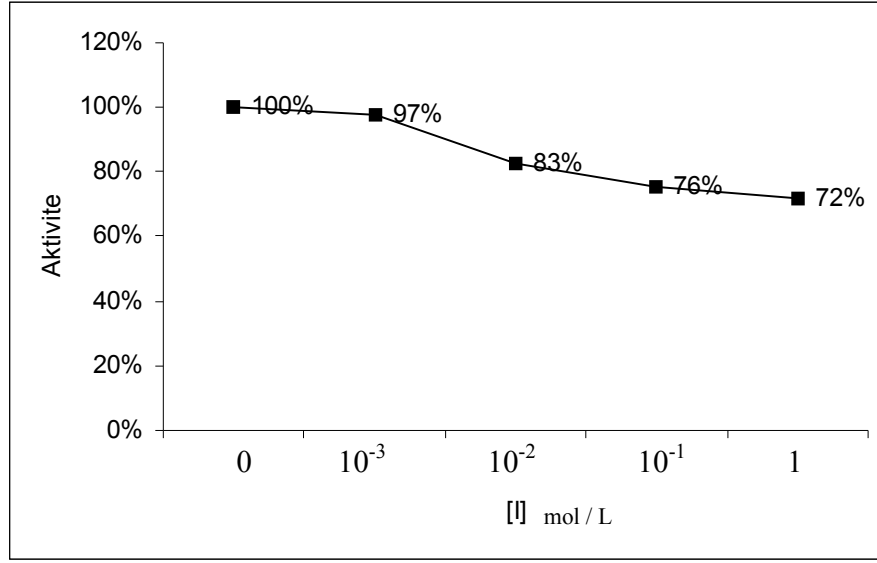
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
2,92	2,12	8,21	5,88

### 3.4.1.14 Amoksilin

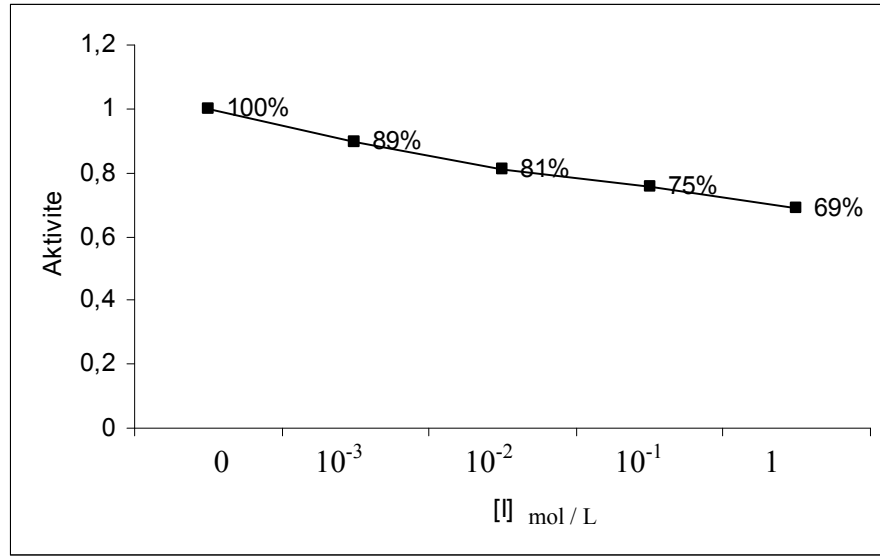
Antibakteriyel spektrumu geniş olan penisilin türevi Amoksilin diğer penisilinlerin etki etmediği E.coli, shigella, influenza gibi mikroorganizmalara karşı da etkilidir. Amoksilin, bakteri hücre duvarının mukopeptid sentezini inhibe ederek bakterisid etki oluşturur. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.56-3.59'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.16'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



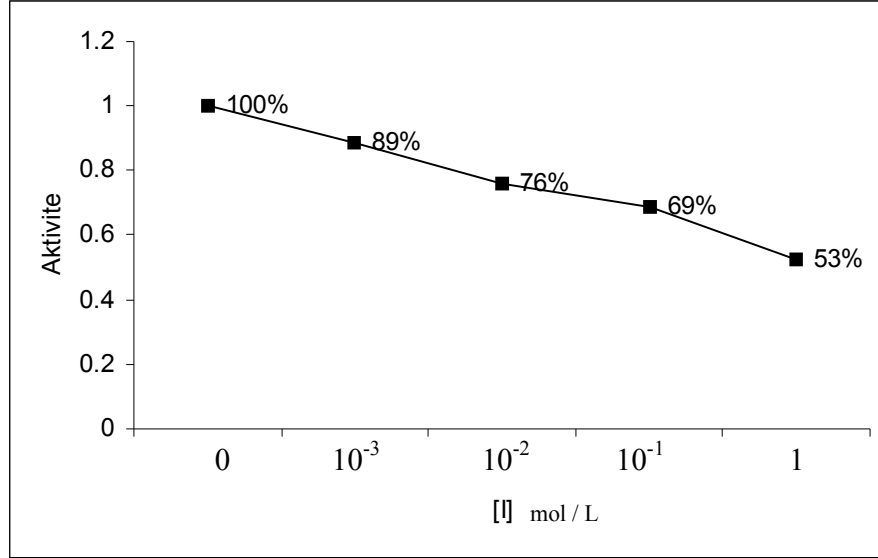
Şekil 3.56 Amoksilin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.57 Amoksilin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.58 Amoksilin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



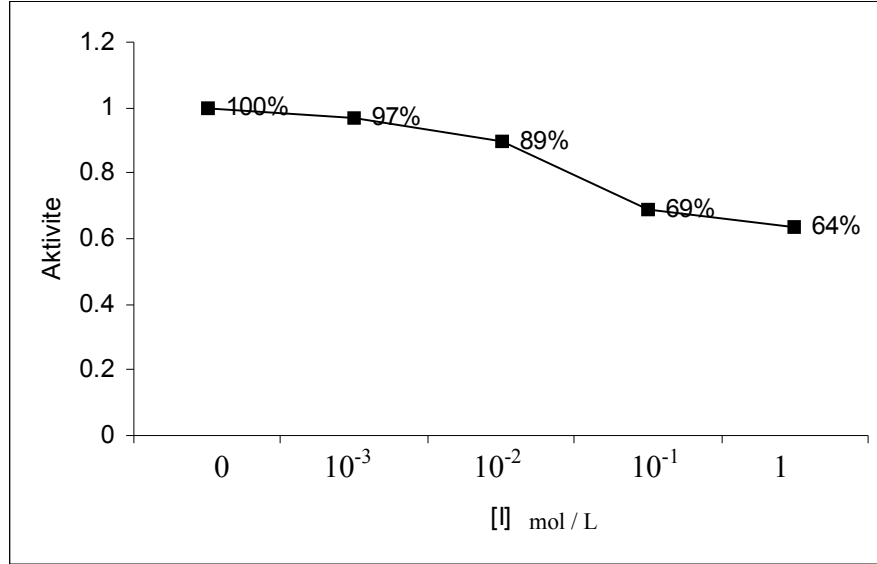
Şekil 3.59 Amoksilin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.16 Amoksilin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i><b><math>I_{50}</math> Değerleri M(mol/L)</b></i>			
<b>CA-I</b>	<b>CA-II</b>	<b>CA-IX</b>	<b>CA-XII</b>
2,92	2,12	8,21	5,88

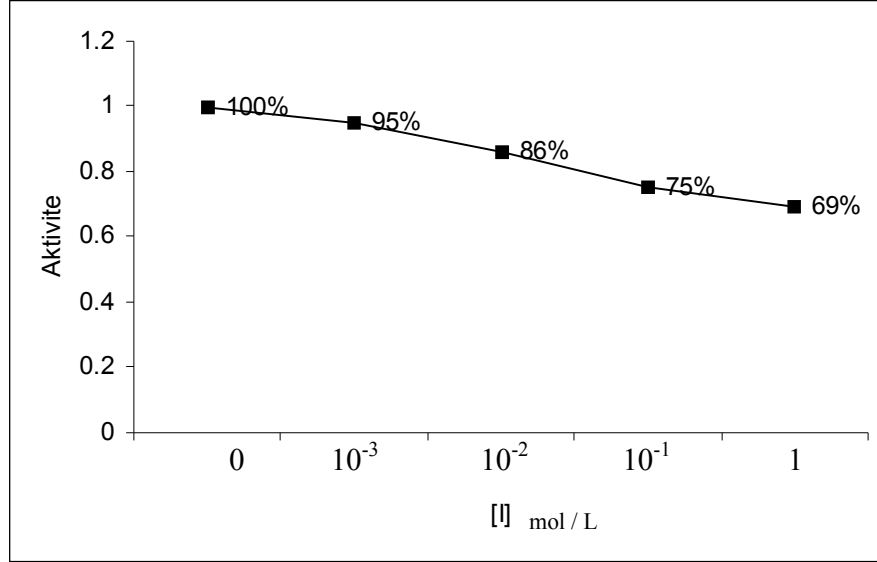
### 3.4.1.15 Siproksin (Siprofloksasin Klorhidrat)

Siprofloksasin kinolon grubunda yeni bir aktif maddedir. Bu grup maddeler jiraz inhibitörleri olarak bilinmektedirler. Siprofloksasin geniş bir bakteri spektrumuna karşı güçlü bir antibakteriyel etkiye sahiptir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu antibiyotik üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.60-3.63'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.17'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.

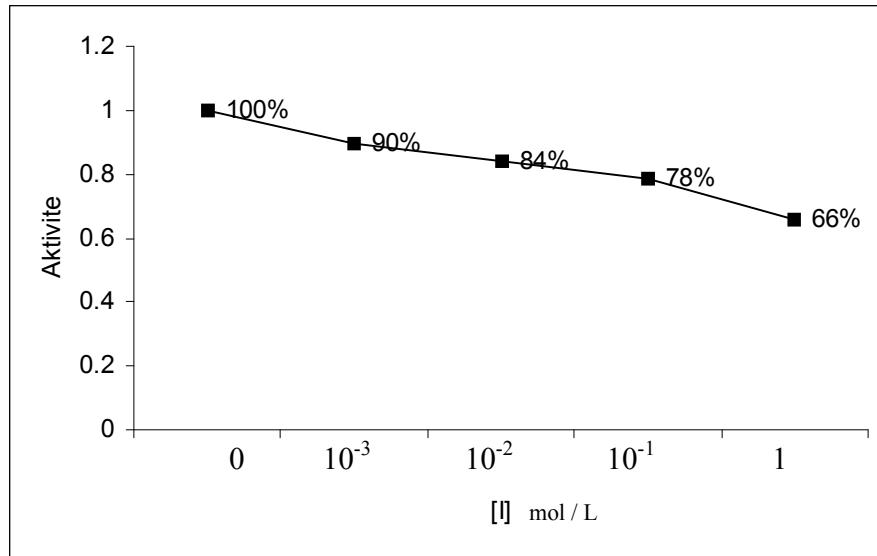


Şekil 3.60 Siproksin antibiyotiğinin HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enziminin üzerindeki inhibisyon etkisi

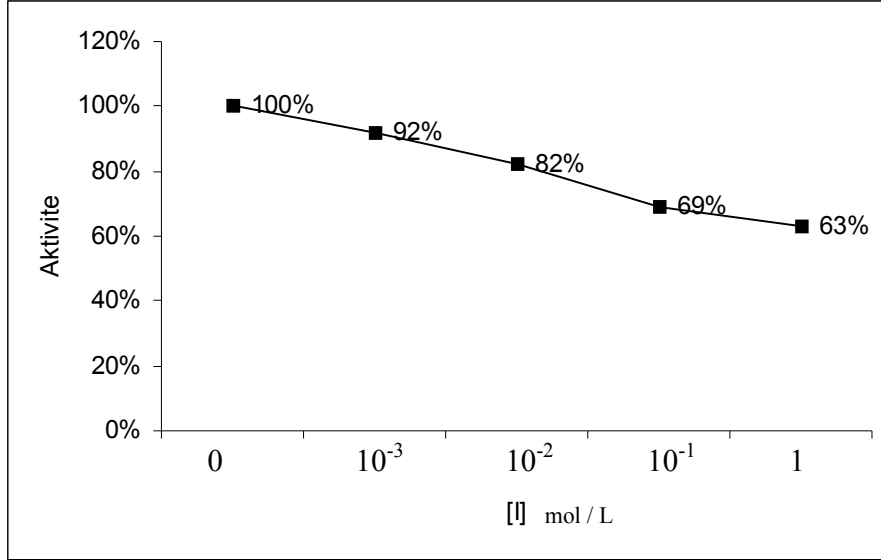




Şekil 3.61 Siproksin antibiyotiğinin HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enziminin üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.62 Siproksin antibiyotiğinin HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.63 Siproksin antibiyotiğinin HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.17 Siproksin antibiyotiğinin CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

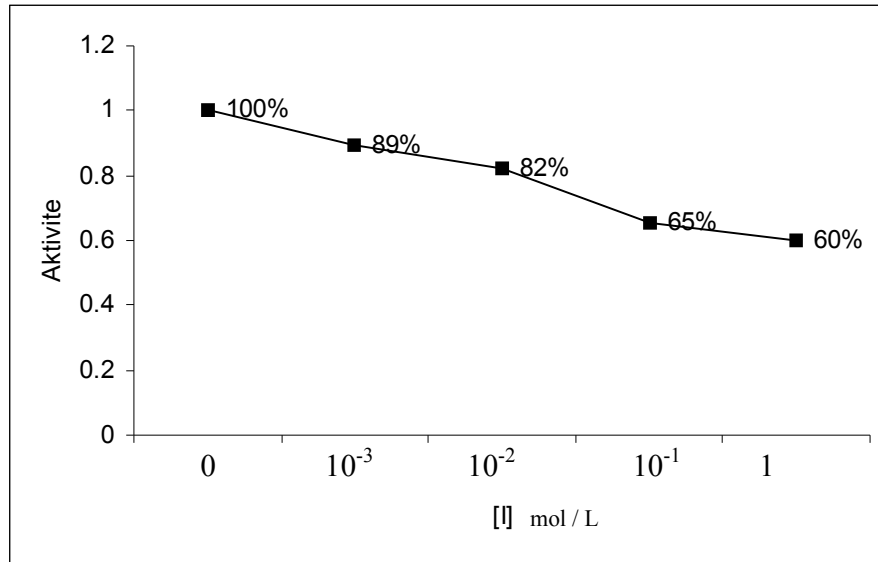
<i><b><math>I_{50}</math> Değerleri M(mol/L)</b></i>			
<b>CA-I</b>	<b>CA-II</b>	<b>CA-IX</b>	<b>CA-XII</b>
2,92	2,12	8,21	5,88

### 3.4.2 Kemoterapi İlaçları

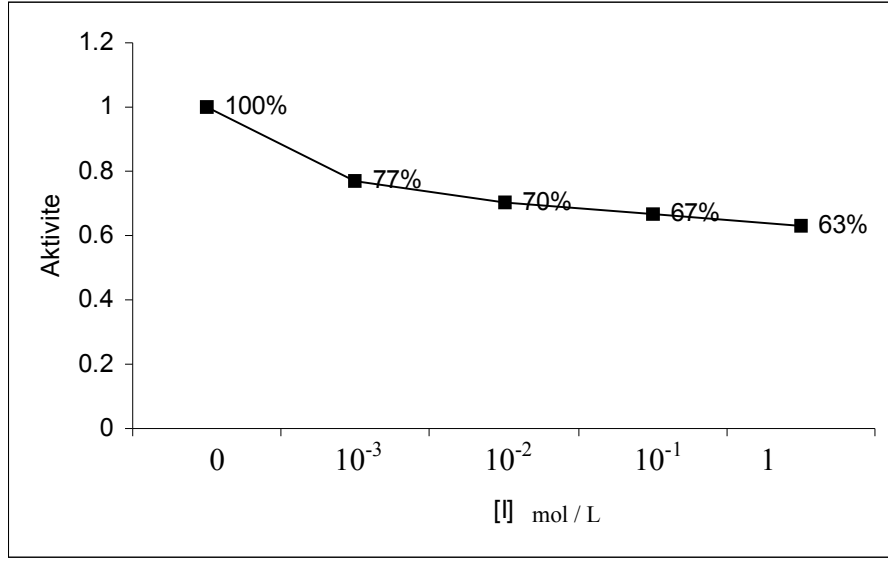
Kemoterapi ilaçlarının tümör ilişkili HCA-IX, HCA-XII izoenzimleri ve sitozolik karbonik anhidraz HCA-I ve HCA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri, Şekil 3.64- Şekil 3.107 grafiklerinde gösterilmektedir.

#### 3.4.2.1 Anzatak

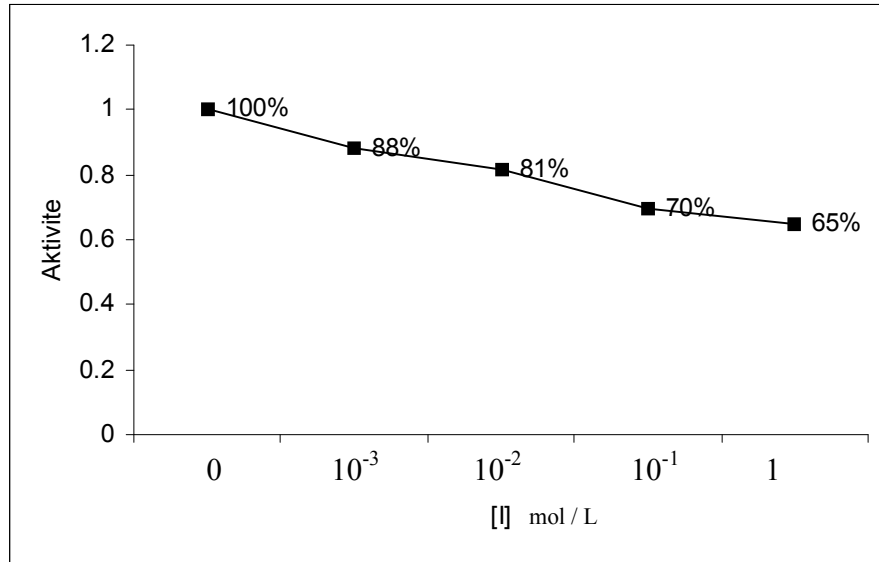
Diğer bir adı da Paklitaksel olan antikanser ilacı Anzatak platin içerikli bir ajandır. Ovaryum kanserinde sıklıkla uygulanır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.64-3.67'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.18'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



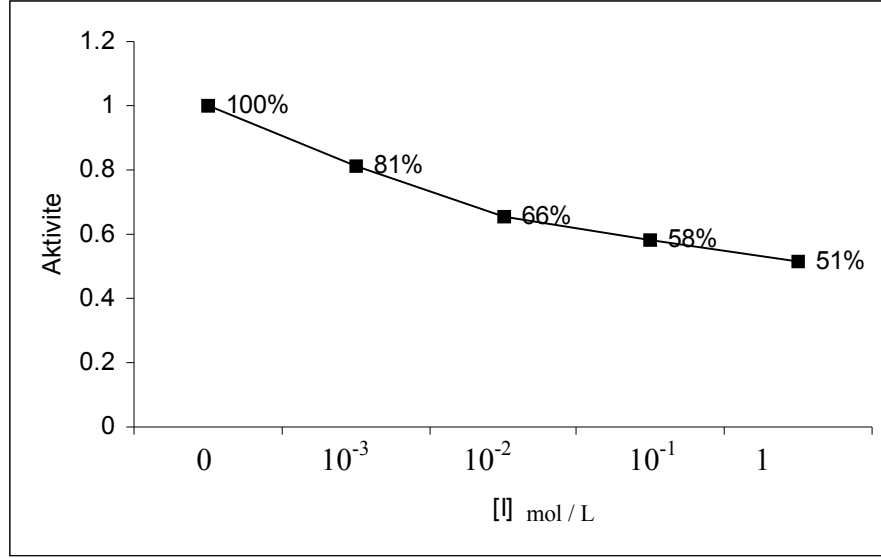
Şekil 3.64 Anzatak kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.65 Anzataks kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.66 Anzataks kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



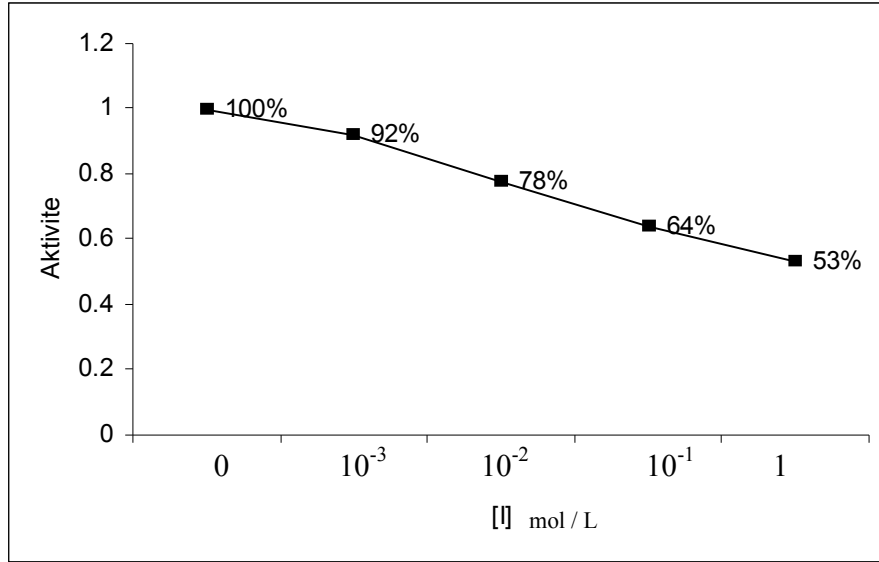
Şekil 3.67 Anzataks kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.18 Anzataks kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

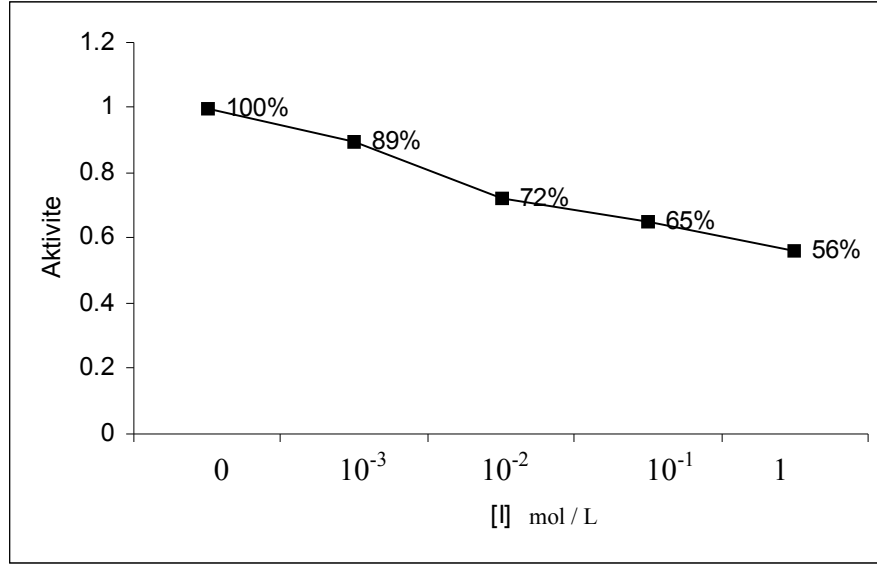
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
3,91	1,16	2,84	4,34

### 3.4.2.2 Metotreksat-Teva

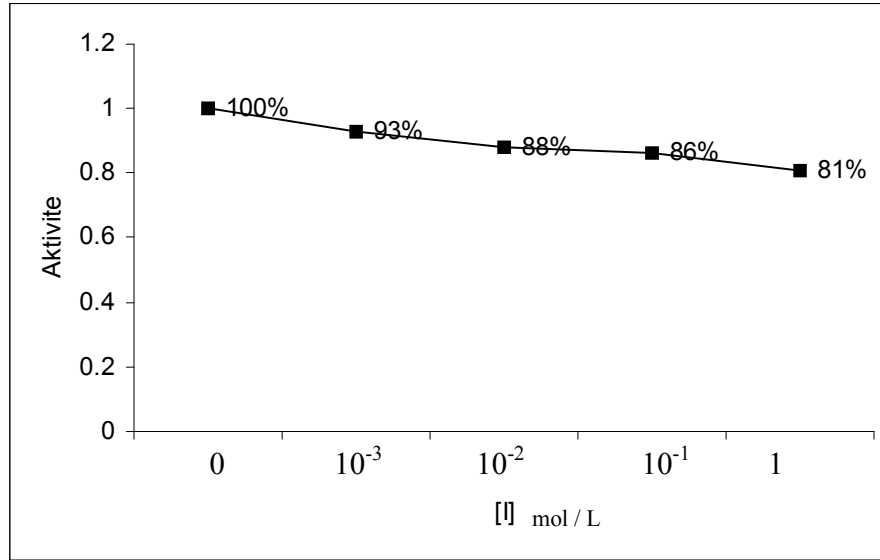
Antineoplastik etkilidir. Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisi ve psöriazisin kemoterapisinde kullanılır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.68-3.71’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.19’da ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



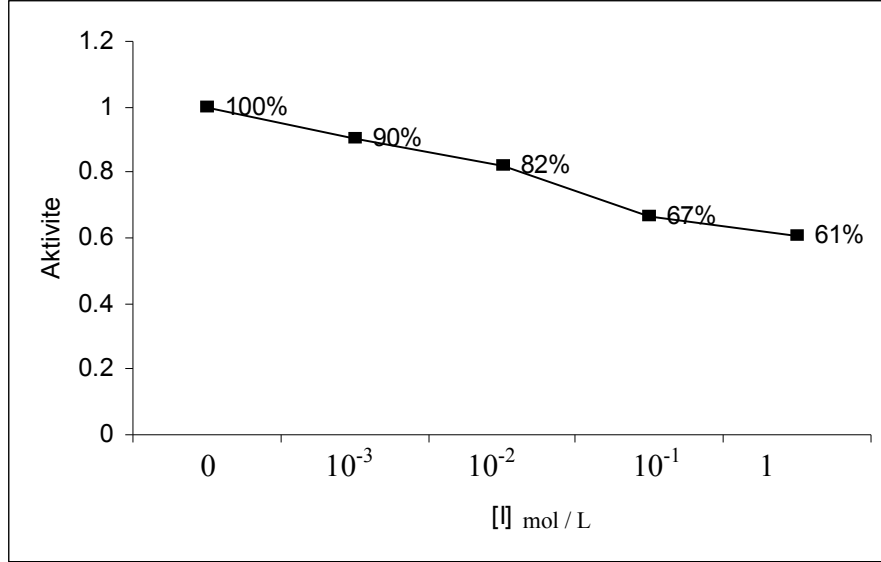
Şekil 3.68 Metotreksat-Teva kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.69 Metotrexat-Teva kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.70 Metotrexat-Teva kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.71 Metotrexat-Teva kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

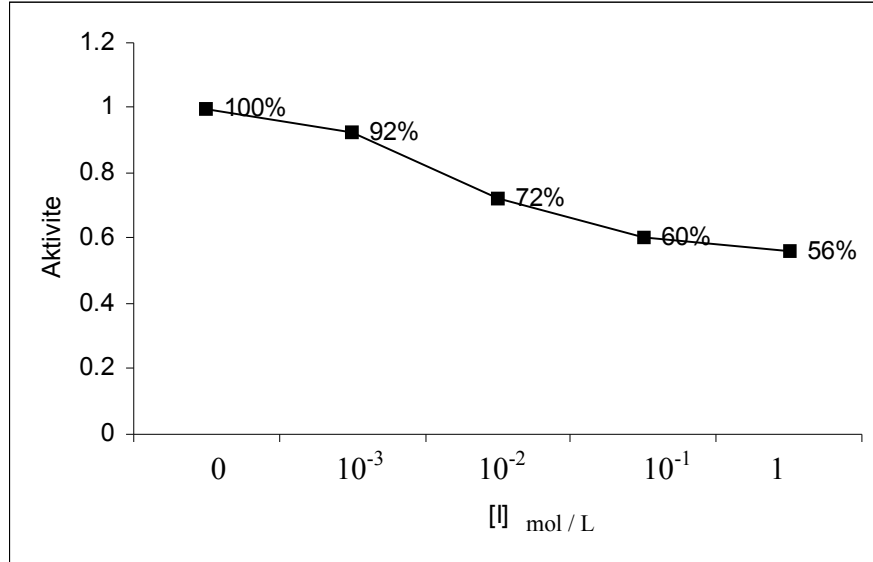
Çizelge 3.19 Metotrexat-Teva kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i><b><math>I_{50}</math> Değerleri M(mol/L)</b></i>			
<b>CA-I</b>	<b>CA-II</b>	<b>CA-IX</b>	<b>CA-XII</b>
6,15	2,72	1,26	5,36

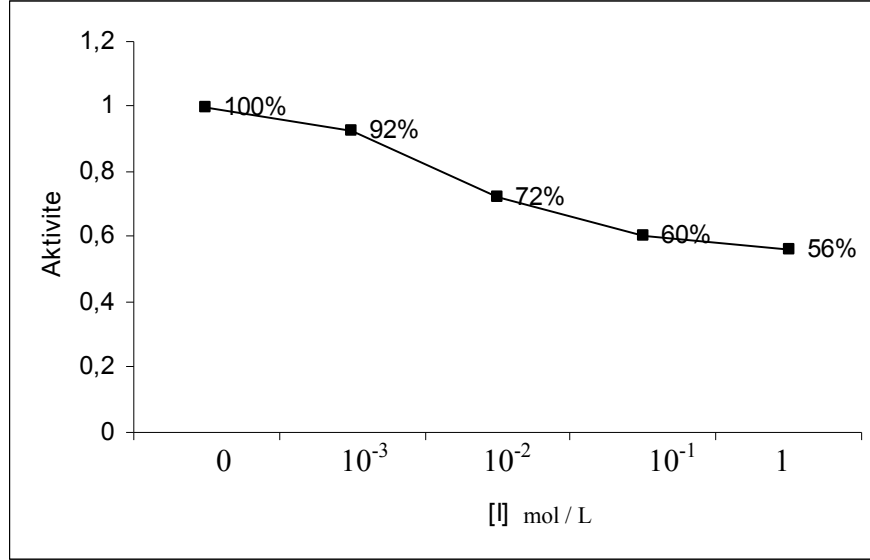


### 3.4.2.3 Lastet (Etoposid/EBEWE)

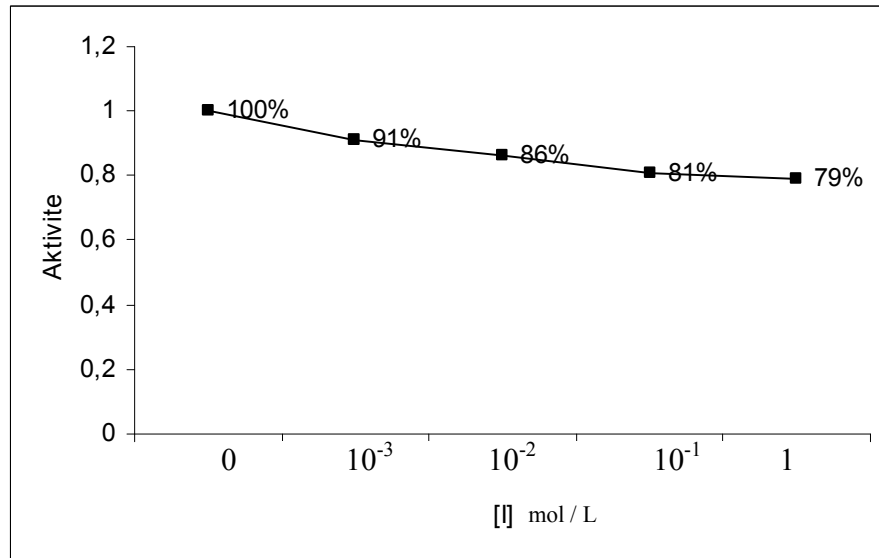
Antineoplastik etkilidir. Akciğer, testis ve over karsinomları ile Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalarda uygulanır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.72-3.75’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.20’de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



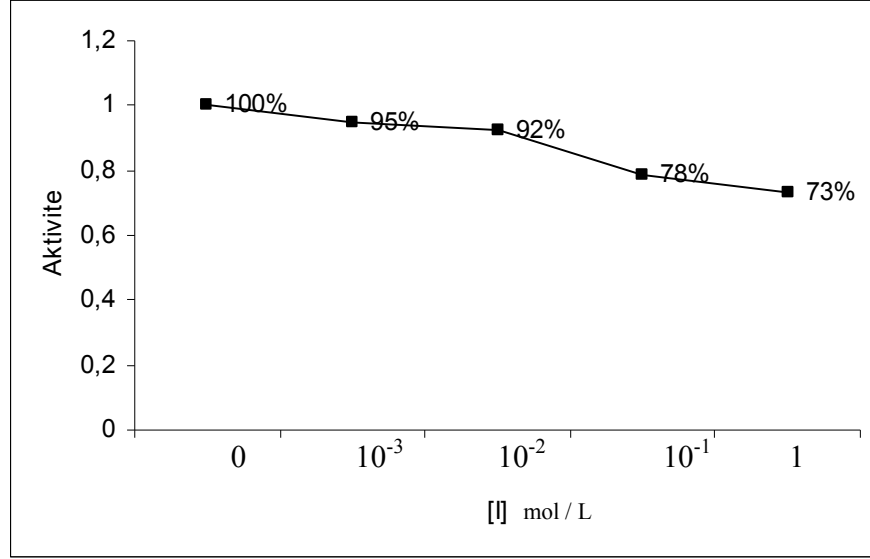
Şekil 3.72 Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.73 Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.74 Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



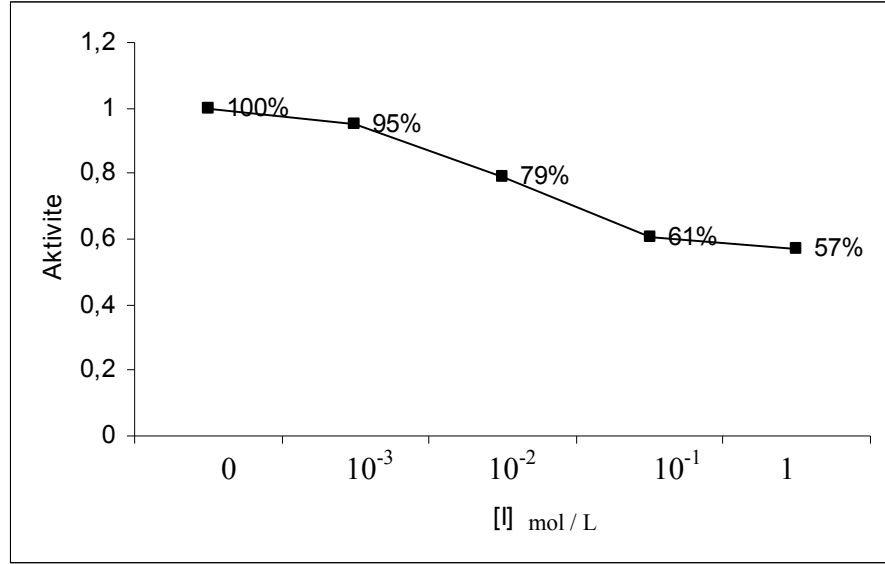
Şekil 3.75 Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.20 Lastet(Etoposid EBEWE) kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

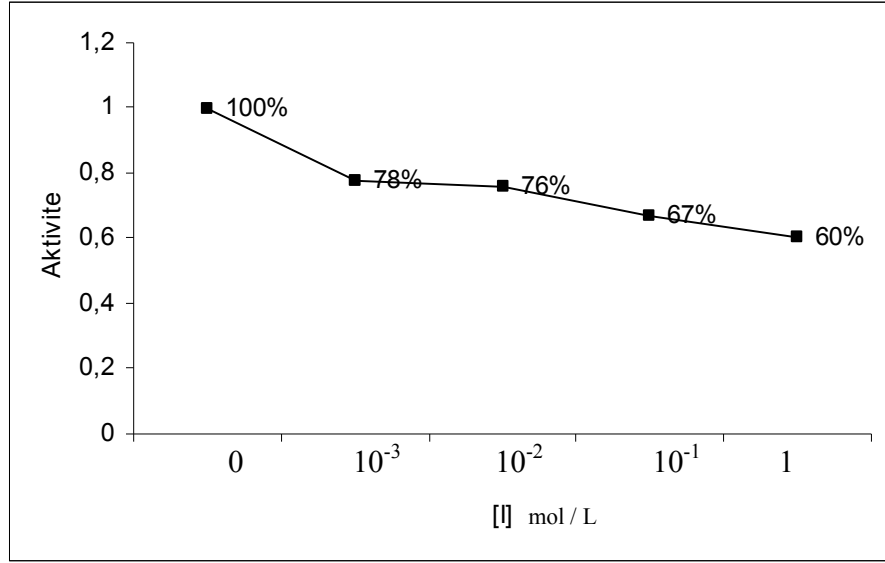
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
14,01	5,27	2,50	1,64

#### 3.4.2.4 Kampto (irinotekon)

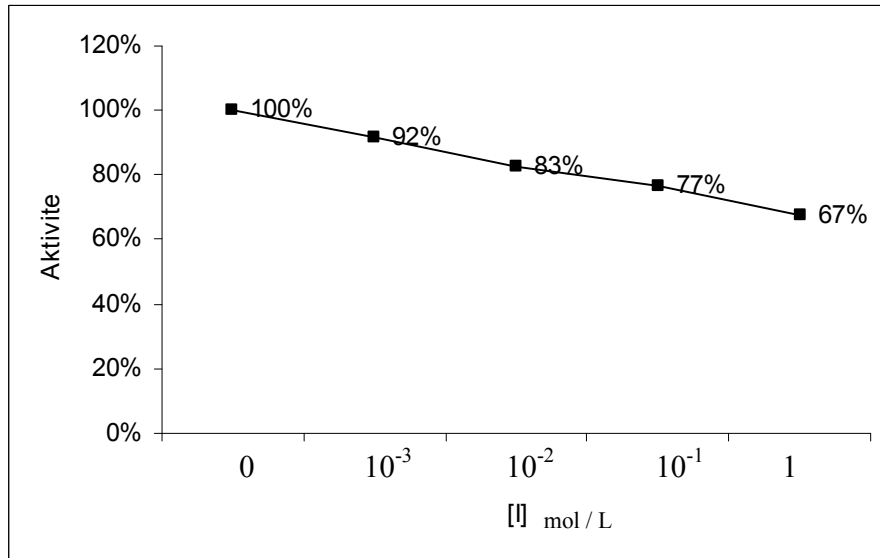
DNA topoizomeraz I'in spesifik inhibitörü olarak etki eden bir antineoplastik bir ajandır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.76-3.79'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.21'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



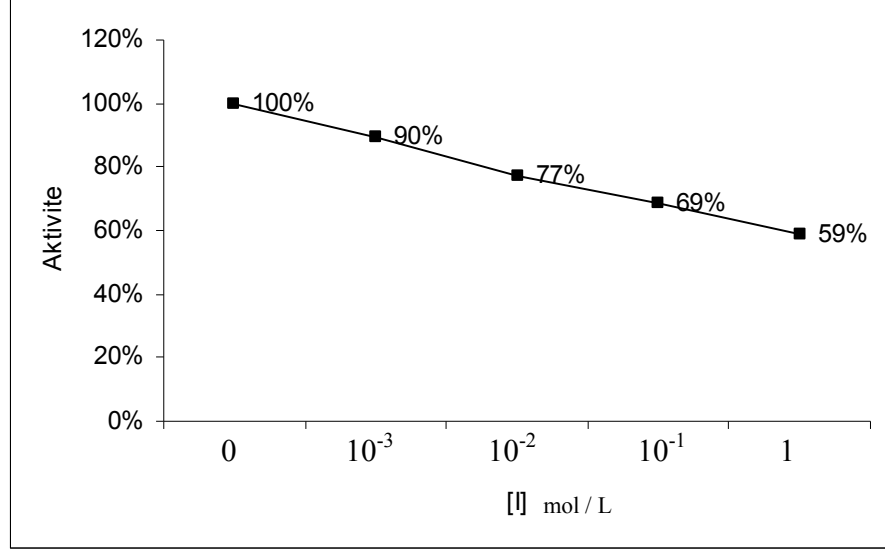
Şekil 3.76 Kampto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.77 Kampto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.78 Kampto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



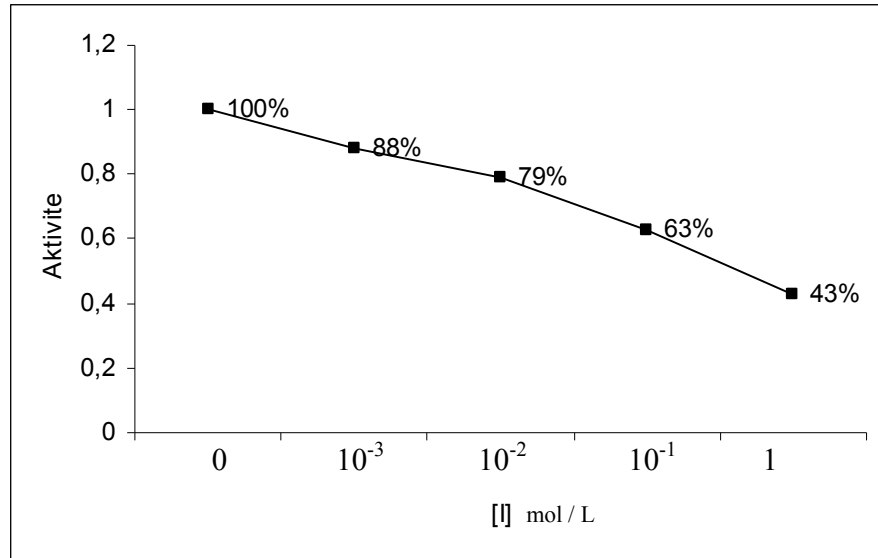
Şekil 3.79 Kampto (irinotekon) kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.21 Kampto (irinotekon) kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

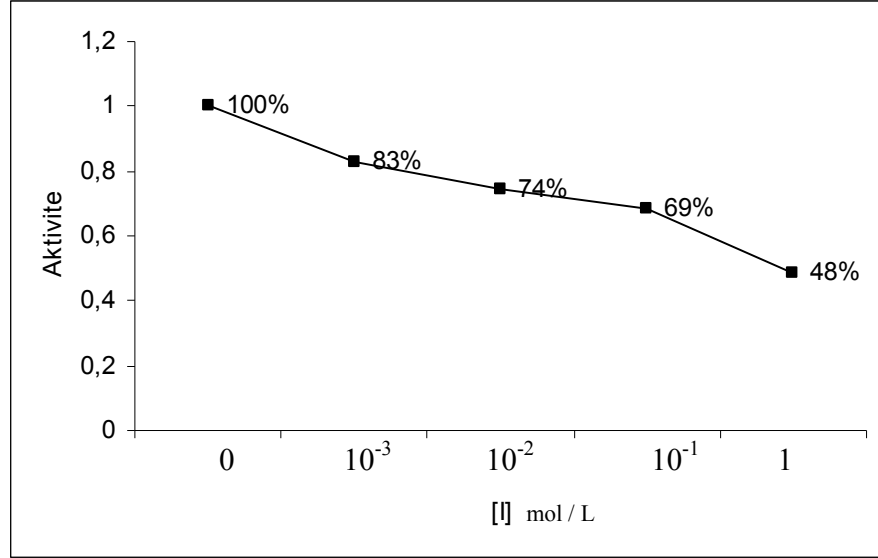
<i><math>I_{50}</math> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
2,70	1,80	2,75	2,28

### 3.4.2.5 Sisplatin/EBEWE

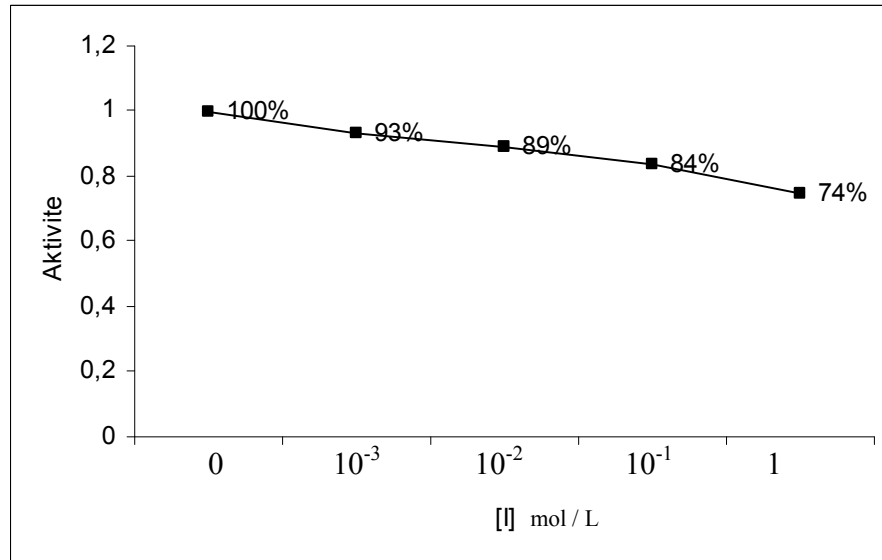
Sis-diamin-dikloroplatinyum (II), tek başına ya da kombine olarak diğer ilaçlarla birlikte ovaryum, testis, mesane, serviks, yemek borusu, baş ve boyun kanserleri ile küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerini de içeren çok geniş ve değişik tümörlere karşı klinikte kullanılmaktadır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.80-3.83'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.22'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



Şekil 3.80 Sisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

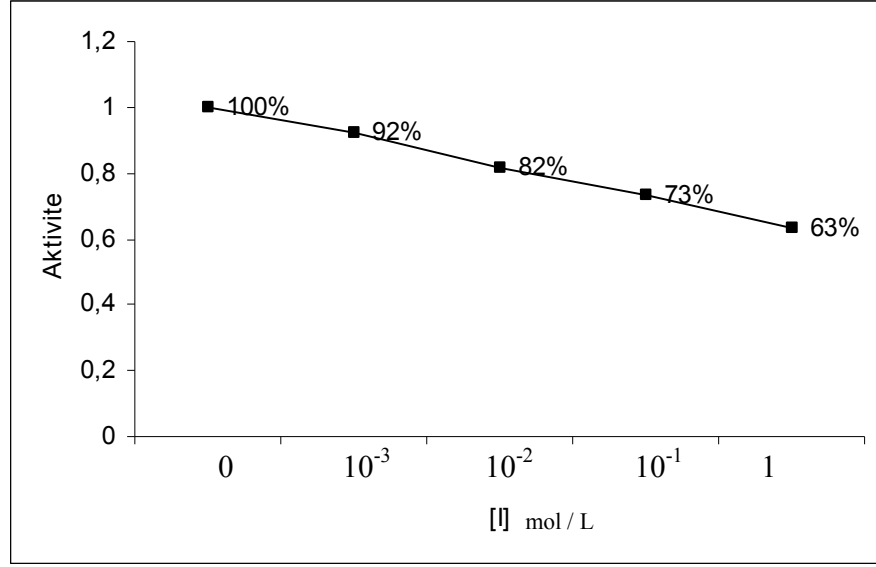


Şekil 3.81 Sisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.82 Sisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi





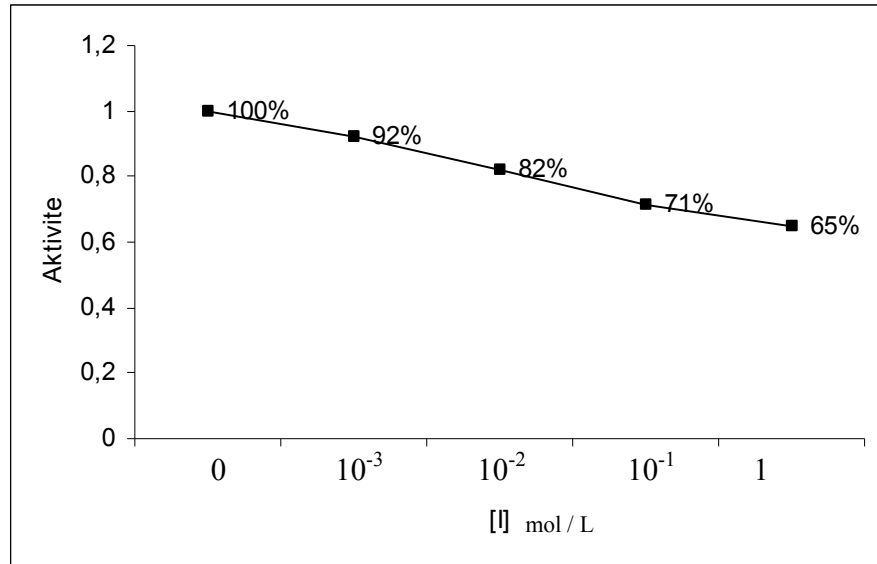
Şekil 3.83 Sisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.22 Sisplatin/EBEWE kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

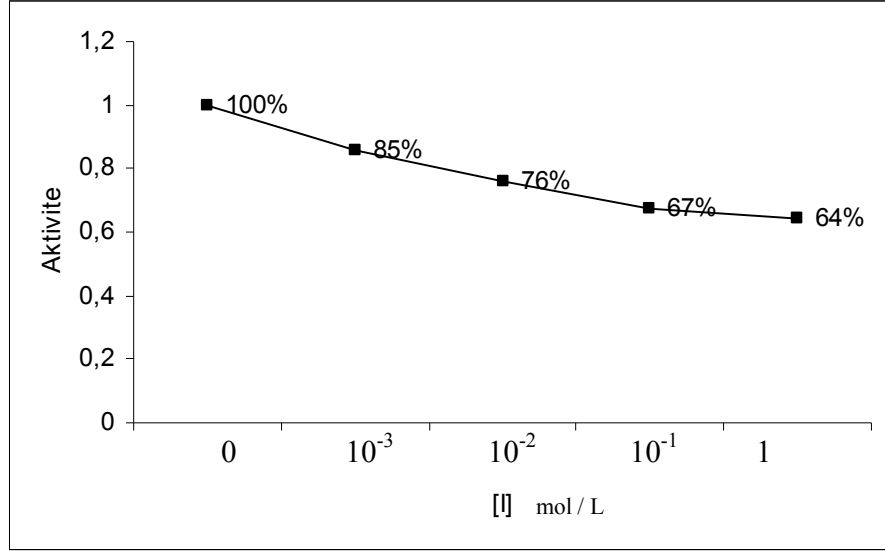
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
3,36	2,15	0,67	0,93

### 3.4.2.6 Gemzar (Gemsitabin HCl)

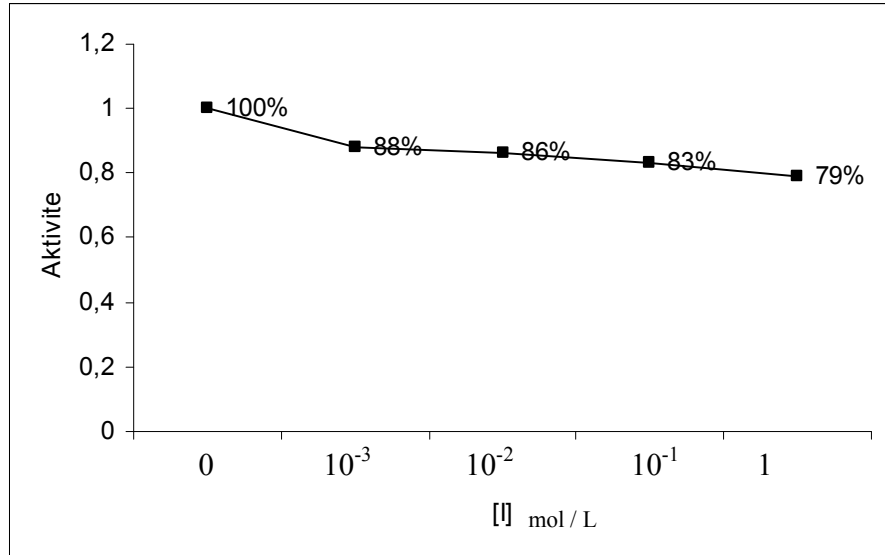
Gemsitabin murin ve insan tümör hücrelerini içeren çeşitli kültürlerde anlamlı sitotoksosite gösterir. DNA sentez döneminde (S-fazı) olan hücreleri öldürerek ve belirli koşullarda hücrelerin G1/S fazı sınırına ulaşmasını önleyerek hücre fazı spesifitesi gösterir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.84-3.87’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.23’de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



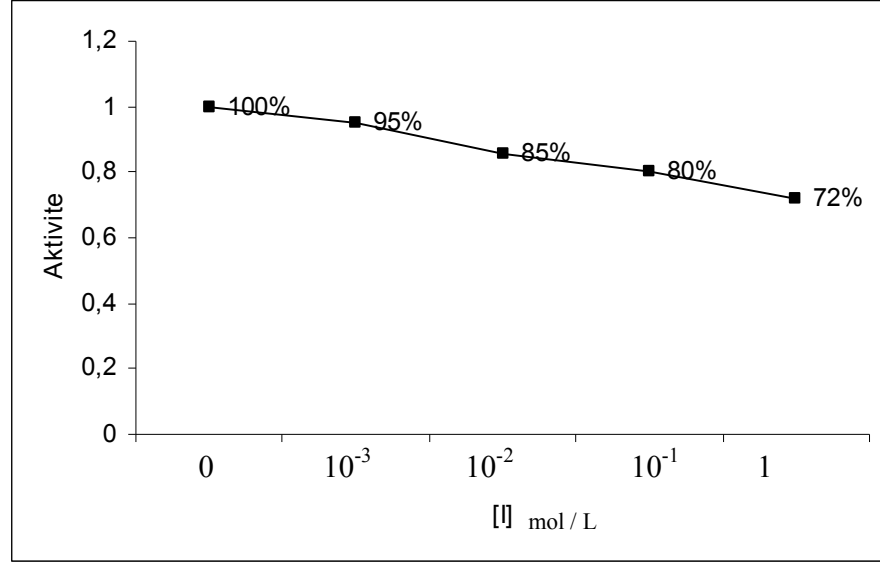
Şekil 3.84 Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.85 Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.86 Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



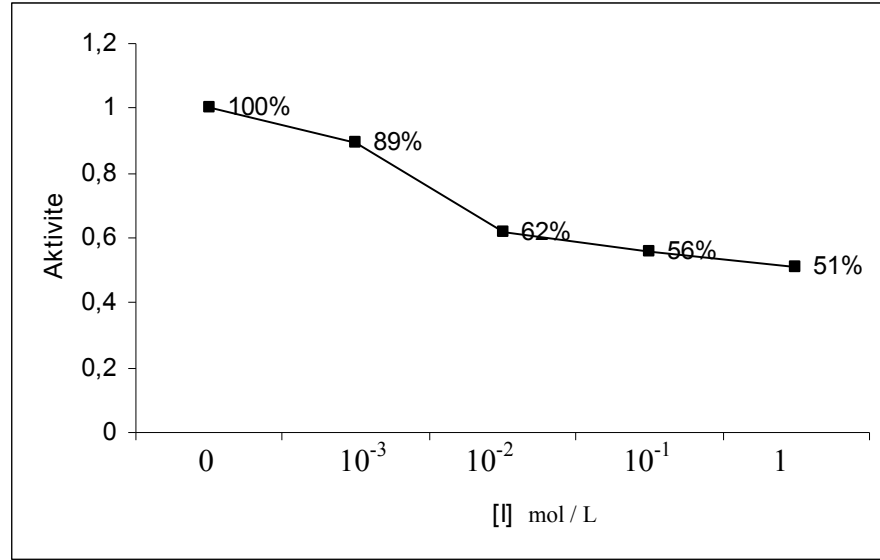
Şekil 3.87 Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.23 Gemzar (Gemsitabin HCl) kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

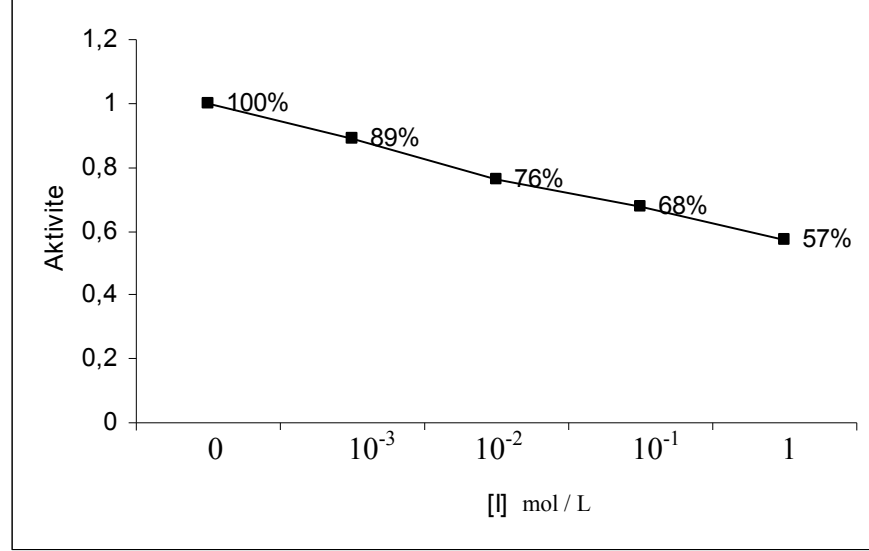
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
7,24	3,25	3,09	5,10

### 3.4.2.7 5-Florourasil /EBEWE/ BIOCYN

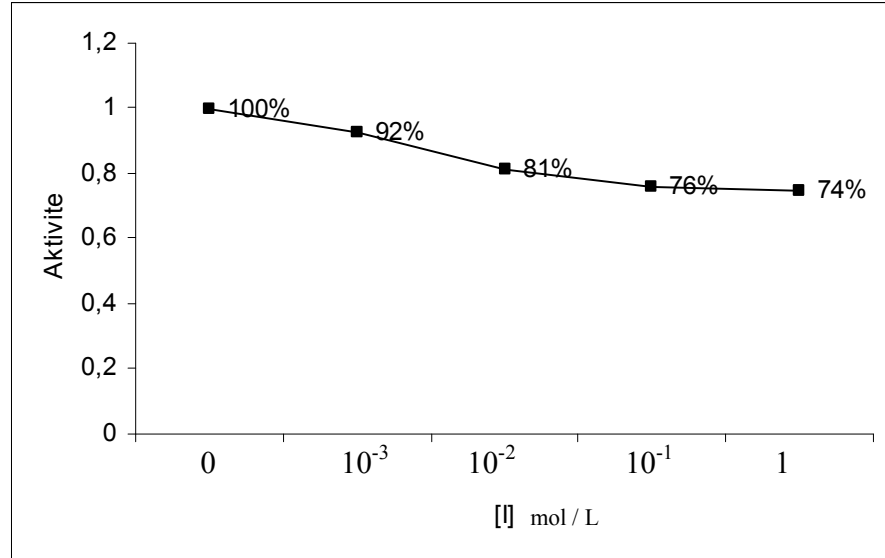
Antineoplastik etkilidir. Basit tümörlerin ve özellikle rektum, kolon, meme, uterus, pankreas, karaciğer, yumurtalık ve mesane karsinomlarının tedavisinde kullanılır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.88-3.91'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.24'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



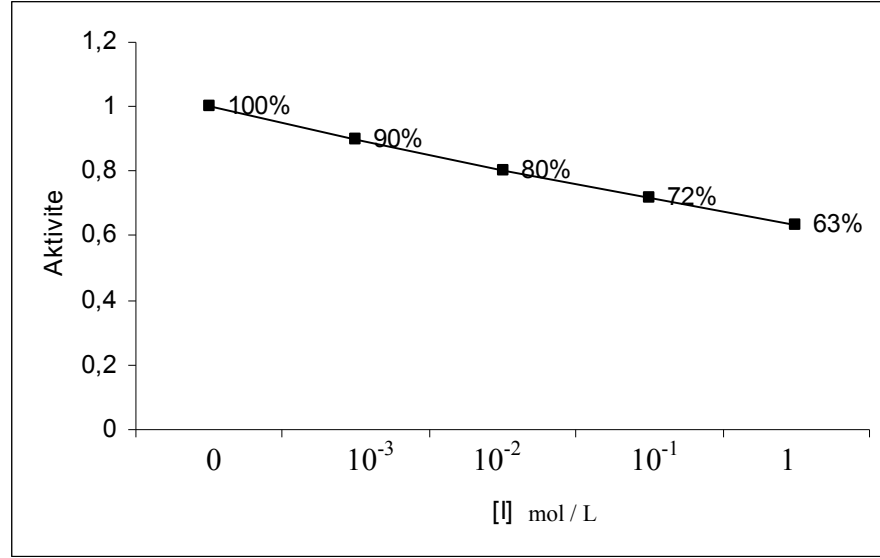
Şekil 3.88 5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.89 5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



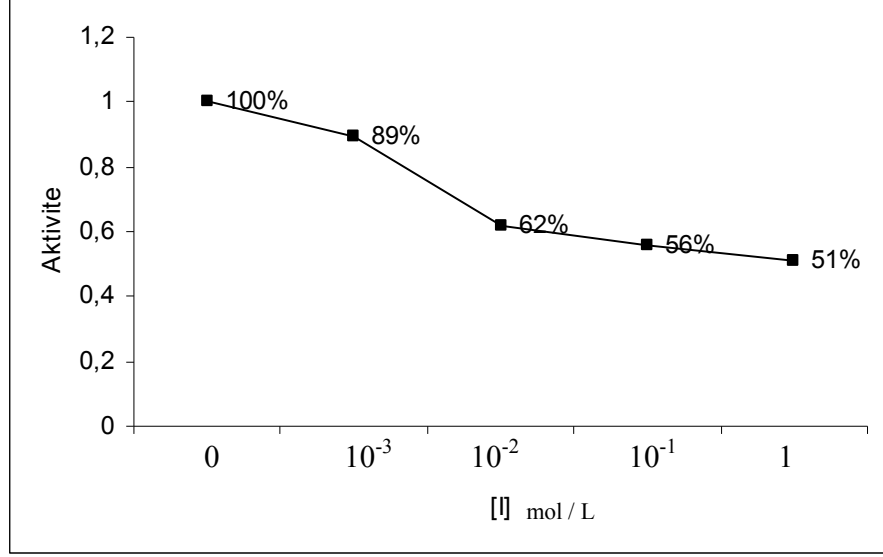
Şekil 3.90 5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



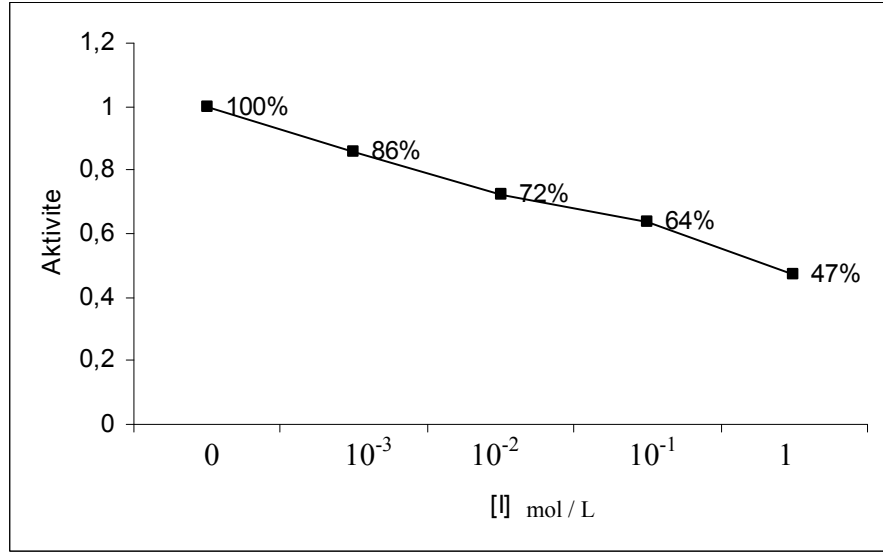
Şekil 3.91 5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.24 5-Florourasil /EBEWE kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
4,56	4,15	1,19	0,85

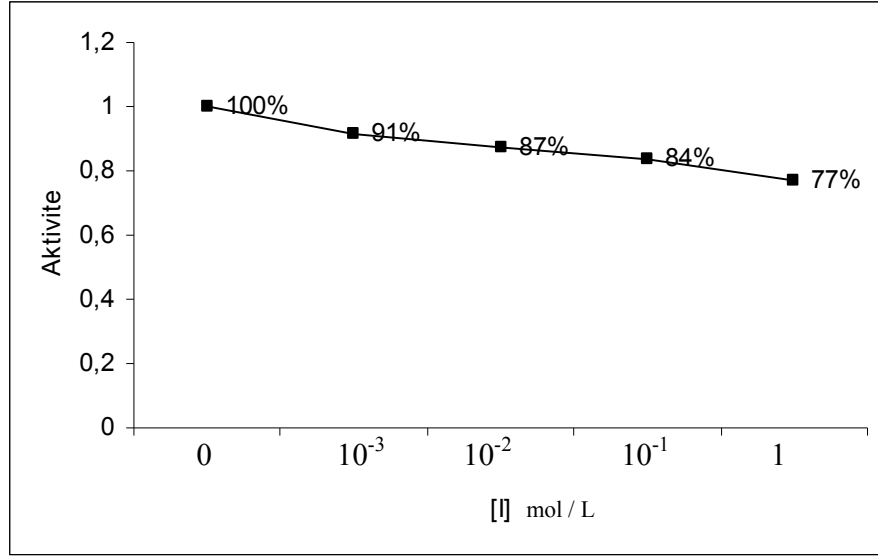


Şekil 3.92 5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

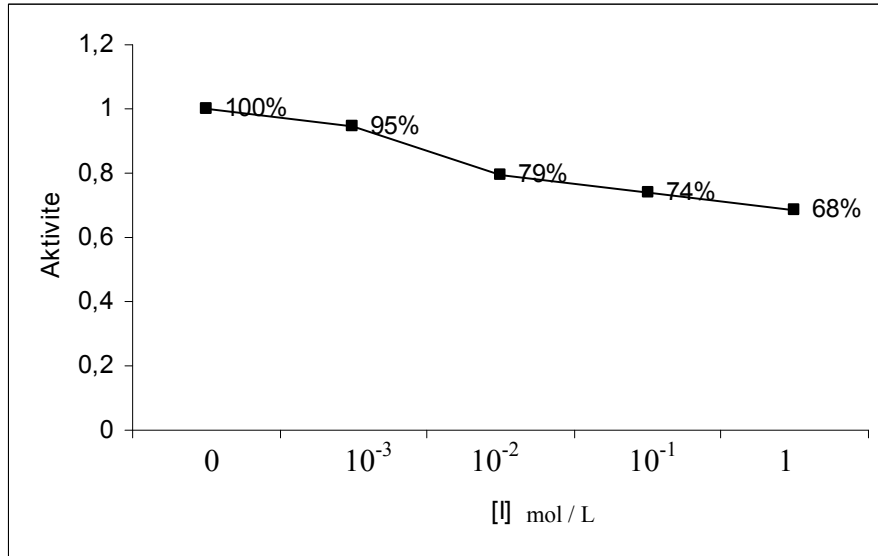


Şekil 3.93 5-Fluorouracil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi





Şekil 3.94 5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



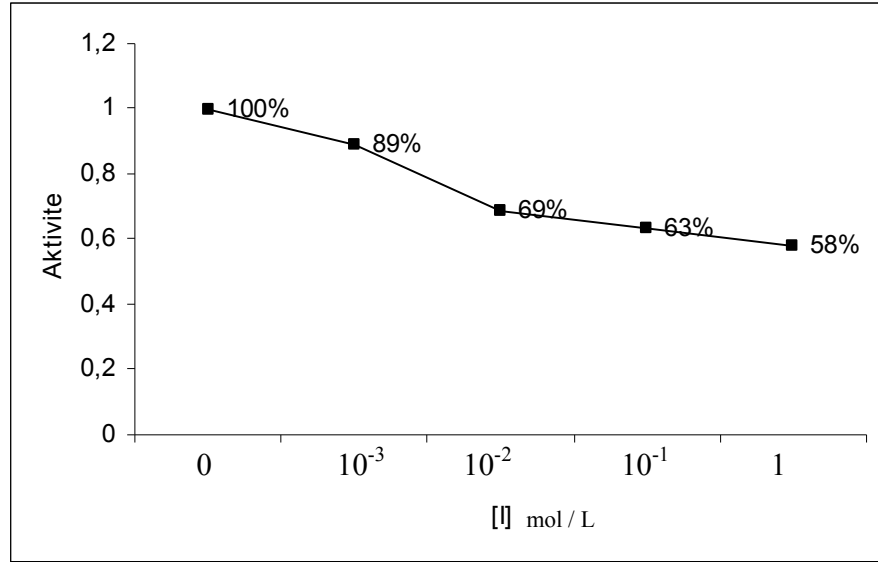
Şekil 3.95 5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.25 5-Florourasil /BIOCYN kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki I<sub>50</sub> değerleri

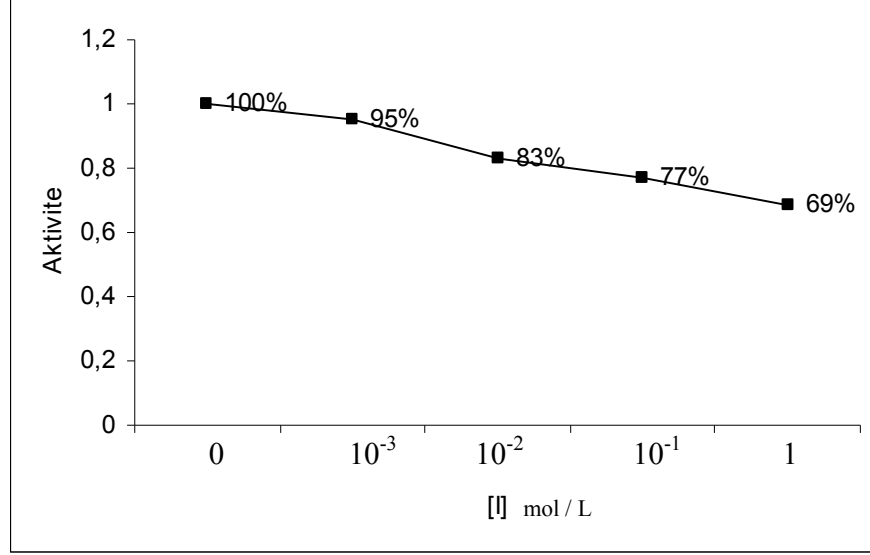
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII

### 3.4.2.8 Okzaplatin (Eloksatin)

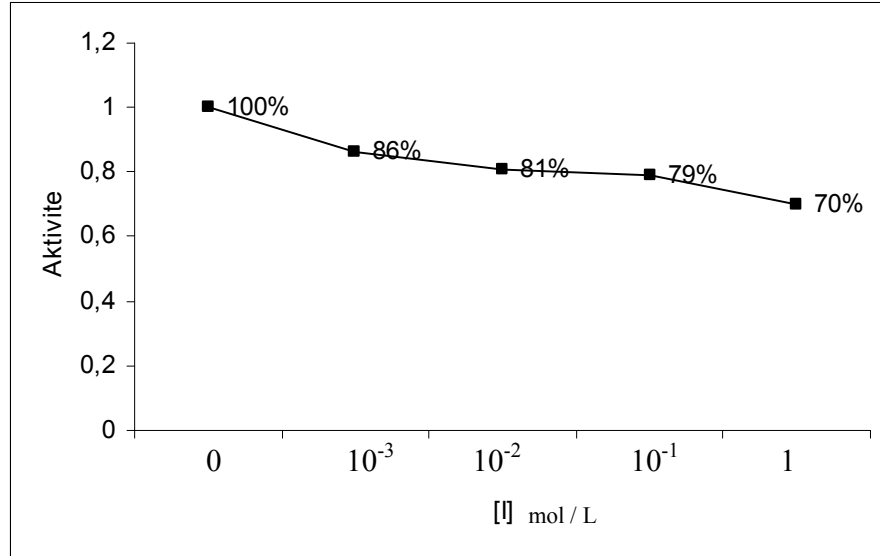
Okzaliplatin atomunun 1,2 diaminosiklohegzan ve bir okzalat grubuyla kompleks oluşturduğu yeni platin esaslı bileşik sınıfının üyesidir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.96-3.99'da 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.26'da ise söz konusu izoenzimlerin I<sub>50</sub> değerleri verilmiştir.



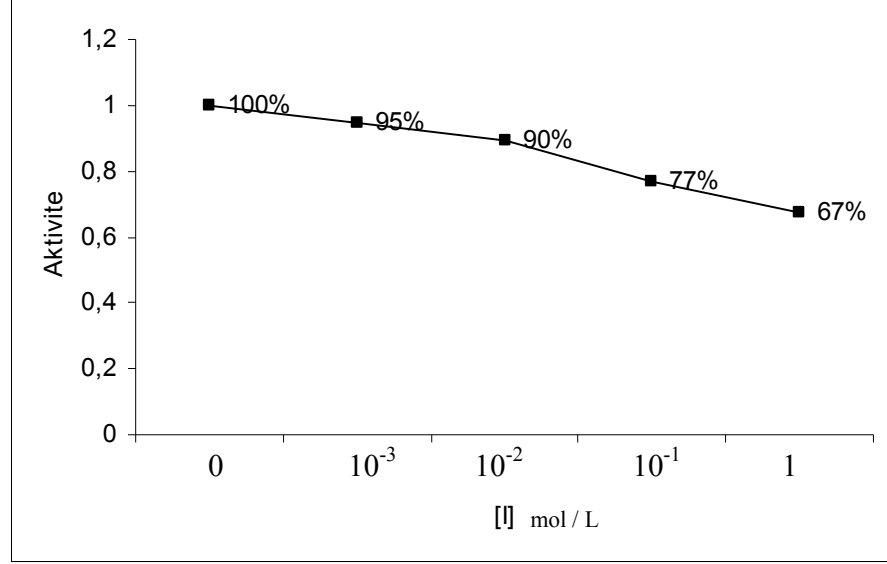
Şekil 3.96 Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.97 Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.98 Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



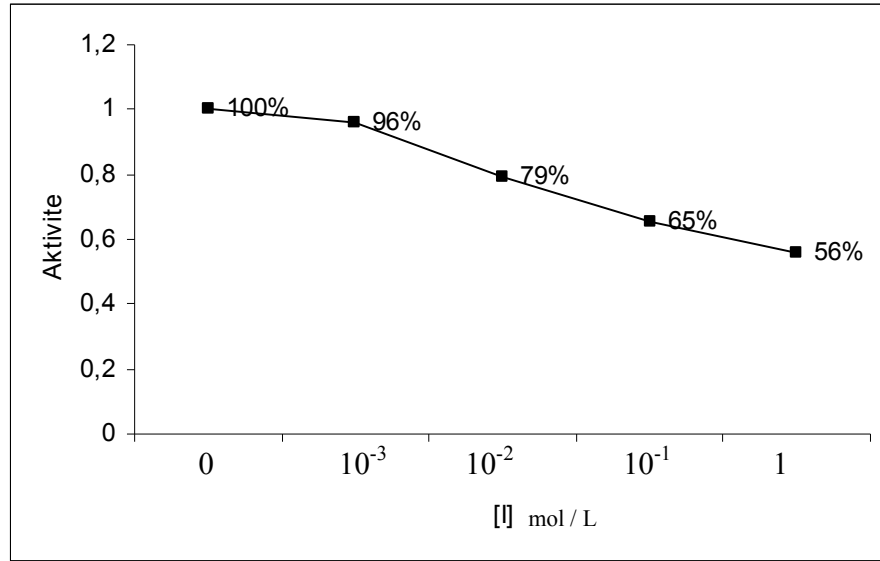
Şekil 3.99 Okzaplatin kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.26 Okzaplatin kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

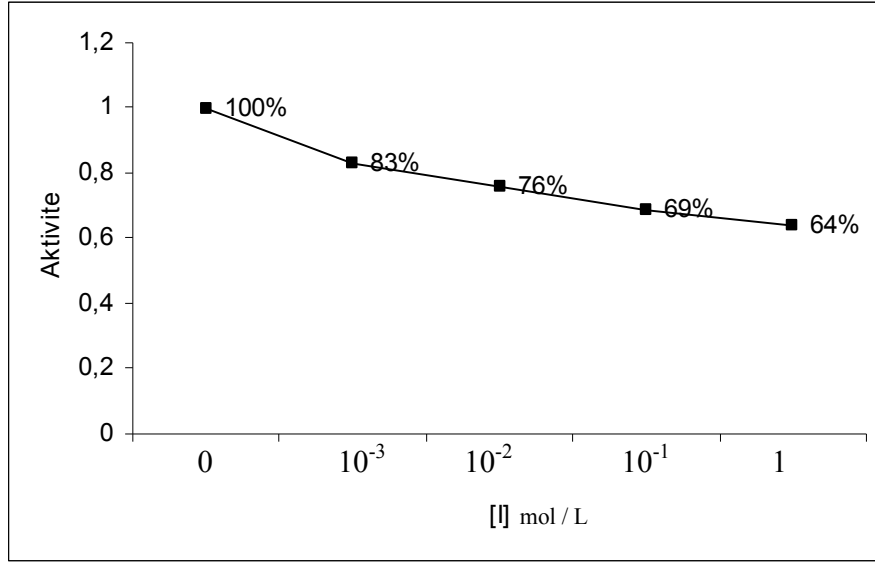
<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
2,92	2,65	2,35	3,04

### 3.4.2.9 Farmorubisin (Epirubisin Hidroklorür)

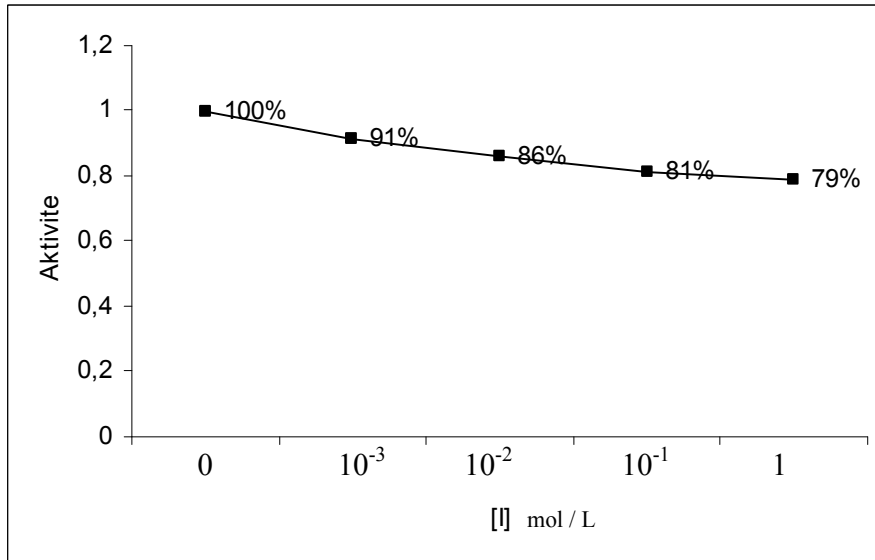
Antineoplastik etkilidir. Meme karsinomu, malign lenfoma, yumuşak doku sarkomu, mide, karaciğer, pankreas ve akciğer karsinomu ve over karsinomunda etkilidir ve antrasiklin sınıfından bir antibiyotiktir. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.100-3.103'de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.27'de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.



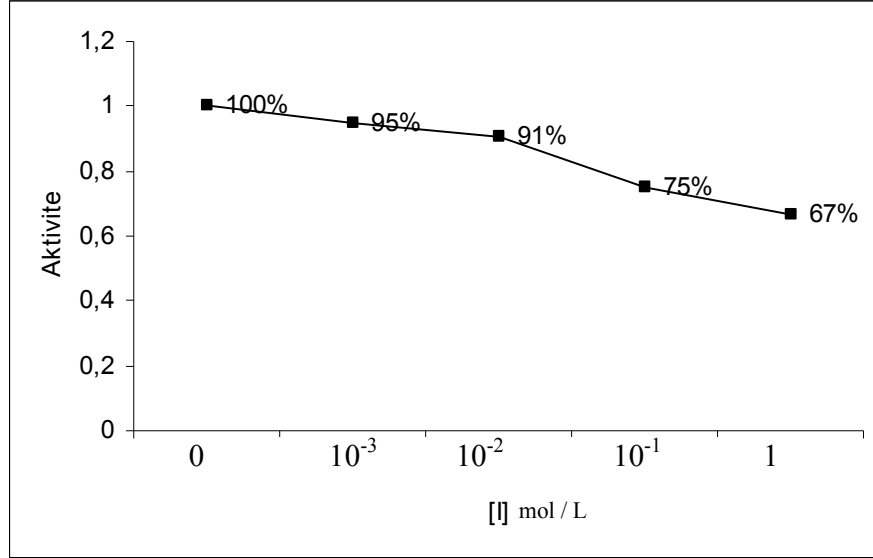
Şekil 3.100 Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.101 Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.102 Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-I ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



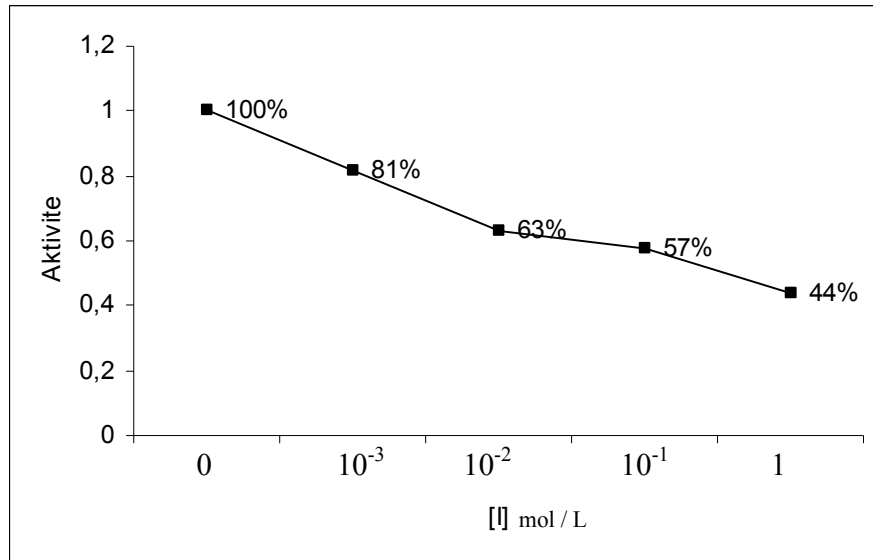
Şekil 3.103 Farmorubisin kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.27 Farmorubisin kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
10,74	2,87	1,56	3,62

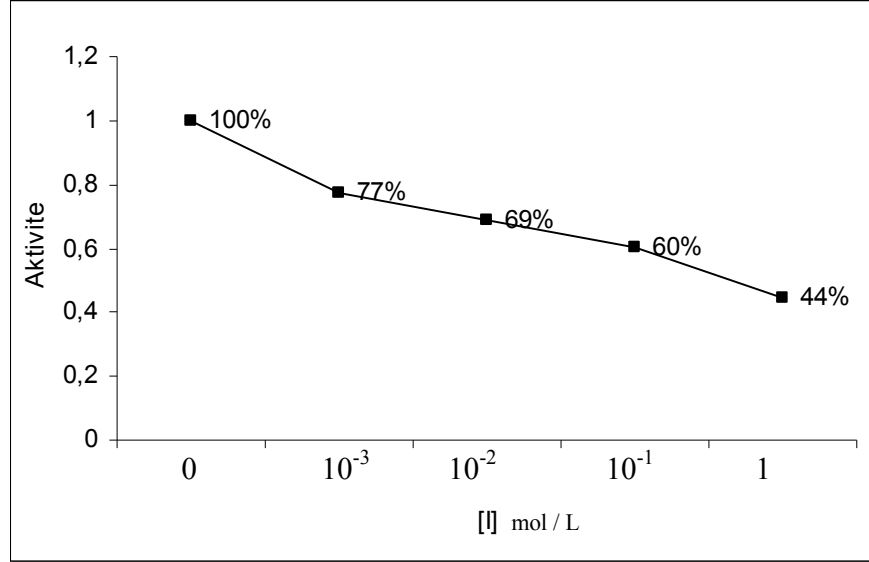
### 3.4.2.10 Karboplatin/EBEWE

İkinci nesil platinyum ilaçlarından olan karboplatin bugün kanser kemoterapisinde rutin olarak kullanılır. HCA-IX, HCA-XII, HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin bu ilaç üzerinde elde edilen inhibisyon grafikleri Şekil 3.104-3.107’de 4 farklı ilaç konsantrasyonunda çizilmiştir. Çizelge 3.28’de ise söz konusu izoenzimlerin  $I_{50}$  değerleri verilmiştir.

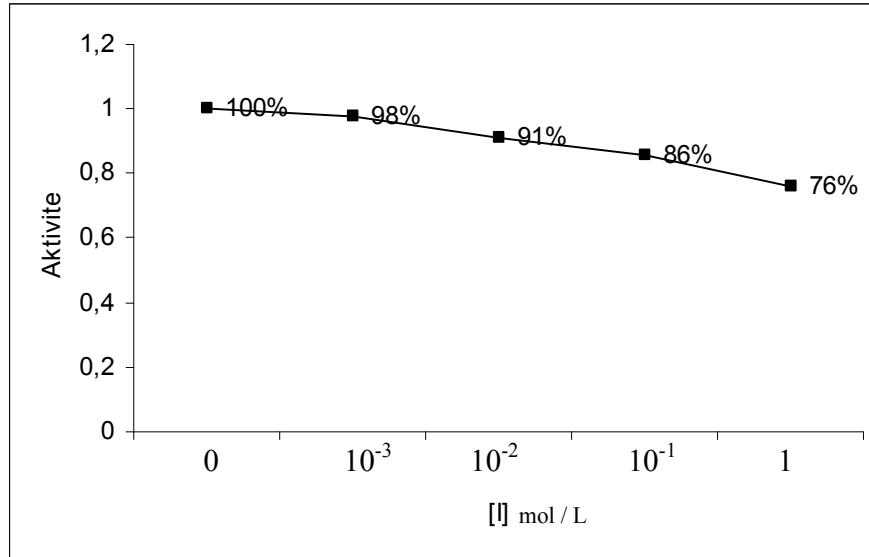


Şekil 3.104 Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-IX ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

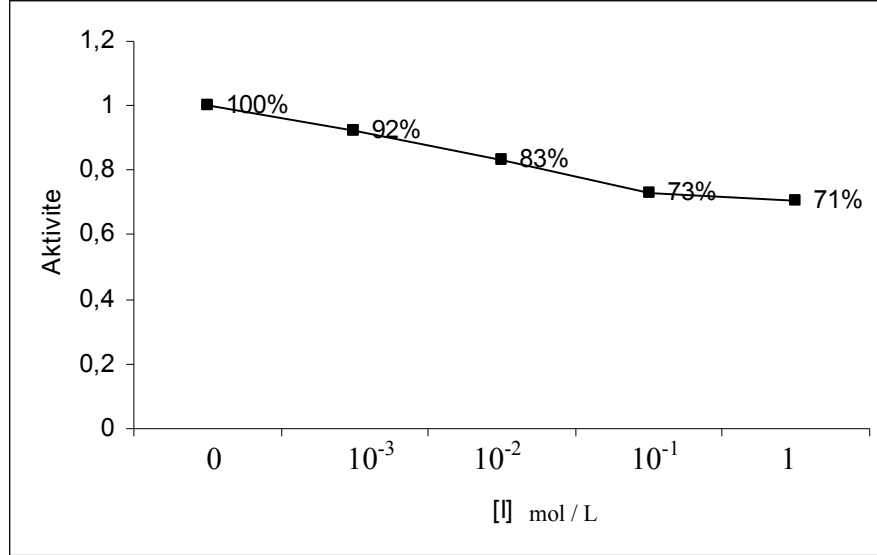




Şekil 3.105 Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-XII ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.106 Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-I ( $4.0 \times 10^{-6}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 3.107 Karboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının HCA-II ( $1.0 \times 10^{-7}$  M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi

Çizelge 3.28 Carboplatin/ EBEWE kemoterapi ilacının CA izoenzimleri üzerindeki  $I_{50}$  değerleri

<i>I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
CA-I	CA-II	CA-IX	CA-XII
3,35	8,98	0,58	0,68

Çizelge 3.29 Antibiyotiklerin CA I ,CA II ,CA IX ve CA XII izoenzimleri üzerinde gözlenen inhibisyon değerleri

Antibiyotikler	<i>İzoenzimler ve I<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
	CA I	CAII	CA IX	CAXII
<b>Kemisetine süksinat</b>	4,72	2,08	2,06	3,18
<b>Amoklavın BID</b>	4,96	3,74	1,73	2,68
<b>Rifosin</b>	2,52	1,02	1,27	1,41
<b>Sefamizin</b>	3,58	3,08	1,54	2,17
<b>Genta 80 mg</b>	2,35	2,53	2,16	3,16
<b>Klindaver 600 mg</b>	3,41	1,89	3,56	2,92
<b>Avaloks 400 mg</b>	2,37	2,60	2,70	1,60
<b>Kerafloks 600 mg</b>	2,86	4,81	1,83	2,87
<b>Klasid 500 mg</b>	3,52	2,53	2,55	2,47
<b>Rozamisin</b>	2,27	0,92	1,23	1,28
<b>Baktrim</b>	7,16	2,25	3,90	2,07
<b>Amplital</b>	1,63	1,14	1,69	1,66
<b>Aksef (250mg)</b>	2,92	2,12	8,21	5,88
<b>Amoksilin 1 g</b>	3,7	4,16	1,81	3,47
<b>Siproksin 500 mg</b>	2,16	2,97	3,38	3,76

Çizelge 3.30 Kemoterapi ilaçlarının CA I ,CA II ,CA IX ve CA XII izoenzimleri üzerinde gözlenen inhibisyon değerleri

Kemoterapi İlaçları	<i>İzoenzimler ve IC<sub>50</sub> Değerleri M(mol/L)</i>			
	CA I	CAII	CA IX	CAXII
<b>Anzataks 30 mg/ 5mL</b>	3,91	1,16	2,84	4,34
<b>Metotreksat-Teva 50 mg/ 2 mL</b>	6,15	2,72	1,26	5,36
<b>Lastet(Etoposid/ EBEWE) 100mg/5mL</b>	14,01	5,27	2,50	1,64
<b>Kampto (irinotekon) 100 mg/5 mL</b>	2,70	1,80	2,75	2,28
<b>Sisplatin/EBEWE 10 mg /10 mL</b>	3,36	2,15	0,67	0,93
<b>Gemzar (Gemsitabin HCl) 1 g</b>	7,24	3,25	3,09	5,10
<b>5-Florourasil /EBEWE 1000mg/20 mL</b>	14,47	2,40	0,83	1,60
<b>5-Florourasil Biocyn 1000 mg/20 mL</b>	4,56	4,15	1,19	0,85
<b>Eloksatin 100 mg/1 mL</b>	2,92	2,65	2,35	3,04
<b>Farmorubisin 50 mg/5 mL</b>	10,74	2,87	1,56	3,62
<b>Karboplatin EBEWE 50 mg/5mL</b>	3,35	8,98	0,58	0,68

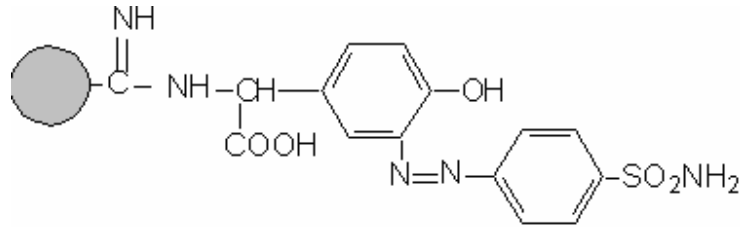
#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada ise, tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin *E.Coli*'de ekspresyonu [123] sonucu elde edilen enzim, belirli ölçüde saflaştırılarak, saf izoenzimler üzerinde kanser tedavisinde kullanılan 11 çeşit kemoterapi ilacı ve farklı gruplarda 15 çeşit antibiyotik ile inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Tümör mikroçevresinde asidifikasyondan sorumlu ve tümüyle kanserli hücrelerde aktivite gösteren CA-IX ve CA-XII izoenzimlerin kanser dokusundan izolasyonu son derece güç bazı durumlarda ise imkansız olduğu bilinmektedir [125]. Enzimin saflığı inhibisyonu önemli derecede etkilediği düşünüldüğünde daha sağlıklı sonuçların elde edilebilmesi için enzimin saflaştırılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, bu çalışmada tek bir basamakta yüzlerce kat saflaştırmayı öngören afinite kromatografi tekniği kullanılmıştır.

Afinite kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamakta sentezlenmiştir. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış sulfonamid bileşiği katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinin de kullanıldığı bildirilmektedir [109]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat aktifleştirilme sırasında jel, pH 4,5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [109]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [118]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir.

Literatürde kromatografik matriks olarak kullanılan bir başka bileşik EUPERGIT C-250 L ticari ismi ile temin edilen ve oksiran grupları içeren jeller de kullanılmıştır. Söz konusu bileşik bağlamada spesifik olmamasına rağmen, üzerinde taşıdığı oksiran grupları ile çeşitli proteinlerin saflaştırılmasında kromatografik matriks olarak seçilmiştir [117]. Ayrıca bu jel herhangi bir aktivasyona gerek duyulmadan ligand immobilize edilebilmektedir. Bunun yanında uzun süre kullanılabilir olması, mekanik etkilere karşı dayanıklı olması ve akış özelliğinin iyi olması sebebiyle de oldukça kullanışlıdır. Fakat yapılan bir çalışmada sepharose-4B ile sentezlenen afinite jeli ile Eupergit ile hazırlanan afinite jeli karşılaştırıldığında Sepharose-4B ile daha iyi akışkanlık ve saflık elde edilmiştir [117].

Araştırmamızda matriks olarak seçilen Sepharose-4B'ye ligand (p-aminobenzen sulfonamid) L-tirozin bileşiği aracılığı ile immobilize edilmiştir.



Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid, karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörü olup, söz konusu izoenzimlerin kolonda yüksek pH'da bağlayarak çalışmamızda başarıyla kullanılmıştır. Kanser ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimleri söz konusu afinite jeli kullanılarak sırasıyla, 129,15 ve 92,29 kat olarak saflaştırılmıştır.

Araştırmamızda saflaştırılan CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin saflık kontrolleri için SDS-PAGE uygulanmıştır. Elektroforez sonucu, CA-XII için molekül ağırlığı 31 kDa olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu sonucun literatürde önceden saflaştırılmış HCA-I ve HCA-III izoenzimleriyle benzerlik gösterdiği saptanmıştır [112, 117]. CA-XII yapısının literatürdeki uygunluğu gözönüne alındığında dimerik bir yapıda olduğu gözlenmektedir [131]. CA-IX izoenziminin literatürdeki moleküler ağırlığına uygun olarak 56 kDa olarak tespit edilmiştir [85].

Çalışmamızda kullanılan antibiyotiklerin söz konusu kanser ilişkili izoenzimler ve sitozolik ticari olarak satın aldığımız insan karbonik anhidraz CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerinde *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan antibiyotiklerin inhibisyon etkisi  $K_i$  ve  $I_{50}$  olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En pratik parametre  $I_{50}$  değeridir. Çünkü materyal ve yöntemde belirtildiği gibi  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en az iki sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit antibiyotik konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir [126]. Bu yüzden bir çok araştırmacının inhibisyon etkisini tespit etmek için  $I_{50}$  değerini kullandıkları bilinmektedir [90-94]. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan antibiyotik konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Yukarıdaki sebepler göz önüne alındığında çalışmamızda daha pratik olan her bir bileşiğin farklı izoenzimler üzerindeki  $I_{50}$  değerleri tespit edilmiştir.

Antibiyotiklerin  $I_{50}$  değerlerini bulmak için Stop Flow kinetik aletinde [90-95] optimum şartlarda  $CO_2$  substratının doymuş konsantrasyonunda çalışıldı. Bu amaçla kullanılan Maren metodu CA aktivitesinde bilinen eski ve en çok tercih edilen metottur [76]. Ancak özellikle CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin aktivitelerinin düşük olması bazı sınırlamalar getirmektedir, dolayısıyla çalışmamızda daha hassas olan Stop Flow aleti ile aktivite tayin metodu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.4-3.63

grafikleri ve Çizelge 3.3-3.17’de verilmektedir. Uygulanan antibiyotikler içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile 4 farklı izoenzim üzerinde Amplital ( $I_{50}$  mM; CA-I: 1,63; CA-II: 1,14 ; CA-IX: 1,69 ; CA-XII: 1,66 )ve Rifocine( $I_{50}$  mM; CA-I: 2,52; CA-II: 1,02 ; CA-IX: 1,27 ; CA-XII: 1,41) en kuvvetli inhibitör olarak tespit edilmiştir

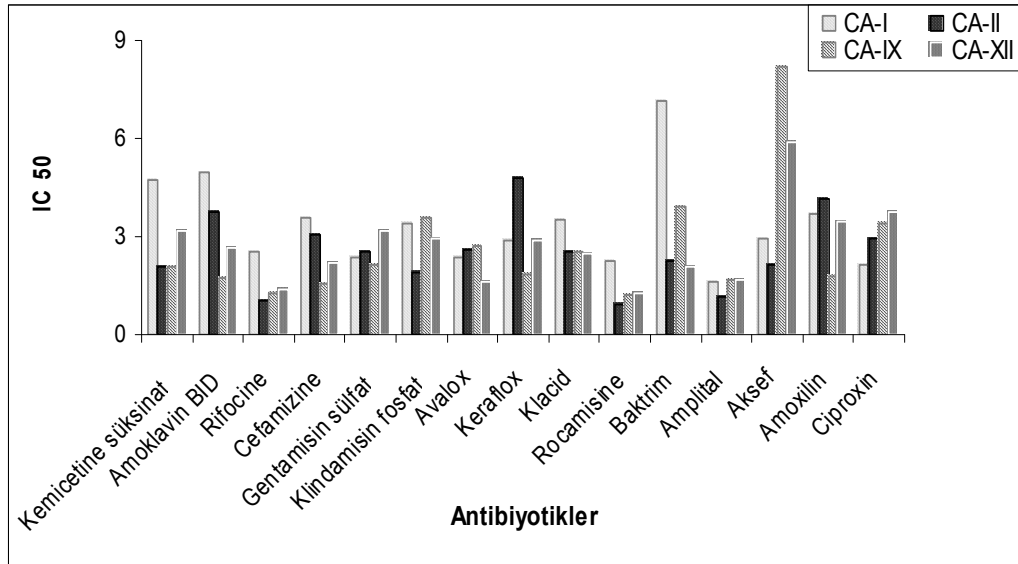
Etkisini sağlam hücrelerde ve hücre içermeyen sistemlerde protein sentezini inhibe ederek gösteren kemisetine süksinat antibiyotiği, çalışmamızda en çok CA-IX ve CA-II izoenzimini inhibe ettiği bulunmuştur ( $I_{50}$  ; CA-IX: 2,06, CA-II: 2,08). Bunun yanısıra kullanımı yaygın olan Amoklavın BID antibiyotiği, yarı sentetik amoksilin antibiyotiği ve bir laktamaz inhibitörü olan klavanatın (klavanik asidin potasyum tuzu) kombinasyonunu içermektedir. Bu antibiyotikten çalışmada en çok etkilenen CA-IX ( $I_{50}$  ; CA-IX: 1,73) izoenzimi olmuştur.

Araştırmamızda kullanılan rifosin grubundan rifamisın SV antibiyotiğinin, her 4 izoenzimi de kuvvetli olarak inhibe ettiği ve inhibisyondan en çok CA-II ve CA-IX izoenzimlerinin etkilendiği gözlenmektedir ( $I_{50}$  ; CA-I: 2,52; CA-II: 1,02 ; CA-IX: 1,27 ; CA-XII: 1,41). Bu bileşiğin, DNA polimeraz enziminin güçlü inhibitörü olduğu tespit edilmiştir [132]. Ayrıca Rifamisın SV türevlerinin insan nötrofil hücrelerinin fonksiyonunu inhibe ettiği literatürde belirtilmektedir [133].

Sefazolin sodyum bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakterisid etki gösteren bir antibiyotik türevi olup çalışmamızda bu bileşiğin güçlü inhibisyonu CA-IX ve CA-XII ( $I_{50}$  ; CA-IX: 1,54; CA-XII: 2,17) izoenzimleri üzerinde etkili olmuştur.. Literatürde, sefazolin sodyum benzeri bir başka antibiyotik olan sefatoksim ve sefadizim antibiyotiklerinin insan eritrositlerinde bulunan glutasyon redüktaz enzimi üzerinde kompetitif inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmektedir [134]. Bakterilerin normal protein sentezini inhibe ederek etkisini gösteren bir aminoglikozid antibiyotiği olan Gentamisin Sülfat en çok CA-IX ve CA-I izoenzimleri ( $I_{50}$  ; CA-IX: 2,16; CA-I: 2,35 mM) üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Klindamisin, makrolidlere benzer şekilde bakteri ribozomlarına bağlanarak, protein sentezinin ilk aşamasını inhibe eden bir



antibiyotiktir. Bu antibiyotik ile yapılan deneysel çalışmalarımızda en fazla inhibisyon etkisi sitozolik CA-II izoenzimi üzerinde olurken ( $I_{50}$  ; CA-II: 1,89 mM) , kanser ilişkili CA-XII ( $I_{50}$  ; CA-XII: 2,92 mM) izoenzimi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi saptanmamıştır. Gentamisin sülfat, sıçanlara kas içine uygulandıktan 3 saat sonra eritrositlerde bulunan karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edilmiştir [135] Moxilloxacin geniş spektrumlu aktiviteye sahip yeni bir florokinolon antibakteriyel ajanı olan Avalox antibiyotiği her bir izoenzim üzerinde farklı bir etki göstermemesine rağmen CA-XII izoenzimi ( $I_{50}$  ; CA-XII: 1,60 mM) üzerinde etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.1 Antibiyotiklerin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon dağılımları

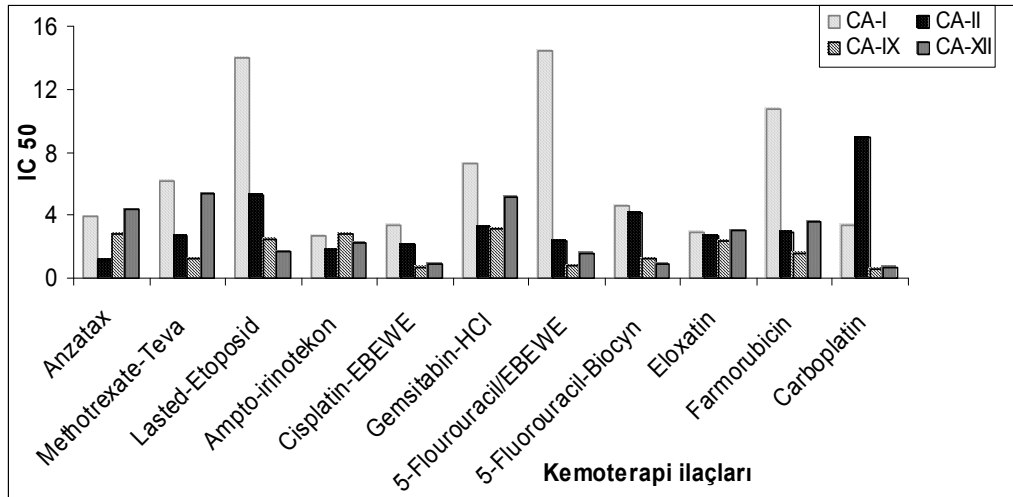
DNA-Giraz inhibitörü olarak hücrede etki gösteren Kerafloks antibiyotiği CA-IX ( $I_{50}$  ; CA-IX: 1,83 mM) ile etkili inhibisyon vermektedir. Güçlü bir antibiyotik olan Klacid bileşiğinin tüm CA izoenzimleri üzerinde inhibisyonu gözlenmiştir ( $I_{50}$  ; CA-I: 3,52; CA-II: 2,53 ; CA-IX: 2,55 ; CA-XII: 2,47 mM). Çalışmamızda kullanılan diğer bir

antibiyotik ise Rifamisin grubundan Rocamisine antibiyotiği 4 izoenzim üzerinde de en etkili inhibisyona neden olmuştur ( $I_{50}$  ; CA-I: 2,27; CA-II: 0,92 ; CA-IX: 1,23 ; CA-XII: 1,28 mM). Benzer çalışmalar literatürde de PON1 enzim aktivitesinde en etkili antibiyotiğin rifamisin olduğunu göstermektedir [136]. Baktrim, trimethoprim ve sulfamethoxazole'den sentezlenmiş bir antibiyotik olup çalışmamızda kullandığımız diğer bir ilaçtır. Bu ilacın güçlü inhibisyonu, CA-XII ile gözlenmekte ( $I_{50}$  ; CA-XII: 2,07 mM) ancak sitozolik CA izoenzimlerinden CA-I için ( $I_{50}$  ; CA-I: 7,16 mM) zayıf inhibisyon etkisi saptanmıştır. Yapılan araştırmalarda, sodyum ampisilin antibiyotiğinin saflaştırılmış insan karbonik anhidraz ve glukoz 6 fosfataz enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği literatürde belirtilmektedir [137, 138]. Söz konusu bileşiğin, sitozolik CA izoenzimleri üzerinde güçlü bir inhibitör olduğu saptanmış ( $I_{50}$  ; CA-I: 1,63; CA-II: 1,14 mM) ancak kanser ilişkili CA izoenzimler üzerinde güçlü bir etki göstermemiştir ( $I_{50}$  ; CA-IX: 1,69; CA-XII: 1,66 mM) .

Aksef antibiyotiği, beta laktamaz üreten suşlar dahil, sık rastlanılan yaygın patojenlerin çoğuna karşı bakterisid etkili bir antibakteriyel ajandır. İçerdiği sefuroksim bakteriyel beta laktamazlara karşı iyi bir stabilite gösterir ve sonuç olarak ampisilin ve amoksisiline dirençli suşların çoğunda da etkilidir. Ancak bu çalışmamızda söz konusu bileşik, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde etkili olmazken ( $I_{50}$  ; CA-IX: 8,21; CA-XII: 5,88 mM) sitozolik CA izoenzimleri üzerinde güçlü inhibisyon elde edilmiştir ( $I_{50}$  ; CA-I: 2,92; CA-II: 2,12 mM). Amoxisilin, bakteri hücre duvarının mukopeptid sentezini inhibe ederek bakterisid etki oluşturan spektrumu geniş bir antibiyotiktir. Araştırmamızda ise, en çok CA-IX ( $I_{50}$  ; CA-IX: 1,81 mM) üzerinde inhibisyon göstermektedir. Ciproxin antibiyotiği içeriğinde Siprofloksasin etkilidir. Bakterinin normal metabolizması için gerekli enformasyonun kromozomdan okunmasını engelleyerek çoğalma kapasitesinde hızlı bir düşüşe neden olur. Çalışmamızda ise, en güçlü inhibisyonu sitozolik CA enzimleri ( $I_{50}$  ; CA-I: 2,16; CA-II: 2,97 mM) üzerinde göstermektedir.

Çalışmamızın bu bölümünde CA izoenzimleri üzerinde kemoterapi tedavisinde kullanılan bazı ilaçların inhibisyon etkileri araştırılmış ve  $I_{50}$  değerleri saptanmıştır. Buna göre en etkili inhibisyon gösteren kemoterapi ilaçlarının sırasıyla, Cis-Platin/EBEWE, 5-Fluorouracil/EBEWE/BIOCYN ve Carboplatin/ EBEWE olduğu Şekil 4.2'den de anlaşılmaktadır.

Araştırmamızda kullanılan Anzatax, antineoplastik etkilidir. Deneysel çalışmalarımızda, en güçlü inhibisyonu CA-II ve CA-IX izoenzimleri ile vermektedir ( $I_{50}$  ; CA-II: 1,16; CA-IX: 2,84 mM). Trofoblastik tümörler, lenfosarkom, meme, over ve akciğer kanseri, akut lenfoblastik çocuk lösemisinde kullanılan diğer bir kemoterapi ilacı olan Methotrexate-Teva güçlü inhibisyonu CA-IX ( $I_{50}$  ; CA-IX: 1,26 mM). izoenzimiyle göstermektedir. Akciğer, testis ve over karsinomları ile Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalarda uygulanan Lastet (Etoposid/EBEWE) ilacı ise araştırmamızda tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII ( $I_{50}$  ; CA-IX: 2,50; CA-XII: 1,64 mM). İzoenzimleriyle inhibisyon saptanmıştır. DNA topoizomeraaz I'in spesifik inhibitörü olarak etki eden bir antineoplastik bir ajan olan Campto (irinotekon) çalışmamızda en güçlü inhibisyon etkisini ilginç olarak sitozolik CA-I ve CA-II izoenzimleri ( $I_{50}$  ; CA-I: 2,70; CA-II: 1,80 mM) üzerinde göstermektedir .



Şekil 4.2 Kemoterapide kullanılan ilaçların CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon dağılımları.

Cisplatin (Cis-diamin-dikloroplatinyum (II) çok güçlü kemoterapik antikanser ilaçlarından biridir. Çalışmamızda CA-IX ve CA-XII ( $I_{50}$  ; CA-IX: 0,67; CA-XII: 0,93) izoenzimleri üzerinde güçlü inhibisyon saptanmıştır. Hücre içinde nükleozid kinazlar yoluyla aktif difosfat ve trifosfat nükleozidlere metabolize ederek DNA sentezini inhibe eden Gemzar (Gemsitabin HCl) araştırmamızda en kuvvetli ihibisyonu CA-II ve CA-IX ( $I_{50}$  ; CA-II: 3,09; CA-IX: 3,25 mM) üzerinde göstermektedir. Özellikle rektum, kolon, meme, uterus, pankreas, karaciğer, yumurtalık ve mesane karsinomlarının tedavisinde kullanılan 5-Fluorouracil /EBEWE/BIOCYN, damar yoluyla ve bazı vücut boşluklarına uygulanabilmektedir. Söz konusu çalışmamızda, sitozolik CA-I ( $I_{50}$  ; CA-I: 14,47 mM) üzerinde zayıf bir inhibisyon gösterirken tümör ilişkili izoenzimlerde ( $I_{50}$  ; CA-IX: 0,83 ; CA-XII: 0,85 mM) ise kuvvetli inhibisyon göze çarpmaktadır. DNA sentezini bozarak sitotoksik ve antitümör etkilere yol açtığını göstermiş olan Eloxatin, 4 farklı izoenzim üzerinde de hemen hemen benzer inhibisyon etkisi göstermektedir ( $I_{50}$  ; CA-I: 2,92 ; CA-II: 2,65 ;CA-IX: 2,35 ; CA-XII: 3,04 mM) .

Etki mekanizması maddenin DNA'ya bağlanabilmesinden kaynaklanan Farmorubicin'in süratle hücreye geçtiğini, nükleusta lokalize olduğunu nükleik asit sentezini ve mitozu inhibe ettiğini göstermiştir. Deneysel çalışmalarımızda, 5-Fluorouracil /EBEWE/BIOCYN gibi sitozolik CA-I izoenzimi üzerinde hemen hemen hiç etki yapmamasına karşın CA-IX ( $I_{50}$  ; CA-IX:1,56 mM) izoenzimi üzerinde kuvvetli bir inhibisyon dikkat çekicidir. Karboplatin, cisplatine göre alternatiftir ve daha az toksik bir bileşik olarak dünya çapında kabul görmüş ve kemoterapide sıklıkla kullanılmakta olan bir ilaçtır. Söz konusu çalışmamızda kuvvetli inhibisyonların gözlemlendiği 3.ilaçtan biridir. Ancak bu ilacın CA-II izoenzimi üzerinde zayıf inhibisyonu ilginçtir ( $I_{50}$  ; CA-I: 3,35 ; CA-II: 8,98 ;CA-IX: 0,58 ; CA-XII: 0,68 mM ).

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- ✓ Kanser ilişkili trans membran protein olan CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ekspre edilmiştir.
- ✓ Elde edilen CA-IX ve CA-XII izoenzimleri afinite kromatografi tekniği ile sırasıyla 129,5 ve 92,29 kat saflaştırılarak SDS-PAGE ile saflık kontrolleri yapılmıştır.
- ✓ Söz konusu saf izoenzimler CA-IX ve CA-XII üzerinde kemoterapide kullanılan 11 farklı ilacın in vitro olarak inhibisyon etkisi araştırılmıştır.
- ✓ Sıkça kullanılan 15 farklı antibiyotiğin CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde de inhibisyon etkileri saptanmıştır.
- ✓ Ayrıca antibiyotikler ve kemoterapi ilaçlarının sitozolik CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri de araştırılmıştır.
- ✓ CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin aktiviteleri söz konusu enzimlerin spesifik inhibitörleri ile regüle edilebilmekte, böylelikle proteinlerin sinyal uyum sağlaması etkilenebilmektedir. Bu durum, bir çok araştırmanın kanser ilişkili CA'ların inhibisyon kapasitelerine odaklanarak maksimum terapötik çıkarı sağlamayı garanti etmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Oncogene> (15.02.2006)
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Carcinoma>(15.02.2006)
- [3] Barry B. Lowitz ve Dennis A. Casciato MEDICAL ONCOLOGY & PRINCIPLES OF CANCER BIOLOGY (2002)
- [4] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell, New York: Garland Science.
- [5] <http://www.kanser.org/>(15.02.2006)
- [6] Mehmet Öztürk, Kanserde Sinyal iletim Mekanizmaları ve Hücre Siklusu Moleküler Kanser Sempozyumu Izmir 2004
- [7] <http://nobelprize.org/medicine/educational/2001/index.html>
- [8] Bortner, C. D. & Cidlowski, J. A. (2002). Cellular Mechanisms for the repression of apoptosis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42: 259-281.
- [9] Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776.
- [10] Strasser, A. et al. (2000). Apoptosis signaling. Annu. Rev. Biochem. 69: 217-245.
- [11] <http://www.cancerquest.org/printfriendly.cfm?printpage=55> (15.02.2006)
- [12] <http://www.kansertedavileri.com/>(15.02.2006)
- [13] Christine C. Crowe and W. Eugene Sanders, Jr. Rosamicin: Evaluation In Vitro and Comparison with Erythromycin and Lincomycin Antimicrob Agents Chemother. 1974 March; 5(3): 272–275
- [14] <http://www.newstarget.com/012727.html>(15.02.2006)
- [15] Bozkurt, H., Bazı Cisplatin türevlerinin Sitotoksitesinin ve Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans, Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir,(2004)
- [16] Antonio H. Villalon, G. Cristal-Luna, J. Lu-Lim, N. Alsay-Uy, A. Jesena, F. Martines-Lapus, D. Tultud, A. Guancia, C. Viado-Gorospe, V. Yosuiico, G. Fernando, I. Romana, L. Ordono, C. Samson-Fernando, H. Abarquez, J. Cruz the Safety and Efficacy of Three-Hour ) Infusion as Salvage Chemotherapy for Metastatic Breast™Paclitaxel (Anzatax Cancer in the Philippines 2001 ASCO Annual Meeting
- [17] Vademecum 1996 Modern İlaç Rehberi 11.basım

- [18] [http://www.kanser.org/toplum/kemo\\_ilac.php](http://www.kanser.org/toplum/kemo_ilac.php) (15.02.2006)
- [19] Nitisis, J. L., “A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs” PNAS 99 (22) 13963-13965
- [20] Jacupec, M.A., Galanski, M. Keppler, B. K., “Tumor-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives” Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.146,(2003)1-53
- [21] Ashish M. Kamat and Donald L. Lamm., “Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer”, Urology, Volume 63, Issue 3, (2004), 457-460.
- [22] <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/penicill.htm>(15.02.2006)
- [23] Ashish M. Kamat, Jean I. DeHaven and Donald L. Lamm Quinolone antibiotics: a potential adjunct to intravesical chemotherapy for bladder cancer Urology, Volume 54, Issue 1,( 1999), 56-61.
- [24] Eckerson, H.W., Wyte, C.M. and La Du, B.N., “The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism”, Am. J. Hum. Genet., (1983) 35, 1126.
- [25] Beydemir, S., Çiftçi, M., Özmen, I., Okuroglu, M.E.B., Özdemir, H. And Küfreviöglu, Ö.I., “Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in vitro and from Rat Erythrocytes in vivo”, Pharmacological Research, (2000) 42, 187.
- [26] Çiftçi, M., Küfreviöglu, Ö.I., Gündoödu, M. and Özmen, I., “Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte”, Pharmacol Res., (2000) 41, 109.
- [27] Perrone, C., Takahashi, K.C., Williams, G.M., “Inhibition of Human Topoisomerase IIY by Fluoroquinolones and Ultraviolet A Irradiation”, Toxicological Science, (2002) 69, 16.
- [28] Barret, J.F., Gootz, T.D., McGuirk, P.R., Farrel, C.A. and Sokolowski, S.A., “Use of in vitro topoisomerase-II assays for studying quinolone antibacterial agents”, Antimicrob. Agents Chemother., (1989) 33, 1697.
- [29] Rodrigues, A.D., Roberts, E.M., Mulford, D.J., Yao, Y. and Ouellet, D., “Oxidative metabolism of clarithromycin in the presence of human liver microsomes. Major role for the cytochrome P4503A (CYP3A) subfamily”, Drug Metab Dispos, (1997) 25, 623.
- [30] Gorski, J.C., Jones, D.R., Haehner-Daniels, B.D., Hamman, M.A., O’Mara, E.M. Jr. and Hall, S.D., “The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin”, Clin. Pharmacol. Ther.,

(1998) 64, 133.

- [31] Flockhart, D.A., Drici, M.D., Kerbusch, T., Soukhova, N., Richard, E., Pearle, P.L., Mahal, S.K. and Babb, V.J., "Studies on the mechanism of a fatal clarithromycin-pimozide interaction in a patient with Tourette syndrome", *J. Clin. Psychopharmacol.*, (2000) 20, 317.
- [32] Gooderham, M.J., Bolli, P. and Fernandez, P.G., "Concomitant digoxin toxicity and warfarin interaction in a patient receiving clarithromycin", *Ann Pharmacother.*, (1999) 33, 796.
- [33] Spisani, S., Traniello, S., Onori, A.M., Rizzuti, O., Martuccio, C. and Callai, L., "3-(Carboxylathio) Rifamycin San d SV Derivatives Inhibit Human Neutrophil Functions", *Inflammation*, (1998) 22(5), 459.
- [34] Gouedard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R. and Morel, Y., "Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON1 by fenofibrate and statins", *Mol. Pharmacol.*, (2003) 63, 945.
- [35] Beltowski, J., Wojcicka, G. and Jamroz, A., "Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) or tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities", *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, (2004) 43, 121.
- [36] Balogh, Z., Seres, I., Marangi, M., Kovacs, P., Kakuk, G. and Paragh, G., "Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates?", *Diabetes Metab.*, (2001) 27, 604.
- [37] Paragh, G., Seres, I., Harangi, M., Balogh, Z., Illyes, L. and Boda, J., "The effects of micronized fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease", *Diabetes Metab.*, (2003) 29, 613
- [38] Turay, J., Grniakova, V. and Vakla, J., "Changes in paraoxonase and apolipoprotein A-I, B, B-III and E in subjects with combined familial hyperlipoproteinemia treated with ciprofibrate", *Drugs Exp. Clin. Res.*, (2000) 26, 83.
- [39] Durrington, P.N., Mackness, M.I., Bhatnagar, D., Julier, K., Prais, H. And Arrol, S., "Effects of two different fibric acid derivatives on lipoproteins, cholesterol ester transfer, fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and paraoxonase activity in type IIb hyperlipoproteinemia", *Atherosclerosis*, (1998) 138, 217.
- [40] <http://www.healthsquare.com/newrx/BAC1046.HTM>
- [41] Desta, Z., Kerbusch, T., Soukhova, N., Richard, E., Ko, J.W. and Flockhart, D.A., "Identification and characterization of human cytochrome P450 isoforms



- interacting with pimoziide”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1998) 285, 428.
- [42] Bruce, M.A., Hall, S.D., Haehner-Daniels, B.D. and Gorski, J.C., “In vivo Effects of Clarithromycin on Multiple Cytochrome P450S”, *Drug Metabolism and Disposition*, (2001) 29(7), 1023.
- [43] Frolova, L.Y., Meldrays, Y.A., Kochkina, L.L., Giller, S.A., Eremeyev, A.V., Grayevskaya, N.A. and Kisselev, L.L., “DNA-polymerase inhibitors. Rifamycin derivatives”, *Nucleic Acids Research*, (1977) 4(3), 523.
- [44] <http://www.cup2000.it/cup2000/it/servizi/mol/risposte.asp?branca=2&idf=1485> (15.02.2006)
- [45] Fuhr, U., Anders, E-M., Mahr, G., Sorgel, F. and Staib, A.H., “Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P4501A2 activity in vivo and in vitro”, *Anrinzign,b AgcutN Chenithe*, (1992) 36, 942.
- [46] İlaç sözlüğü, Dr.Oguz Canay 2001/2002, Nobel Tıp Kitapevi
- [47] Supuran, C. T., and Scozzafava, A., “Carbonic Anhydrase Inhibitors”, *Curr. Med.Chem.*, 1, (2001), 61-97
- [48] Maren, T. H., “Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition”, *Phsiol. Rev.*, 47, (1967), 595.
- [49] Chegwidde, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., “In the Carbonic Anhydrase New horizons”, *Birkhauser Verlag,Basel*, (2000), 343-363.
- [50] Keha, E. E., “Karbonik anhidraz enziminin saflastırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu”, *Doçentlik Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,Erzurum, (1981).
- [51] Wistrand, P. J., “The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO<sub>2</sub> by the human erythrocyte”, *Acta Physiol. Scand.*, (1981), 343-363
- [52] Hewett-Emmett, D., “In the Carbonic anhydrase New Horizons”, *Birkhauser Verlag, Basel*, (2000), 29-78
- [53] Akiba, T., Alpern, R. J., Eveloff, J., and Warnock, D. G., “Electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in rabbit renal cortical basolateral membrane vesicles”, *J. Clin. Invest.*, 78, (1986), 1472
- [54] Sugrue, M. F., “The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical Carbonic anhydrase inhibitor”, *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, (1996), 363-376.
- [55] Maren, T. H., Conroy, C. W., Wynns, G. C., and Godman, D. R., “Renal and

Cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight Carbonic anhydrase inhibitor”, *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, (1997), 98-104.

- [56] Cabisco, E., and Lewine, R. L., “The phosphatase activity of Carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, (1996), 4170-4174
- [57] Okuyama, T., Waheed, A., Ksumoto, W., Zhu, X. L., and Sly, W. S., “Carbonic anhydrase IV: role of removal of C-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme activity”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 320, (1995), 315-322
- [58] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., La Nove, K. F., and Lynch, C. J., “Differentiation-dependent expression of CA and the role of Carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes”, *FASEB J.*, 10, (1996), 481-490.
- [59] Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H., and Tashian, R. E., “Expression of Carbonic anhydrase of mouse VII in E.coli and demonstration of its CO<sub>2</sub>-hydratase activity”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, (1996), 268-272.
- [60] Kaiser, E. T., and Lo, K. W., “The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane”, *J. Am. Chem. Soc.*, 91, (1969), 4912.
- [61] Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., “Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 238, (1989), 170.
- [62] Lindskog, S., “Structure and mechanism of Carbonic anhydrase”, *Pharmacol. Ther.*, 74, (1997), 1-20.
- [63] Schcer, A., and Dietsch, P., “A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase”, *Annals New York Acad.Sci.*, 429, (1984), 241.
- [64] Armstrong, J., Myers, Mc D., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., “Purification and properties of human erythrocyte Carbonic anhydrase”, *J. Biol. Chem.*, 214, (1966), 5137
- [65] Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., “On the evolution and genetics of Carbonic anhydrase I, II and III Isozymes: Current topics in Biological and Medical Research”, Volume 7: Molecular Structure and Regulation, (1983), 79-100.
- [66] Andresson, B., Hymen, P. O., and Strid, L., “Aminoacid sequence of human erythrocyte CA”, *B. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, (1972), 670.
- [67] Lin, K. T. D., and Deutsch, H. F., “Human Carbonic anhydrase XII, the

complete structure of the C isoenzyme”, *J. Biol. Chem.*, 249, (1974), 2329.

- [68] Giraud, N., Merria, C., and Laurent, T.G., “Structure primaire de l’anhydrase carbonique erythrocyte humaine III. Sequences des fragment I CNBr et III CNBr.”, *J. Biochem.*, 56, (1974), 1033.
- [69] Henderson, L. E., Henriksson, P., and Hymann, P. O., “Amino acid sequence human erythrocyte Carbonic anhydrase C”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, (1973), 1388.
- [70] Wendroff, K. M., Nishita, T., Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., “The sequence of equine muscle Carbonic anhydrase”, *J. Biol. Chem.*, 260, (1989), 6129.
- [71] Deutsch, H. F., “Carbonic anhydrase”, *Int. J. Biochem.*, 19, (1987), 100.
- [72] Wistrand, P. J., “Solubilization and preliminary characterization of membranebound Carbonic anhydrase”, *J. Med. Sci.*, 85, (1980), 75.
- [73] Ryon, U. S., Whitney, P. L., and Ryen, J. W., “Localization of Carbonic anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture”, *J. Appl. Physiol.*, 53, (1982), 914.
- [74] Carter, N., Jeffrey, S., Shiels, A., Edward, Y., Tiplen, T., and Hopkinson, D.A., “Characterization of human Carbonic anhydrase III from skeletal muscle”, *Biochem. Genetics*, 17, (1979), 837.
- [75] Stams, T., Chen, Y., Bariack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P., and Christianson, D. W., *Protein Sci.* 7, (1998), 556.
- [76] Maren, T. H., “Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucoma research”, *Drug dev. Res.*, 10, (1987), 255.
- [77] Arslan, O., “Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds”, *Turk J. Med. Sci.*, 66 (9), (2001), 982-983.
- [78] Maren, T. H., Jankowska, L., Sanyal, G., and Edelhauser, H. F., “The transcorneal permeability of sulfonamide Carbonic anhydrase inhibitors and their effect on aqueous humor secretion”, *Exp. Eye. Res.*, 36, (1983), 457.
- [79] Roughtan, F. J. W. and Booth, V. H., “The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of Carbonic anhydrase”, *J. Biochem.*, 40, (1946), 319.
- [80] Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A., and Supuran, C. T., *Eur. J. Med.Chem.*, 31, (1996), 1001.
- [81] Edwin P. Hui, Anthony, T.C. Chan, Francesco Pezzella, Helen Turley, Ka-Fai To, Terence C. W., Poon, Benny Zee, Frankie Mo, Peter M. L. Teo, Dolly P. Huang, Kevin C. Gatter, Philip J. Johnson and Adrian L. Harris. Coexpression

of Hypoxia inducible Factors 1Y and 2Y, Carbonic anhydrase IX, and Vascular Endothelial Growth factor in Nasopharyngeal Carcinoma and Relationship to Survival. *Clinical Cancer Research*, Vol 8, (2002), 2595-2604.

- [82] Franchi M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava A., Pastorekova, S and Supuran C.T. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides, *J Enzyme Inhib. And Med. Chem.* Vol 184, (2003.) 333-338.
- [83] Kivela, A. Carbonic anhydrase in Normal and Neoplastic Gastrointestinal Tissues, with special emphasis on isoenzymes I, II, IX, XII and XIV (Review) Oululu University press (2003)
- [84] Olive L. P., Aquina-Parsons, A., MacPhail, H.S., Liao, S.Y, Raleigh, J.A., Lerman, I. M and Stanbridge J. E. Carbonic Anhydrase 9 as an Endogenous Marker for Hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Research*, 61, (2001), 8924-8929.
- [85] Türeci, Ö., Sahin, U., Vollmar, E. et al. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, (1998), 7608–7613.
- [86] Pastorekova, S and Pastorek, J. Cancer related Carbonic anhydrase Isozymes and Their Inhibition (Chapter 9, Carbonic anhydrase book) (2004)
- [87] M. S. Kyllonen, S. Parkkila, H. Rajaniemi, A. Waheed, J. H. Grubb, G. N. Shah, W. S. Sly, and K. Kaunisto. Localization of Carbonic Anhydrase XII to the Basolateral Membrane of H<sup>+</sup>-secreting Cells of Mouse and Rat Kidney J. *Histochem. Cytochem.*, 51(9), (2003), 1217 - 1224.
- [88] K. Chia S., Cwykoff C., Watson P.H., Han C., Leek R D., Pastorek J., Gather K.C, Ratcliffe, P. and Harris A L. Prognostic Significance of a novel Hypoxia-Regulated Marker, Carbonic Anhydrase IX, in invasive Breast carcinoma, *J. Clin. Oncology* vol 19, No 16, (2001), 3660-3668.
- [89] Karhumaa, P., Parkkila, S., Türeci, Ö. et al. Identification of carbonic anhydrase XII as the membrane isozyme expressed in the normal human endometrial epithelium. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, (2000), 68–74.
- [90] Luca Puccetti, Giuseppe Fasolis, Alessandro Cecchi, Jean-Yves Winum, Alessandro Gamberi, Jean-Louis Montero, Andrea Scozzafava and Claudiu T. Supuran, "Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating thioureido-sulfanyl scaffolds *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 15, Issue 9, (2005), 2359-2364.
- [91] Özen Özensoy, Luca Puccetti, Giuseppe Fasolis, Oktay Arslan, Andrea

- Scozzafava and Claudiu T. Supuran, "Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozymes IX and XII with a library of aromatic and heteroaromatic sulfonamides" .SHORTCOMMUNICATION Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 15, Issue 21, (2005), 4862-4866.
- [92] Kiichi Hirota and Gregg L. Semenza, "Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1". REVIEW ARTICLE Critical Reviews in Oncology/Hematology, Volume 59, Issue 1, (2006),15-26.
- [93] Švastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zát'ovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. FEBS Letts.,577, (2004), 439-445.
- [94] Vladimir Garaj, Luca Puccetti, Giuseppe Fasolis, Jean-Yves Winum, Jean-Louis Montero, Andrea Scozzafava, Daniela Vullo, Alessio Innocenti and Claudiu T. Supuran, "Carbonic anhydrase inhibitors: Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as inhibitors of the cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 15, Issue 12, (2005), 3102-3108 .
- [95] Francesco Mincione, Michele Starnotti, Emanuela Masini, Lucia Bacciottini, Chiara Scrivanti, Angela Casini, Daniela Vullo, Andrea Scozzafava and Claudiu T. Supuran "Carbonic anhydrase inhibitors: Design of thioureido sulfonamides with potent isozyme II and XII inhibitory properties and intraocular pressure lowering activity in a rabbit model of glaucoma Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 15, Issue 17, (2005),3821-3827.
- [96] Luca Puccetti, Giuseppe Fasolis, Daniela Vullo, Zahid H. Chohan, Andrea Scozzafava and Claudiu T. Supuran "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 15, Issue 12, (2005), 3096-3101.
- [97] Daniela Vullo, Alessio Innocenti, Isao Nishimori, Jaromír Pastorek, Andrea Scozzafava, Silvia Pastoreková and Claudiu T. Supuran, "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides—a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs? SHORTCOMMUNICATION Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 15, Issue 4, (2005), 963-969.
- [98] Lisa Simi, Giulia Venturini, Francesca Malentacchi, Stefania Gelmini, Matteo Andreani, Alberto Janni, Silvia Pastorekova, Claudiu T. Supuran, Mario Pazzagli and Claudio Orlando, "Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer" Lung Cancer, Volume 52, Issue 1, (2006), 59-66 .
- [99] Claudiu T. Supuran and Andrea Scozzafava Carbonic anhydrase inhibitors -Part

94. 1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents?European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 35, Issue 9, September 2000, Pages 867-874.

- [100] Juraj Kopacek, Monika Barathova, Franck Dequiedt, Janka Sepelakova, Richard Kettmann, Jaromir Pastorek and Silvia Pastorekova, "MAPK pathway contributes to density- and hypoxia-induced expression of the tumor-associated carbonicanhydraseIX" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, Volume 1729, Issue 1,( 2005), 41-49.
- [101] Philopot, F. J., and Philopot, J., "A modified colorimetric estimation of Carbonic anhydrase", *J.Biochem.*, 30, (1936), 2191.
- [102] Brinkman, R., "The occurrence of Carbonic anhydrase in lower marine animals", *J. Physiol.*, 80, (1934), 171.
- [103] Maren, C. H., "A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors", *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, (1960), 26.
- [104] Conroy, C. W., and Maren, T. H., "The determination of osteopetrotic phenotypes by selective inactivation of red cell Carbonic anhydrase isoenzymes", *Clin. Chim. Acta.*, 15, (1985), 3347.
- [105] Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., "Electrometric and colorometric determination of Carbonic anhydrase", *J. Biol. Chem.*, 176, (1948), 147.
- [106] Mc Intosh, J. E. A., "Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit", *J. Biochem.*, 120, (1970), 299.
- [107] Bollog, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., "Protein purification Methods", Second edition, Wiley-Liss, Inc. New York, (1996).
- [108] Scopes, R. K., "Protein Purification-Principles and Practice", 3rd Edition Springer- Verlag New York, (1982).
- [109] Keha, E. E., "Karbonik anhidraz enziminin saflastırılması için geliştirilmiş bir afinite kromotografisi metodu", Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi,Erzurum, (1981).
- [110] John F. Robyt, Bernard J. White, "Biochemical Techniques Theory and Practice", Waveland Press, Inc., (1987).
- [111] Cuatrecasas, P., "Protein Purification by Affinity Chromatography, derivatizations of agaroze and polyacrylamide beads", *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 3059.
- [112] Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Özdemir, and H., Küfrevioglu, I. Ö., "A New Method for the Purification of Carbonic anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography", *Turk J. Med Sci.*, 26, (1995), 163-166.

- [113] Falkbring, S. O., Göthe, P. O., Nyman, L., and Parath, J., "Affinity Chromatography of carbonic anhydrase", FEBS. Letter, 24, (1972), 229.
- [114] Whitney, P. I., "Affinity Chromatography of Carbonic anhydrase", Anal. Biochem., 64, (1974), 267.
- [115] Osborne, W. R., and Tashian, R. E., "An Improved method for the Purification of Carbonic anhydrase Isoenzymes by Affinity Chromatography", Anal. Biochem., 64, (1975), 297.
- [116] Johansen, J. T., "Isolation of Human Carbonic anhydrase Band C and apocarbonic anhydrase by Affinity Chromatography", Carlsberg Res. Commun., 41, (1976), 73.
- [117] Ozensoy, O., Arslan, O., Oznur, S. "A new method for purification carbonic anhydrase by affinity chromatography" Biochemistry (Moscow), Vol. 69, No. 2, (2004), 216-219.
- [118] Kaul, K., and Mattiasson Bo., "Affinity Elution of almond Oxynitrilase from an Affinity Support Based on EUPERG?T C", Biotechnology and Applied Biochemistry, 9, (1987), 294-302.
- [119] Fleminger, G., Wolf, T., Solomon, B., and Hadas, E., "The effect of Polyethylene Glycol on the Non-specific Adsorption of Proteins to EUPERGIT C and Agarose", J. Chromatogr., 510, (1990), 310-319.
- [120] Fassina, G., "Oriented Immobilization of Peptide Ligands on solid Supports", J. Chromatogr., 591 (1-2), (1992), 99-106.
- [121] Kasche, V., Loeffler, F., Scholzen, T., Krämer, D. M., and Boller, T., "Rapid Protein Purification Using Phenylbutylamine-EUPERG?T : A novel Method for Large-Scale Procedures", J. Chromatogr., 510, (1990), 149-154.
- [122] <http://www.serva.de/products/sheets/35076-in.html> (15.02.2006)
- [123] Vullo, D., "REGULATORS OF ACTIVITY FOR CARBONIC ANHYDRASE: SYNTHESIS, DEVELOPMENT AND ASSAY OF INHIBITORS AND ACTIVATORS" Università degli Studi di Firenze Facoltà di S.F.M.N. – Dipartimento di Chimica Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche XVI ciclo, Dottora tezi, (2004).
- [124] Arslan, O., Nalbantoglu, B., Demir, N., Özdemir, and H., Küfrevioglu, I. Ö., "A New Method for the Purification of Carbonic anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography", Turk J. Med Sci., 26, (1995), 163-166.
- [125] Piritta Hynninen, Jonna M Hämäläinen, Silvia Pastorekova, Jaromir Pastorek, Abdul Waheed, William S Sly, Eija Tomas, Pertti Kirkinen, and Seppo Parkkila, "Transmembrane carbonic anhydrase isozymes IX and XII in the

female mouse reproductive organs” *Reprod Biol Endocrinol.*; 2, (2004), 73.

- [126] Warburg, O., and Christian, W., “Isolierung und Kristallization des Gärungsferments Enolase”, *Biochem.*, 310, (1941), 384.
- [127] Arslan, O., “Glaucoma Hastalığı Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Etkilerinin Arastırılması”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [128] Clanis, Y. D., “Matrix Evaluation for Preparative High-Performance affinity Chromatography”, *J. Chromatogr.*, 407, Pt. A, (1990), 179-187.
- [129] Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, (1976), 248.
- [130] Laemelli, D. K., “Cleavage of structural pteins during in assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, London, (1970), 227-680.
- [131] Douglas A. Whittington, Abdul Waheed, Barbara Ulmasov, Gul N. Shah, Jeffrey H. Grubb, William S. Sly, and David W. Christianson “Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells”, 10.1073/pnas.161301298 *Biochemistry* vol. 98 (2001)no. 17.
- [132] Frolova, L.Y., Meldrays, Y.A., Kochkina, L.L., Giller, S.A., Eremeyev, A.V., Grayevskaya, N.A. and Kisselev, L.L., “DNA-polymerase inhibitors. Rifamycin derivatives”, *Nucleic Acids Research*, (1977) 4(3), 523.
- [133] Spisani, S., Traniello, S., Onori, A.M., Rizzuti, O., Martuccio, C. and Callai, L., “3-(Carboxylathio) Rifamycin San d SV Derivatives Inhibit Human Neuthrophil Functions”, *Inflammation*, (1998) 22(5), 459.
- [134] Çoban, A.T., Nalbantoglu, B., Çıl, M.Y., Özdemir, H., Küfrevioglu, O.I., “Investigation of the Inhibition Effects of Some Antibiotics on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase Isozymes”, *Tr. J. of Medical Sciences*, (1998) 28, 407.
- [135] Beydemir, S., Çiftçi, M., Küfrevioglu Ö.I, Büyükokuroglu, ME., “Effects of Gentamicin Sulfate on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in Vitro and from Rat Erythrocytes in Vivo”,(2002) *Biological-Pharmaetuical Bulletin*, 25(8) 966.
- [136] Sinan, S., *INSAN SERUM PARAOKSONAZ ENZIMININ (PON1) EKSPRESSİYONU, SAFLASTIRILMASI VE BAZI İLAÇLARIN ENZİM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARASTIRILMASI*, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, 2005.
- [137] Beydemir, S., Çiftçi, M., Özmen, I, Okuroglu, M.E.B., Özdemir, H. And



Küfreviöglu, Ö.I., “Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in vitro and from Rat Erythrocytes in vivo”, Pharmacological Research, (2000) 42, 187.

- [138] Çiftçi, M., Küfreviöglu, Ö.I., Gündoödu, M. and Özmen, I., “Effects of Some Antibiotics on Enzyme Activity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocyte”, Pharmacol Res., (2000) 41, 109.