

T.C.  
KÜTAHYA DUMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**GLUKOZAMİN VE GLUKOZAMİN TÜREVLERİNİN KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Danışman:  
Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Hazırlayan:  
Ayşenur KOÇ

Ağustos-2020

## KABUL VE ONAY

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

Ayşenur KOÇ tarafından hazırlanan “Glukozamin ve Glukozamin Türevlerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması, jürimiz tarafından

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

.../.../2020

Tez Jurisi	İmza	
	Kabul	Red
Prof. Dr. Metin BÜLBÜL (Danışman) Biyokimya Bölümü, Dumlupınar Üniversitesi		
Doç. Dr. Laçine AKSOY Kimya Bölümü, Afyon Kocatepe Üniversitesi		
Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA Biyokimya Bölümü, Dumlupınar Üniversitesi		

**Onay**

Prof. Dr. Şahmurat ARIK  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

İmza

## BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığım “Glukozamin ve Glukozamin Türevlerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi” adlı çalışmanın öneri aşamasından sonuçlandığı aşamaya kadar geçen süreçte bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle uyduğumu, tez içindeki tüm bilgileri bilimsel ahlak ve gelenek çerçevesinde elde ettiğimi, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığımı, bu çalışmamda doğrudan veya dolaylı olarak yaptığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu beyan ederim.

.../.../2020

Ayşenur KOÇ

İmza

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı Adı : Koç, Ayşenur  
Doğum tarihi ve yeri : 13/ 09/ 1996 ve Soma/Manisa  
E-posta : kcaysenur@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Dumlupınar Üniversitesi-Biyokimya	Ağustos-2020
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi-Biyokimya	Haziran-2018
Lise	Gürçeşme Anadolu Lisesi	Haziran-2014

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016	İzmir Ticaret Borsası	Stajyer
2017	Tunçbilek Termik Santrali	Kimyager
2018	Karaköy Ortaokulu	Fen Bilimleri Öğretmeni
2019	Domaniç Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

### Yabancı Dil-

İngilizce-B1 seviyesi

### Yayımlar

(M. Bülbül, A. Koç, E. Tunca), Glukozamin türevlerinin karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi, III. Uluslararası Hipokrat Tıp ve Sağlık Bilimleri Kongresi, 6 Mart 2020, Ankara (Poster Sunumu)

## ÖZET

### GLUKOZAMİN VE GLUKOZAMİN TÜREVLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

KOÇ, Ayşenur

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Ağustos, 2020, 75 sayfa

Karbonik anhidraz, (E.C. 4.2.1.1) merkezinde  $Zn^{+2}$  iyonu bulunan bir enzimdir. Omurgalılarda  $CO_2$ , karbonik anhidraz enziminin substratıdır. Karbonik anhidraz enzimi *in vitro* daki bikarbonat tampon sistemi ve  $CO_2$  hidrasyonunu sağlayan önemli bir enzimdir. Reaksiyon çift yönlüdür. Denge reaksiyonudur. Karbonik anhidrazın çok çeşitli görevleri vardır. Bu görevler arasında lipidlerin sentezi, gözdeki elektrolitlerin salınımı, kalsifikasyon ve vücuda alınan maddelerin detoksifikasyonu sayılabilir.

Glukozamin, eklemlerdeki kıkırdağın bir bileşeni olan amino şekerdir. Glukozamin vücudumuz için hayati bir öneme sahiptir. Hekzoamin olarak da bilinen glukozaminin formülü  $C_6H_{13}NO_5$ 'dir. Glukozamin yetişkinler tarafından kullanılan en iyi eklem iltihabı takviyelerinden biridir. Destek madde olarak kullanılan glukozaminin, glukozamin sülfat formunda alınması daha yararlıdır. Çünkü sülfat vücudumuzda kıkırdak oluşumuna yardımcı olmaktadır. Ayrıca glukozamin kondroitin ile de kombine şeklinde kullanılabilir. Çünkü kondroitin eklem kıkırdağının su tutmasını sağlar.

Bu çalışmada glukozamin ve türevlerinin karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkileri ve glokom tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. İlk olarak, insan eritrositlerinden (hCA I ve hCA II) elde edilen CA izoenzimleri afinite kromatografisi ile birbirinden ayrılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre glukozamin ve türevleri (bitkisel glukozamin, glukozamin sülfat, glukozamin kondroitin MSM) CA enzimleri üzerine aktivasyon etkisi vardır. Bu yüzden glukozamin ve türevlerinin glokom tedavisi için kullanılmaya aday olmadığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Karbonik Anhidraz, İnhibisyon, Afinite Kromatografisi, Glukozamin, Enzim Aktivitesi

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF THE EFFECT OF GLUCOSAMINE AND  
GLUCOSAMINE DERIVATIVES ON  
CARBONIC ANHYDRASE ENZYME****KOÇ, Ayşenur****Master Thesis, Department of Biochemistry****Thesis Supervisor: Prof Dr. Metin BÜLBÜL****August, 2020, 75 pages**

Carbonic anhydrase (E.C. 4.2.1.1) is an enzyme with  $Zn^{+2}$  at its center. In vertebrates,  $CO_2$  is the substrate for the carbonic anhydrase enzyme. Carbonic anhydrase enzyme is an important enzyme that provides bicarbonate buffer system and  $CO_2$  hydration in vitro. The reaction is bi-directional. It is a balance reaction. Carbonic anhydrase has a wide variety of functions. These tasks include the synthesis of lipids, the release of electrolytes in the eye, calcification, and detoxification of substances taken into the body.

Glucosamine is an amino sugar that is a component of cartilage in joints. Glucosamine is vital to our body. The formula of glucosamine, also known as hexoamine, is  $C_6H_{13}NO_5$ . Glucosamine is one of the best arthritis supplements used by adults. It is more beneficial to take glucosamine, which is used as a supplement, in the form of glucosamine sulphate. Because sulfate helps the formation of cartilage in our body. In addition, glucosamine can be used in combination with chondroitin. Because chondroitin allows joint cartilage to retain water.

In this study, inhibition effects of glucosamine and its derivatives on carbonic anhydrase enzyme and its usability in glaucoma treatment were investigated. First, CA isoenzymes obtained from human erythrocytes (hCA I and hCA II) were separated from each other by affinity chromatography.

According to the data obtained in this study, glucosamine and its derivatives (vegetable glucosamine, glucosamine sulfate, glucosamine chondroitin MSM) have an activation effect on CA enzymes. Therefore, it has been determined that glucosamine and its derivatives are not candidates for glaucoma treatment.

**Keywords:** Carbonic Anhydrase, Inhibition, Affinity Chromatography, Glucosamine, Enzyme Activity

## ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez Çalışması sırasında, kendimi daha da geliştirmeme katkı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Metin BÜLBÜL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreçte benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA' ya ayrıca manevi desteğini her an yanımda hissettiğim aileme ve arkadaşım Ergün Samet ÖZKARA'ya sevgi ve saygılarımı sunarım.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>GÖRSELLER LİSTESİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Enzimler .....	1
1.1.1. Enzimlerin Özellikleri.....	2
1.1.2. Enzim Kinetiği.....	3
1.1.2.1. Enzim Hızına Etki Eden Faktörler .....	3
1.1.2.1.1. Sıcaklık .....	3
1.1.2.1.2. pH .....	4
1.1.2.1.3. Enzim Konsantrasyonu.....	4
1.1.2.1.4. Substrat Konsantrasyonu .....	5
1.1.2.1.5. Substrat yüzey alanı.....	6
1.1.2.1.6. Zaman .....	6
1.1.2.1.7. Reaksiyon ürünleri .....	6
1.1.2.1.8. Fiziksel etkenler .....	7
1.1.2.1.9. Hormonlar .....	7
1.1.2.1.10. İnhibitörler .....	7
1.1.2.1.11. İyonik Şiddet .....	8
1.1.2.1.12. Aktivatörler .....	8
1.1.3. Enzim aktivitesi bulma metotları .....	9
1.1.3.1. Spektrofotometrik metot .....	9
1.1.3.2. Monometrik metot.....	9
1.1.3.3. Thunberg metot .....	9
1.1.3.4. Elektrot metot.....	10



**Sayfa**

1.1.3.5. Polimerik metot.....	10
1.1.3.6. Kromatografik metot.....	10
1.1.3.7. Kimyasal tayin metot .....	10
1.1.4. Enzim inhibisyonu .....	11
1.1.4.1. Dönüşümlü İnhibisyon.....	11
1.1.4.1.1. Yarışmalı İnhibisyon .....	11
1.1.4.1.2. Lineer Karışık Tip İnhibisyon .....	12
1.1.4.1.3. Yarışmasız İnhibisyon.....	12
1.1.4.2. Dönüşümsüz İnhibisyon.....	13
<b>2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ (CA: karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1)...14</b>	
2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Solunumdaki Önemi .....	14
2.2. Terapötik Hedef Olarak Karbonik Anhidraz.....	15
2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	15
2.3.1. Alfa/ $\alpha$ sınıfı karbonik anhidrazlar.....	18
2.3.2. Beta/ $\beta$ sınıfı karbonik anhidrazlar .....	18
2.3.3. Gama/ $\gamma$ sınıfı karbonik anhidrazlar .....	18
2.4. Alfa Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	19
2.5. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri .....	20
2.6. Karbonik Anhidrazın İnhibitörler ile Etkileşimi .....	21
2.7. Karbonik Anhidrazın Aktivatörler ile Etkileşimi .....	22
<b>3. GLUKOZAMİN.....24</b>	
3.1. Glukozaminin Özellikleri .....	24
3.2. Glukozaminin Önemi .....	25
3.3. Glukozaminin Uygulama Alanları .....	26
3.4. Glukozamini Kimler İçmeli, İçebilir? .....	27
3.5. Glukozaminin Başka İlaçlar ile Etkileşimi.....	27

**Sayfa**

3.6. Glukozaminin Doğal Besinlerden Temini.....	27
3.7. Glukozaminin Formları .....	28
3.7.1 Glukozamin Kondroitin .....	28
<b>4. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>30</b>
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
4.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar .....	30
4.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	31
4.4. Metotlar .....	32
4.4.1. Protein tespiti .....	32
4.4.1.1. Nitel Protein Tespiti .....	32
4.4.1.2. Bradford (coomasie blue) metodu ile nicel protein tespiti.....	32
4.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tespiti .....	33
4.4.2.1. CO <sub>2</sub> - Hidrataz aktivitesi tespiti.....	33
4.4.2.2. Esteraz aktivitesi tespiti.....	33
4.4.3. Afinite jelinin oluşturulması .....	34
4.4.3.1. Sefaroz 4B matriks üzerine afinite jelinin oluşumu.....	34
4.4.3.2. Sefaroz 4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin bağlanması.....	35
4.4.3.3. Sülfanilamid tutundurulması.....	35
4.4.3.4. Afinite Kromatografisi .....	36
4.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin ayrılması .....	36
4.4.4.1. Hemolizat eldesi.....	36
4.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna aktarılması ve enzimin ayrılması.....	37
4.4.4.3. Diyaliz işlemi .....	38
<b>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>39</b>
5.1. İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması Sonucu hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi Sonuçları.....	39

**Sayfa**

5.2. Glukozamin ve Türevlerinin İnsan Eritrosit hCA I Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi .....	41
5.2.1. Bitkisel glukozaminin insan eritrosit hCA I enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi.....	41
5.2.2. Glukozamin sülfatın insan eritrosit hCA I enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi.....	42
5.2.3. Glukozamin kondroitin MSM'nin insan eritrosit hCA I enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi .....	43
5.3. Glukozamin ve Türevlerinin İnsan Eritrosit hCA II Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İn Vitro Olarak İncelenmesi .....	45
5.3.1. Bitkisel glukozaminin insan eritrosit hCA II enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi.....	45
5.3.2. Glukozamin Sülfatın insan eritrosit hCA II enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi.....	46
5.3.3. Glukozamin Kondrotin MSM'nin insan eritrosit hCA II enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi .....	47
<b>6. SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>52</b>

**TABLÖLAR LİSTESİ****Sayfa**

<b>Tablo 5.2:</b> Bitkisel Glukozaminin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	42
<b>Tablo 5.4:</b> Glukozamin Sülfatın hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	43
<b>Tablo 5.6:</b> Glukozamin Kondroitin MSM' nin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	44
<b>Tablo 5.8:</b> Bitkisel Glukozaminin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	45
<b>Tablo 5.10:</b> Glukozamin Sülfatın hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	46
<b>Tablo 5.12:</b> Glukozamin Kondroitin MSM'nin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi ...	47



## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 1.1: Reaksiyon Hızı- Sıcaklık Grafiği .....	4
Şekil 1.2: pH-Tepkime Hızı Grafiği .....	4
Şekil 1.3: Enzim Konsantrasyonu-Reaksiyon Hızı Grafiği.....	5
Şekil 1.4: $V_0$ - Substrat Derişimi Grafiği.....	5
Şekil 1.5: Substrat Yüzeyi-Tepkime Hızı Grafiği .....	6
Şekil 1.6: Enzim-Substrat İlişkisi .....	7
Şekil 1.7: Enzim-Substrat ve Enzim-İnhibitör İlişkisi Gösterilmiştir. ....	8
Şekil 1.8: Aktivatör-Tepkime Hızı Grafiği.....	8
Şekil 1.9: Yarışmalı İnhibisyon Mekanizması.....	12
Şekil 1.10: Yarı-Yarışmalı İnhibisyon Mekanizması .....	12
Şekil 1.11: Yarışmasız İnhibisyon Mekanizması .....	13
Şekil 2.1: Piperidin Yapısı.....	16
Şekil 2.2: Glutamin Yapısı .....	16
Şekil 2.3: Sikloheksanamin Yapısı .....	17
Şekil 2.4: İmidazol Yapısı .....	17
Şekil 2.5: Sülfonamid Türevi.....	17
Şekil 2.6: Piridin Yapısı.....	17
Şekil 2.7: Glukozamin Yapısı.....	17
Şekil 2.8: Asetazolamid Yapısı.....	17
Şekil 2.9: Dorzolamid Yapısı .....	17
Şekil 2.10: Brinzolamid Yapısı.....	17
Şekil 2.11: Pazopanib Yapısı.....	17
Şekil 2.12: CO <sub>2</sub> Taşınımı .....	19
Şekil 3.1: Glukozamin Yapısı.....	24

**Sayfa**

<b>Şekil 4.1:</b> Sefaroz 4B'ye Tirozin Bağlanma Reaksiyonu .....	35
<b>Şekil 4.2:</b> Afinite Jelinin Sentez Reaksiyonu .....	36
<b>Şekil 4.3:</b> Hemolizatın Kolona Tatbik Edilmesi.....	37
<b>Şekil 4.4:</b> Diyaliz İşleminin Uygulanması.....	38
<b>Şekil 6.1:</b> Glukozamin Kondroitin MSM'nin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	50
<b>Şekil 6.2:</b> Glukozamin Kondroitin MSM' nin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	50
<b>Şekil 6.3:</b> Glukozamin Sülfatın hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	50
<b>Şekil 6.4:</b> Glukozamin Sülfatın hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	50
<b>Şekil 6.5:</b> Bitkisel glukozaminin hCA I hidrataz aktivitesine etkisi.....	51
<b>Şekil 6.6:</b> Bitkisel Glukozaminin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	51

**GÖRSELLER LİSTESİ****Sayfa**

<b>Görsel 3.2:</b> Glukozaminin İnsan Üzerindeki Etki Noktası.....	28
<b>Görsel 5.1:</b> Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Fotoğrafi.....	41
<b>Grafik 5.3:</b> Bitkisel Glukozaminin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	42
<b>Grafik 5.5:</b> Glukozamin Sülfatın hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	43
<b>Grafik 5.7:</b> Glukozamin Kondroitin MSM' nin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi ....	44
<b>Grafik 5.9:</b> Bitkisel Glukozaminin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi.....	45
<b>Grafik 5.11:</b> Glukozamin Sülfatın hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi .....	46
<b>Grafik 5.13:</b> Glukozamin Kondroitin MSM'nin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi..	47

**SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ****Simgeler****Açıklama**

L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar

**Kısaltmalar****Açıklama**

CA	Karbonik anhidraz enzimi
EC	Enzim komisyon numarası
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EU	Enzim ünitesi
hCA I	Karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	Karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
G	Glukozamin
GS	Glukozamin Sülfat
GM	Glukozamin Kondroitin Metil Sülfonil Metan



## 1. GİRİŞ

Enzimler hücrenin metabolizmasını oluşturan binlerce kimyasal reaksiyonu idare eden, ileri seviyede organize olmuş protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Enzimler proteinler arasında özel bir düzeni olan moleküllerdir ama her protein enzim değildir. Bazı grup katalitik RNA molekülünü saymazsak enzimlerin tamamı protein yapısındadır. Enzimler özelleşmiş büyük protein molekülleridir. Enzimde yer alan aminoasitlerin sıralanışı, enzimin belirli konformasyon ve üç boyutlu şekil oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Enzimin konformasyonu sadece biyolojik aktivite için değil metabolik olaylarda proteinin görevinin belirlenmesi için de çok önemlidir (Cengiz ve Cengiz, 1994; Palmer, 1981).

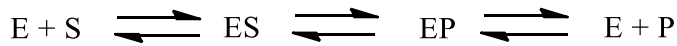
### 1.1. Enzimler

Hayat, spesifik ve güçlü katalizörler olan enzimlerin varlığına bağlıdır. Canlı sistemlerinde binlerce enzim bulunur ve canlılar için enzimler önemlidir. Enzimler inorganik katalizörlere oranla aktivasyon enerjisini iyi bir şekilde düşürürler. Enzimler metabolik reaksiyonları muhteşem bir şekilde hızlandırır. Basamaklı reaksiyonların yüzlercesini katalizler, besin moleküllerini parçalar, kimyasal enerjiyi korurlar ve ürünlerden biyolojik makromoleküller oluştururlar. Bazı enzimlerin aktive olması için başka kimyasal gruba ihtiyacı yoktur. Bazıları ise aktive olmak için kofaktör denilen kimyasal bileşiklere ( $Fe^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ) ihtiyaç duyarlar. Enzimde kimyasal bileşik değil de organik bir grup bağlı ise buna koenzim adı verilir. Enzimlerde diyaliz edilemeyen ve ısıya dayanıklı olmayan protein kısmına apoenzim, enzim ile koenzim kompleksine ise holoenzim denir (Baban, 1980).

Bir koenzim veya metal iyonu enzim proteinine güçlü bağlardan biri olan kovalent bağ ile bağlandığında prostetik grup olarak adlandırılır. Metabolizma için gerekli olan reaksiyon enzimin aktif bölge dediğimiz iç kısmında gerçekleşmektedir. Aktif bölgeye bağlanan ve enzimin etki ettiği maddeye substrat denir. Hücre metabolizmasının düzenlenmesi oldukça zor ve uğraştırıcı bir olaydır. İnsanda gerçekleşen bütün biyokimyasal reaksiyonların tümüne metabolizma denir. Metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran biyokatalizörler enzimlerdir. Bir enzimin ürünü diğer bir enzimin substratı olmakla birlikte hücrede bütün ara metabolitlerin belli konsantrasyonda tutulması

sağlanmalıdır. Enzimler bir bakıma da homeostaziyi (iç denge) sağlar. Enzimlerin birbirleriyle etkileşimi metabolizmanın düzenlenmesi için önemlidir.

Basit bir enzimatik tepkime;



şeklinde ifade edilebilir.

Burada E, S ve P sırasıyla enzim, substrat ve ürünü gösterir. ES ve EP enzimin substrat ve ürünle yapmış olduğu geçiş kompleksleridir. Kataliz reaksiyonunu anlamak için önce reaksiyon dengesi ve reaksiyon hızı arasındaki farkı anlamak gerekir. Enzimin görevi biyokatalizör olduğuna göre sadece reaksiyonu hızlandırır. Enzimler reaksiyonun dengesini etkilemez (Buker, Boriack-Sjodin ve Copeland, 2019).

### 1.1.1. Enzimlerin Özellikleri

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimlerin birçok özelliği bulunmaktadır. Bunlar;

- 1- Enzimler diğer reaksiyonlara göre reaksiyon hızlarını daha fazla arttırlar. ( $10^5$ - $10^{17}$  kat fazla)
- 2- Enzim reaksiyonlarında verim %100'dür. Hiçbir şekilde yan metabolit oluşmaz.
- 3- Enzimler canlı hücrelerce biyolojik şartlarda, genetik bilgi sayesinde sentezlenir. Fakat aktivite göstermek için sadece hücre içinde bulunmaları gerekmez. *In vitro* ortamda da yani hücre dışında da aktivite gösterirler.
- 4- Enzimler substratına göre büyük moleküllerdir.
- 5- Enzimlerin katalitik aktivite göstermeleri için uygun üç boyutlu yapı kazanmaları gerekir. Bu yüzden enzimler proteinlerin en kompleks yapılarıdır. Her enzim özelleşmiş gruplar ihtiva eder.
- 6- Protein yapısında olmayan enzimler de vardır.
- 7- Enzim reaksiyonları çift yönlü özelliktedir. Yani denge reaksiyonudur.
- 8- Enzimler biyokimyasal reaksiyonları çok az enerji ile vücut sıcaklığında gerçekleştirirler.

9- İlk olarak genetik bilgi ile saf protein sentezlenir. Ama protein sentezlendikten sonra katlanarak üç boyutlu yapı kazanır ve yapılarına çeşitli kofaktörler eklenir. Enzimin üç boyutlu yapısı bozulursa aktivite göstermez. Bu olaya enzim denatürasyonu denir (Cengiz ve Cengiz, 1994).

Bu yüzden enzim deneyleri dikkatli çalışılmalıdır.

### **1.1.2. Enzim Kinetiği**

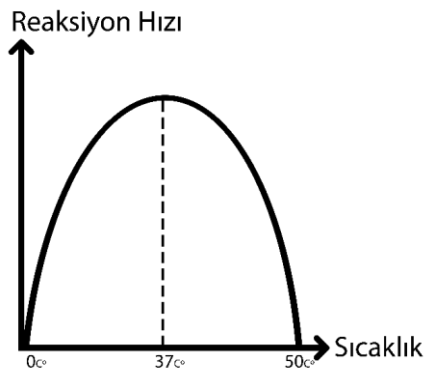
Enzim katalizli reaksiyonların canlı sistemler için önemi büyüktür. Enzimler reaksiyon hızlarına etki eder. Proteinlerin üç boyutlu yapısı önemli bilgiler verir. Enzimler ile hızlanan biyokimyasal tepkimelerin tümüne enzim hızı denir. Enzim hızı tepkimelerinde enzim hızı ölçülmektedir. Ortam şartlarının ve tepkime koşullarının değiştirilmesiyle reaksiyonunun nasıl etkileneceği araştırılır. Enzimin katalitik işleyişini anlamak için enzim kinetiği, enzimin metabolizmadaki görevi, aktivitesinin nasıl ayarlanması gerektiği ve ilaç ya da başka bir maddenin enzimi nasıl inhibe ettiği ya da aktive ettiği incelenir (Cleland, 2009).

#### **1.1.2.1. Enzim Hızına Etki Eden Faktörler**

##### **1.1.2.1.1. Sıcaklık**

Her enzim belli sıcaklıkta daha iyi bir hız ile çalışır. Tüm enzimler özeldir ve her enzim için uygun olan sıcaklık farklıdır. Enzimin en iyi etki ettiği sıcaklık değerine optimum sıcaklık değeri denir. Genelde hayvansal organizmalarda enzimin, optimum sıcaklık değeri yani en verimli olduğu sıcaklık 36-37 °C'dir. Bitkilerde ise bu sıcaklık 50-55 °C'lere kadar yükselebilir. Ortam uygun sıcaklık üzerine çıkarsa enzim sıcaklık artışıyla denatüre olur ve aktivite göstermez. Ayrıca bazı enzimler 60 °C üstünde denatüre olurlar (Aguiar, Yamashita ve Gut, 2012).

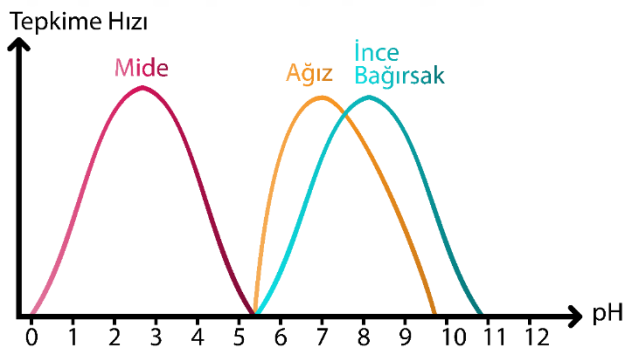
**Şekil 1.1:** Reaksiyon Hızı- Sıcaklık Grafiği



### 1.1.2.1.2. pH

Enzimler değişik pH' larda farklı hızlarla reaksiyonları katalizler. Her enzimin kendisine özel ve en iyi çalıştığı bir pH değeri bulunur. pH derecesine enzimin optimum pH'sı denir. Enzimin optimal pH'sının üzerinde de altında da enzimin aktivitesi azalır. Enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin yan grupları ortamın pH'sından etkilenebilmektedir (Cleland, 2009).

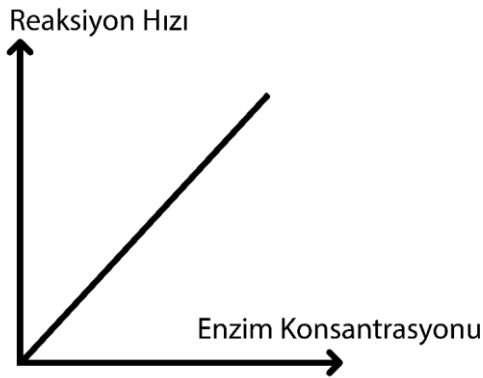
**Şekil 1.2:** pH-Tepkime Hızı Grafiği



### 1.1.2.1.3. Enzim Konsantrasyonu

Enzim tepkimesinin hızı bulunduğu yerdeki enzim oranıyla birlikte artar.

Şekil 1.3: Enzim Konsantrasyonu-Reaksiyon Hızı Grafiği

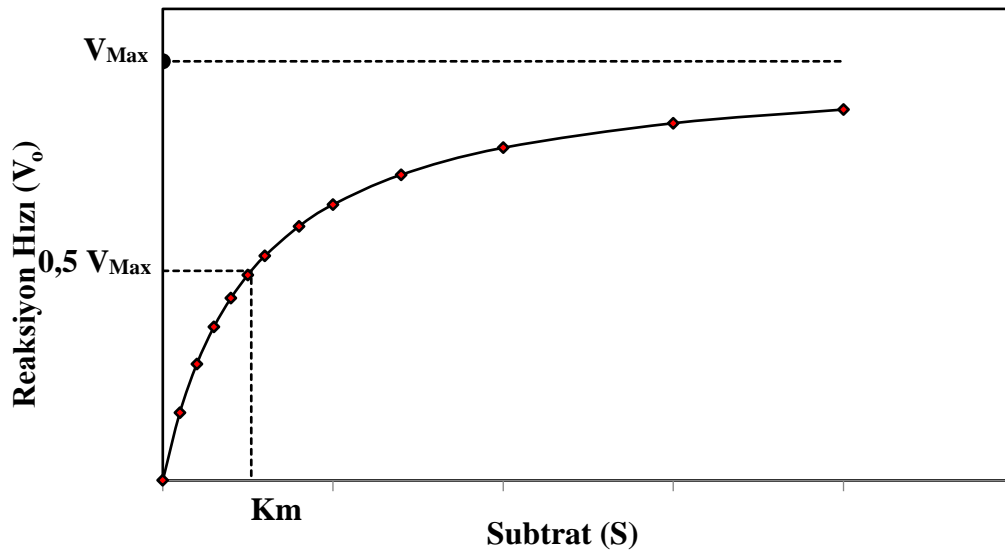


#### 1.1.2.1.4. Substrat Konsantrasyonu

Belli orandaki enzimin tepkime hızı ilk olarak substrat derişimine göre artar. İlk olarak bu ilişkinin grafiği lineer giderken bir süre sonra hiperbolik bir hal almıştır. Lineer giden enzimatik tepkime bu şekilde birincil değerde hızlanmışken ikinci değerde ise sabit hıza ulaşmakta ve reaksiyon hızı değişmemiş, sabit devam etmektedir. Böylece sıfırcıl değerde hızı vardır. Hız, substrat derişiminin artmasıyla en yüksek hıza ulaşmıştır buna maksimal hız ( $V_{max}$ ) denir. Fakat maksimal hıza ulaştıktan sonra enzim artık substratı ile doyunluğa ulaşmıştır. Bu noktadan sonra substrat miktarı artsa bile enzime yani reaksiyon hızına etki etmeyecektir. Grafik sabit devam etmektedir (Baban, 1980).

Substrat konsantrasyonunun hız etkisi;

Şekil 1.4:  $V_0$ - Substrat Derişimi Grafiği



Enzimatik reaksiyon hızı maksimum iken enzimin yarısına bağlı olarak substrat derişimine Michealis-Menten sabiti denir. Bu değer  $K_m$  ile gösterilir.  $K_m$  proteinin bir karakteristik özelliğidir.  $K_m$  enzimin substrata ilgisi ile ilgilidir (Leow ve Chan, 2019; Menten ve Michaelis, 1913).

Enzim çok düşük  $K_m$ 'e sahipse substrata karşı ilgisi fazladır. Bir enzim yüksek  $K_m$ 'e sahipse substrata karşı ilgisi azdır.

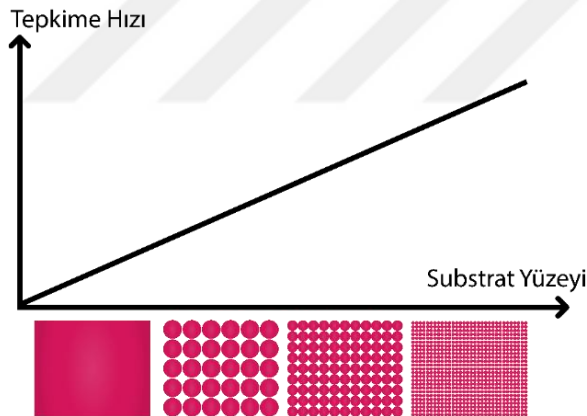
$$K_m = V_{max} / 2 \text{ dir.}$$

Her enzimin her bir substratı için farklı bir  $K_m$  değeri vardır.

#### 1.1.2.1.5. Substrat yüzey alanı

Enzim reaksiyonunda substratın yüzey alanı arttıkça tepkime hızı da artar (Buker ve diğerleri, 2019).

**Şekil 1.5:** Substrat Yüzeyi-Tepkime Hızı Grafiği



#### 1.1.2.1.6. Zaman

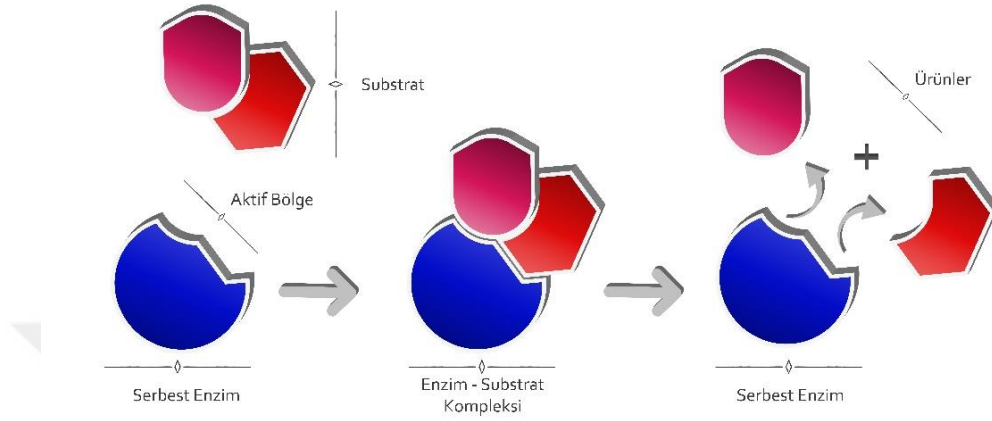
Enzimin katalitik aktivitesi kaybolmadıkça substrat ile etkileşerek ürün oluşumu zamanla doğru orantılı olarak artar.

#### 1.1.2.1.7. Reaksiyon ürünleri

Metabolitlerin hücre ortamında birikimi enzimlerin aktivitesini azaltmaktadır. Bu nedenle metabolitlerin hızlıca ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Eğer uzaklaştırılmaz ise

bazı metabolitler substrata benzerliğinden dolayı enzim ile tekrar kompleks oluşturabilmektedir. Sonuç olarak iki yönlü reaksiyonun ters yönde ilerlemesine neden olurlar (Chance, 1957).

**Şekil 1.6:** Enzim-Substrat İlişkisi



#### 1.1.2.1.8. Fiziksel etkenler

Enzimler bazı fiziksel etkenler yüzünden denatüre olabilmektedir. Enzim çözeltisini bazı ışınlar (UV), hızlı çalkalama, fazla ısı, asit-baz eklemesi, kimyasal çözeltiler (guanidin klorür, sodyum dodesil sülfat, aseton, alkol gibi çözücüler) kötü etkilemektedir. Bu yüzden enzim aktivitesi azalmaktadır.

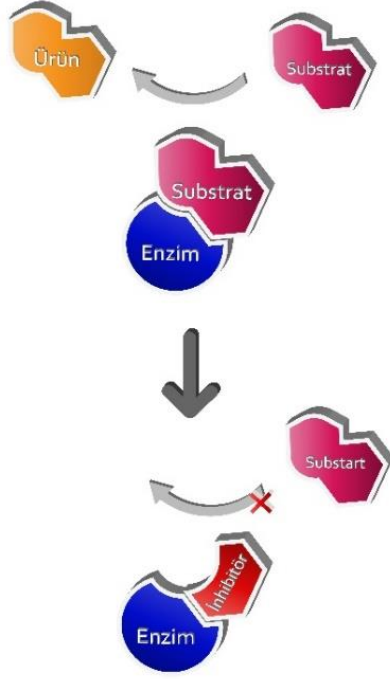
#### 1.1.2.1.9. Hormonlar

Bazı hormonlar enzim aktivitesi üzerine inhibitör olarak etki eder. Yapılan araştırmalarda, demir eksikliğinde 5- deiodinaz enzim aktivitesinin azalması tiroid bezlerinden salgılanan TSH hormonu ile ilgili olduğu bilgisine saptanmıştır.

#### 1.1.2.1.10. İnhibitörler

İnhibitörlerin enzime oldukça önemli etkileri vardır. Enzim aktivitesini ortadan kaldıran ya da enzimin aktivitesini yavaşlatan maddelere inhibitör denir. Antibiyotikler, ilaçlar, zehirler enzim üzerine inhibitör etki gösterirler (Cer, Mudunuri, Stephens ve Lebeda, 2009).

**Şekil 1.7:** Enzim-Substrat ve Enzim-İnhibitör İlişkisi Gösterilmiştir.



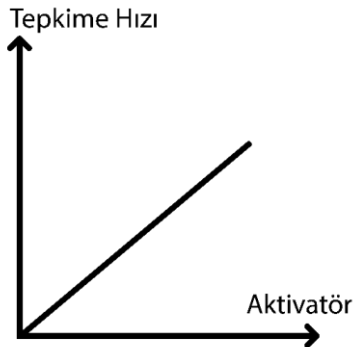
#### 1.1.2.1.11. İyonik Şiddet

Enzimlerin protein kısmındaki yan grupları asidik, bazik, pozitif yüklü ya da negatif yüklü olabilmekte ve iyonik şiddetten etkilenmektedir.

#### 1.1.2.1.12. Aktivatörler

Enzim reaksiyonlarının hızını arttıran maddelere aktivatör denir. Kofaktörler genellikle aktivatör görevi görmektedir. Çünkü kofaktörler ısıya dayanıklıdır.

**Şekil 1.8:** Aktivatör-Tepkime Hızı Grafiği





### 1.1.3. Enzim aktivitesi bulma metotları

Enzim aktivitesi, bir çözelti veya doku, kan ekstraktı içindeki enzim miktarının bulunmasıdır. Enzimin katalitik aktivitesinden faydalanarak bulunur. Enzim aktivitesi birimi EU'dır. Enzim ünitesi, standart koşullarda ve 25 °C'de 1 µmol substratı 1 dk'da ürüne çeviren enzim miktarıdır.

Turnover sayısı, kullanılan enzimin 1 sn'de tepkime ürününe dönüştüren substratın mol sayısıdır. Yani enzim ile ilgili dönüşüm sayısıdır. Kısaca  $k_{cat}$  sembolü ile gösterilir. Yüksek turnovera sahip biyolojik moleküller CA ve Katalaz enzimidir (Cleland, 2009; Lehninger, Nelson, Cox ve Elçin, 2016).

#### 1.1.3.1. Spektrofotometrik metot

Enzimin etki ettiği madde veya tepkime ürünü UV ışıktaki fazlasıyla optik yoğunluk gösterebilir. Bu önemli bir özelliktir. Bu yöntemde substratın düşük çıkması veya tepkime ürününün yüksek çıkması gibi farklılıklar kullanılabilir. Spektrofotometrik metot, diğer yöntemlere göre karmaşık değildir ve hassas ölçüm yapılmaktadır. Optik yoğunluk farklılığı, belli derişimdeki enzim ünitesini verir. Çoğu enzimin aktivitesi bu metot ile bulunabilir. Enzimler 280 nm dalga boyunda tayin edilmektedir.

#### 1.1.3.2. Monometrik metot

Yapısı gaz olan enzimlerin aktivite gösterdiğini bulmak için yararlanılan tekniktir. Örneğin; oksidaz enzimi ile O<sub>2</sub> alınışı ve dekarboksilaz enzimi ile CO<sub>2</sub> salınışında kullanılabilir.

#### 1.1.3.3. Thunberg metot

Fazla dehidrogenaz (dhg) enziminin aktivitesi için bu yöntemden yararlanılır. Metilen mavisi elektron (e<sup>-</sup>) alıcısıdır. Bileşiğin yükseltgenmiş hali renkli, indirgenmiş hali ise renksizdir. Enzimin etki ettiğini bulmak için tepkimenin olduğu yere belirli oranda metilen mavisi eklenir. Renk yok oluncaya kadar geçen süre not alınır. Deneme O<sub>2</sub> siz bir ortam oluşturmak için bir tüpün içinde yapılmaktadır.

#### 1.1.3.4. Elektrot metot

pH metrelerin elektrotlarıyla yapılan enzim tepkimesinde oluşan maddelerin değerlendirilmesine dayanır.

#### 1.1.3.5. Polimerik metot

Pek çok enzimin etki ettiği madde optik izomeriye sahiptir. Eğer tepkime ile oluşan maddede optik değişme olursa bu yöntemden yararlanılabilir. Fakat substrat ve ürün optik izomeriye sahip değilse bu metodun yapılması doğru olmaz.

#### 1.1.3.6. Kromatografik metot

Enzim-substrat karışımından 1 sn'de bir numuneler seçilir. Bu metotta, enzim substratı ve ürünü çok fazla kromatografi çeşitleri ile ayrılabilir.

#### 1.1.3.7. Kimyasal tayin metot

Karışımından örnek alınıp, dakikada bir tepkime başladıktan sonra substrat ve ürünün bu metot ile oranı analiz edilebilir (Liddle, Seegmiller ve Laster, 1959)

#### Enzim Aktivitesini Bulmak İçin Gerekli Olan Bilgiler

- Enzim reaksiyonunun net denklemi
- Enzimin kofaktöre sahip olup olmadığı
- Substrat ve kofaktörün  $K_m$  değeri
- Optimal pH'sı
- Optimal sıcaklığı
- Substratın azalışı veya ürünün artışını takip edebilmek için analitik bir metot.

Eğer bir enzim denatüre olursa yani enzimi oluşturan amino asitlere parçalanırsa katalitik aktivitesi her zaman kaybolur. Bu yüzden enzim proteinlerinin primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapıları enzimin aktivitesinin kaybolmaması için çok önemlidir.

#### 1.1.4. Enzim inhibisyonu

Enzim aktivitesinin bazı maddeler ile azaltılması ya da tamamen durdurulması olayına enzim inhibisyonu denir. Bu olay hem *in vivo* hemde *in vitro* ortamda gerçekleşebilir. İnhibisyona neden olan maddelere de inhibitör (baskılayıcı) denir. Enzim inhibitörleri enzimle etkileşerek reaksiyonu yavaşlatan moleküllerdir. Enzim inhibitörleri genelde farmasötik maddelerden oluşur.  $IC_{50}$  değeri, enzimi %50 oranında inhibe eden inhibitör konsantrasyonudur. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bir parametredir. İnhibisyon grafiklerinde  $IC_{50}$  değeri bulunması önemlidir (Lehninger ve diğerleri, 2016).

Örneğin; aspirin (asetilsalisilat) prostaglandin oluşumundaki birinci adımı hızlandıran siklooksijenaz enzimin etkisini azaltır ve reaksiyonu durdurur (Vane ve Botting, 1997). Prostaglandinler ağrı oluşumu ile ilişkilidir. Enzimin inhibe oluşu ağrıyı kesmektedir. İki türlü inhibisyon vardır:

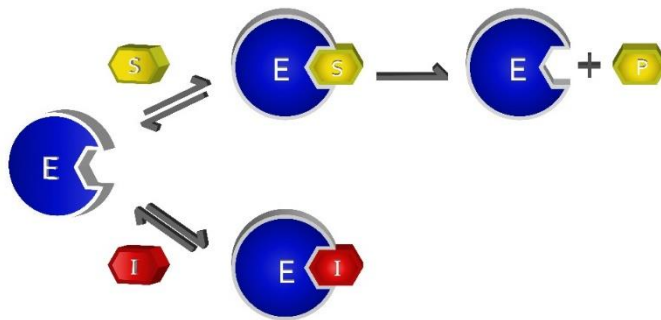
##### 1.1.4.1. Dönüşümlü İnhibisyon

Bu tip inhibisyonlar da reaksiyon geri döndürülebilir. Enzimin kaybolan aktivitesi yeniden kazanılabilir (Lehninger ve diğerleri, 2016).

##### 1.1.4.1.1. Yarışmalı İnhibisyon

Yarışmalı inhibitör enzim aktif bölgesi substrat ile mücadele eder. İnhibitör (I) aktif olan yere tutunarak maddenin enzime tutunmasını ortadan kaldırır. Bu inhibitörlerin yapısı genel olarak substrata benzer bundan dolayı hemen enzime bağlanarak EI kompleksi oluşur ve bu kısa birleşmeler enzimin etkinliğini azaltmaktadır. Bu şekilde enzime bağlanan inhibitör sayesinde substrat yapısı hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu inhibisyon sadece daha fazla substrat eklenerek bozulabilir.

**Şekil 1.9:** Yarışmalı İnhibisyon Mekanizması



#### 1.1.4.1.2. Lineer Karışık Tip İnhibisyon

İnhibitör, enzime tutunamaz. İnhibitör ES molekülüne tutunur ve ürün oluşumu engellenir.

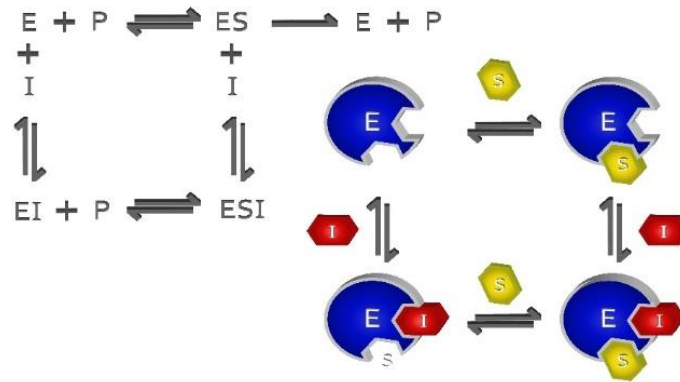
**Şekil 1.10:** Yarı-Yarışmalı İnhibisyon Mekanizması



#### 1.1.4.1.3. Yarışmasız İnhibisyon

ES kompleksi oluşuktan sonra substratın bağlandığı aktif bölgeye değil, ES kompleksinin başka bölgesine bağlanır. Enzimde yapısal değişiklik meydana gelir. Substrat konsantrasyonu arttırılırsa inhibisyon ortadan kalkmaz.

**Şekil 1.11:** Yarışmasız İnhibisyon Mekanizması



#### 1.1.4.2. Dönüşümsüz İnhibisyon

Tepkime şartları değiştirilmesine rağmen enzim tekrar aktivite kazanamıyorsa buna dönüşümsüz inhibisyon denir. Oksitleyici maddeler, ağır metal iyonları gibi enzim yapısında değişiklik yapan maddeler enzim aktivitesinde geri dönemeyen inhibisyon gösterirler (Lehninger ve diğerleri, 2016).

Böyle inhibitörler kinetik olarak incelenmez. Eklenecek substratın bu inhibisyon üzerine etkisi olmayacaktır. Deneylerde enzim aktivitesini durdurma da görev alabilirler.

## 2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ (CA: karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1)

### 2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Solunumdaki Önemi

Karbonik anhidraz izoenzimleri vücudumuzun farklı yerinde bulunur fakat CA enzimi insan eritrositlerinde daha fazla (alyuvar) bulunmaktadır. CO<sub>2</sub> katalizi karbonik anhidraz aktivitesine bağlıdır. Bu nedenle vücuttaki CO<sub>2</sub> seviyesini düzenler, böylece oksijen taşınmadan sorumludur. Karbonik anhidrazlar, hücre homeostazını düzenlemede önemli rol oynayan çinko enzimlerdir. Enzimin aktif bölgesinde çinko bulunur. Hücre içi pH, sıvı salınımı, iyon taşınması ve biyosentetik reaksiyonların katalizlenmesi ve bikarbonat iyonuna (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) geri dönüşümlü karbondioksit (CO<sub>2</sub>) hidrasyonunu ters yönlü olarak hızlandıran Zn<sup>+2</sup> metal iyonu bulunduran çok mühim bir enzimdir (Geers ve Gros, 2000).



CO<sub>2</sub>'in çoğu kanda bikarbonat iyonları hâlinde yer değiştirir. Akciğere ulaştığında bikarbonat anyonları plazmadan tekrar eritrositlere girer. Oksijen molekülünün fazla olduğu alveollerde hemoglobin proteini, protonu serbest bırakır. Hemoglobinden uzaklaşan proton bikarbonat anyonları ile bağ yaparak karbonik asidi meydana getirir. (Hemoglobin, kana kırmızı rengini veren ve oksijen taşınmasında görevli olan bir proteindir.) Karbonik asit tekrar karbonik anhidraz enzimi sayesinde su ve karbondioksite parçalanır. Karbondioksit önce plazmaya sonra da difüzyon geçişi ile alveollere gelir ve nefes verme sonucunda dışarı atılmaktadır (Tomashefski, Chinn ve Clark, 1954).

Karbonik anhidraz enziminin görevleri çok çeşitlidir. Bunlar; fizyolojik reaksiyonlar sırasında, glukoz gibi birçok hayati biyomolekülün sentezi, lipidlerin sentezi, gaz değişimi ve pH dengesi, asit-baz düzenleme, elektrolitlerin salgılanması gibi önemli hücresel tepkiler, kalsifikasyon, biyosentetik reaksiyonlar, pirüvat karboksilasyonu, glukoneogenez, vücuttaki maddelerin detoksifikasyonudur.

İnsanlarda hCA enzimlerinin 16 farklı izoenzimi tespit edilmiştir. Bu izoenzimler arasında, hCA I, III, VII ve XIII, sitoplazma sıvısında tanımlanırken, hCA IV, IX, XII ve XIV, hücre zarına bağlı enzimler olarak tanımlanmıştır. hCA VA ve hCA VB

mitokondride, hCA VI süt ve tükürükte bulunur. hCA III iskeletin kırmızı liflerinde fazla miktarlarda bulunurken, kas ve böbrekte mevcut değildir. Bu hCA izoenzimleri çeşitli inhibitörler, afinite, subselüler lokalizasyon, doku dağılımı ve katalitik aktivite gibi işlemler ile bulunabilir (Poli ve diğerleri, 2020).

## 2.2. Terapötik Hedef Olarak Karbonik Anhidraz

hCA izoenzimleri; glokom gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde, inhibe edilmeye yatkın terapötik hedefler olarak görev alma gibi görevleri vardır. Ayrıca obezite, kanser, epilepsi, artrit, nöropatik ağrı ve osteoporoz gibi hastalıkların tedavisi için kullanılabilir (Stewart, 1997). Glokom, halk arasında “karasu” diye bilinen diğer adıyla göz tansiyonu genellikle belirti vermeden sinsi ilerleyen hastalıktır. Tedavi edilemezse ciddi anlamda görme yetersizliğine yol açar. Glokomda gözün içindeki su basıncı göz sinirine zarar verecek derecede yüksektir. Her yaşta görülebilir. Ancak 40 yaş üzeri insanlarda görülme ihtimali daha fazladır. Glokom ile görme kaybı oluşuktan sonra geri dönüşü yoktur. Bu yüzden erken tanı koymak önemlidir. Glokom göz muayenesi ile teşhis edilir. Doktor hastanın göz içi basıncını Tonometre denilen bir cihazla ölçer.

hCA II izoenzimi vücudun bazı bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. İnsanda bulunan en aktif izoenzim hCA II'dir. CA II en sık göz, böbrek, merkezi sinir sisteminde bulunur (C. Supuran, 2007).

Bu enzim, diüretikler gibi ilaçlar için bir hedeftir. Buna ek olarak klinik olarak kullanılan antiglokom ve antikonvülsanlar (epilepsi için kullanılan ilaç grubu) ve sülfonamidler ( $R-SO_2NH_2$ ) önemli bir kimyasal grubu temsil eder. Bu bileşikler, çinko (Zn) arasındaki katalitik etkileşim ile CA'ların aktif bölgelerine bağlanır. Sülfonamid grubunun ayrıştırılmış azotu CA'yı inhibe eder. hCA II, farklı patolojik olarak rol oynayan hCA izoenzimlerini bile inhibe eder. Anti-enflamatuar, antioksidan, nöroprotektif, antidepresan ve antikanser amaçlı tedavide kullanılır (Zinad, Mahal, Mohapatra, Sarangi ve Pratama, 2020).

## 2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA enziminin inhibisyonu glokom, ödem, epilepsi, tümörler, nöropatik ağrı tedavilerinde kullanılmaktadır. Sülfonamid tip hCA inhibitörlerinin hCA izoenzimi seçiciliği, moleküler bölgeler ile ilgilidir. hCA'nın hidrofobik veya hidrofilik alt grupları

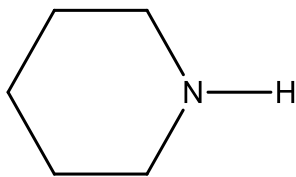
ile etkileşime girebilen bileşikler; asetazolamid, dorzolamid, brinzolamid, metazolamid, etokszolamid ve pazopanib klinik olarak önemli CA inhibitörleridir. CA inhibitörleri, 13 aktif izoenzime karşı *in vitro* seçicilik farklılıklarına sahiptir. Ancak bunlar *in vivo* veya klinik olarak seçicidir (De Simone, Alterio ve Supuran, 2013; Moi ve diğerleri, 2019). Böylece, ortak yan etkileri olabilir. Tat değişiklikleri, depresyon, kilo kaybı, bulanık görme, gözün yanması gibi. Şaşırtıcı bir şekilde CA'nın yapısına giren CA proteinleri de vardır. İzoenzimlerin hepsinde  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - CA'lar vardır. Özellikle Pirazolin halkası, kimyada geniş spektrumundan dolayı ayrıcalıklı bir yapıdır (Nocentini ve diğerleri, 2018).

Pirazolin halkası, kimyada geniş spektrumundan dolayı ayrıcalıklı bir yapıdır Bu halkanın önemi büyüktür. Farmakolojik faaliyetler, anti bakteriyellerde birçok pirazolin türevi bulunmuştur. İnhibisyon istenmeyen yan etkilere de neden olabilir (Nocentini ve diğerleri, 2018). CA inhibitörleri kümelenebilir çinko bağlayıcıların enzim aktif bölgesine bağlanma yerlerine bağlanan birkaç farklı grup ilacın tasarımı için kullanılabilir.

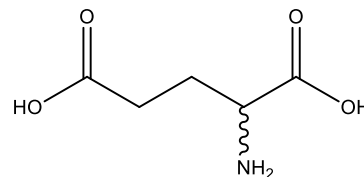
Bu alt küme içinde sülfonamidler, kendine özgü etkileşimlerden dolayı ideal bir çinko bağlayıcı grup olarak bilinir. *In vitro* enzim çalışmalarında benzimidazolyum tuzlarının da hCA enzimini inhibe ettiği gözlenmiştir (Behçet ve diğerleri, 2018).

Ayrıca yapılan araştırmalarda tüm fenolik bileşikler insan CA izoenzimlerini (hCA I, II, IX, XII) güçlü olarak inhibe ettiği gözlenmiştir. Fenolik türevlerden; 4-metil katekol ve 3-metoksi katekol bileşikleri, tümör ile ilgili transmembran CA izoenzimlerinin (hCA IX ve hCA XII) inhibitörleri olarak güçlü aktivasyon göstermiştir (C. T. Supuran, Scozzafava ve Casini, 2003). Bazı araştırmalarda, bu tarz fenol bileşikleri karbonik anhidraz inhibitörlerinin (hCA I) ilaç tasarımı için kullanılmasının işe yarayacağı belirtilmiştir. Ayrıca Pirazolin sülfonamidler, hCA inhibitörleri ve AChE inhibitörleri olarak bilinmektedir. CA enzim sınıfı sayısı yunanca harflerle belirtilmiştir (Wu ve diğerleri, 2019).

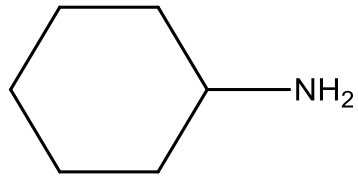
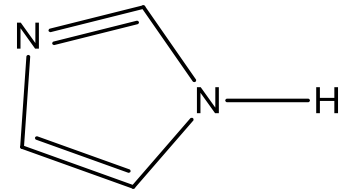
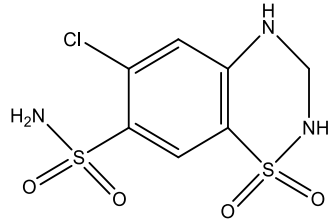
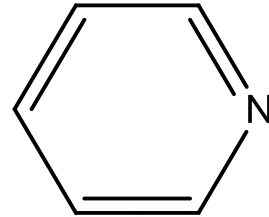
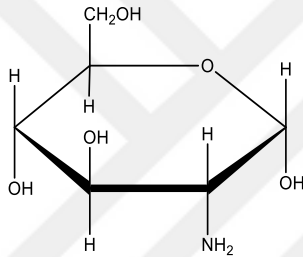
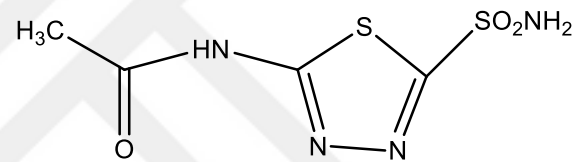
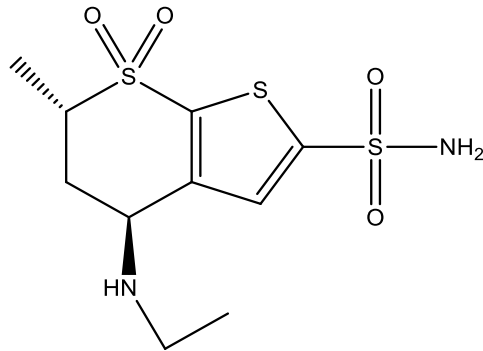
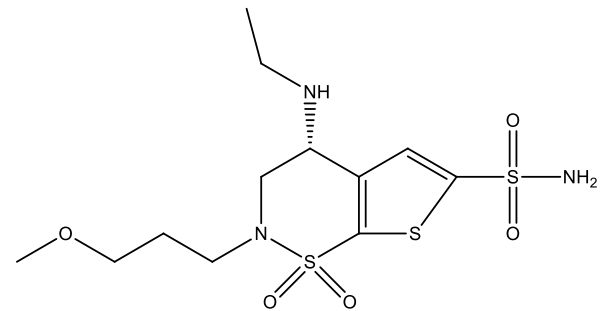
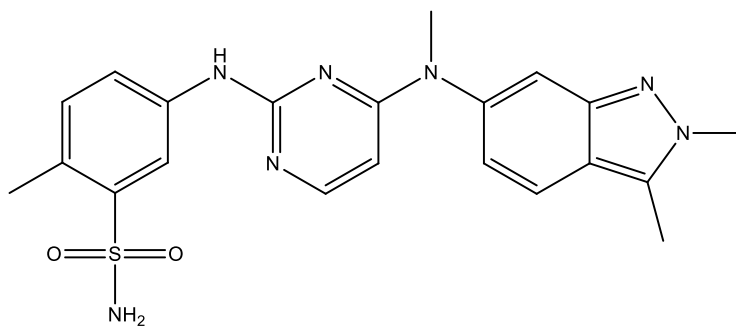
**Şekil 2.1:** Piperidin Yapısı



**Şekil 2.2:** Glutamin Yapısı





**Şekil 2.3:** Sikloheksanamın Yapısı**Şekil 2.4:** İmidazol Yapısı**Şekil 2.5:** Sülfonamid Türevi**Şekil 2.6:** Piridin Yapısı**Şekil 2.7:** Glukozamin Yapısı**Şekil 2.8:** Asetazolamid Yapısı**Şekil 2.9:** Dorzolamid Yapısı**Şekil 2.10:** Brinzolamid Yapısı**Şekil 2.11:** Pazopanib Yapısı

### 2.3.1. Alfa/ $\alpha$ sınıfı karbonik anhidrazlar

Alfa CA'ları ilk olarak CA eritrositlerden izole edilmiştir. Bitkiler, yeşil algler, diatomlar (suda yaşayan fotosentez yapan tek hücreli) siyanobakteriler ve hayvanlarda bulunur. Hem protein yapısı hem de amino asit dizisindeki diğer CA sınıfları  $\alpha$ -CA'ların protein yapısına, yedi periferik  $\alpha$ -heliksle çevrili 10- $\beta$  iplikten oluşan  $\beta$  tabaka hakimdir. Bu  $\beta$  tabaka  $\alpha$ -CA'nın aktif bölgesini barındırır. Çinkonun koordinasyonu üç histidin alt grubu ve bir su molekülüne sahiptir.

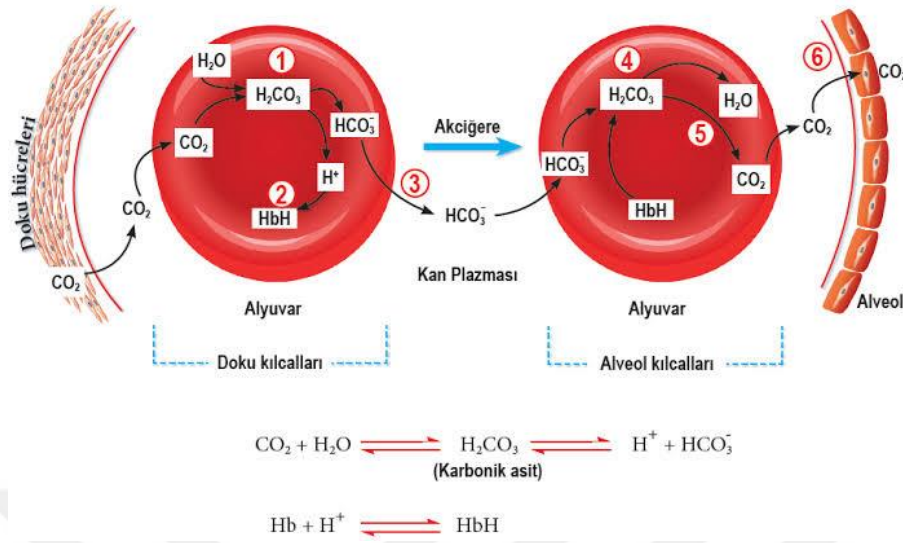
Tarihsel olarak  $\alpha$ -CA multimer oluşturmayan tek CA sınıfı olarak kabul edilir. Fakat bazı yeni çalışmalarda  $\alpha$ -CA monomerlerinin dimerizasyonu bildirilmiştir (Takeuchi, Supuran, Onishi ve Nishimori, 2008).

### 2.3.2. Beta/ $\beta$ sınıfı karbonik anhidrazlar

Beta sınıfı CA'lar alglerde ve siyanobakterilerde bulunur. Bitkilerde bulunmaz. Alfa CA'lardan farklı olarak sadece  $\alpha$  heliks yapıdan oluşur.  $\beta$ -CA monomerler iki sistein kalıntısı, bir histidin alt grubu ile koordine edilen çinko atomu ve bir su molekülü ile oligomerize olabilir. İki aktif bölge oluşturmak üzere dimerler haline gelir. Bu dimerler tetramer oluşturmak için daha fazla etkileşime girebilir.

### 2.3.3. Gama/ $\gamma$ sınıfı karbonik anhidrazlar

Bitkiler ve fotosentetik bakterilerde bulunur. Son araştırmalarda *Methanosarcina thermophila*'dan elde edilen CA-  $\gamma$  yapısı belirlenmiştir. Hayvanlarda bulunmaz. Arkeler, bakteriyel  $\gamma$ -CA koordineli bir çinko aktifliğine sahiptir. Üç histidin alt grubu ve bir su molekülü bir yapı oluşturmak için CA'nın aktif bölgesi 1 monomer, 2 çinko koordine edici histidinler sağlar. Histidin alt grupları ikinci monomer ise üçüncü çinko koordinatını sağlar.  $\gamma$ -CA toplamda üç monomer ile etkileşime girer.

Şekil 2.12: CO<sub>2</sub> Taşınımı

#### 2.4. Alfa Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Ökaryotik algler, bitkiler, diyatomlar ve yeşil alglerin çoğunda çok sayıda hCA izoenzimleri bulunur. Omurgalılar, bitkiler ve bakterilerden izole edilen karbonik anhidrazların moleküler ağırlıkları 30 000 ve katları olabilir. Enzim çinko atomu içerir. Asetazolamid ve amin türevleri ile inhibe edilir.

Memelilerde bulunan izoenzimler, amino asit bileşimleri, (serin aminoasitindeki değişiklik) fiziksel özellikleri (izoelektrik pH, iyon değişim reçinelerine tutunma) olarak birbirinden çok ayırdır. İzoenzimlerin hızları da farklıdır. Omurgalılarının fazla aktivitesi olan izoenzimleri iyon taşıyan epitelde bulunur, fakat görevleri daha belli değildir. Mide ve böbrek gibi asit bulunan epitelde ve kalın bağırsak gibi bikarbonat taşıyan epitel de varlığını gösterir. Bununla birlikte, hCA izoenzimi ile bikarbonat salgılanması arasında bir bağlantı vardır. Bunun için, pankreas ve ileumun dokularında daha az karbonik anhidraz vardır. Vücudumuzun çok farklı bölgelerinde karbonik anhidrazın izoenzimlerine rastlanır.

Literatürde; spesifik CA I ve CA II korneal endotelyumda bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca CA-VII izoenzimi sinir sisteminde görev almaktadır (Carter, 1972).

Fenolik bileşikler ve asitler CA I ve CA II enzimleri için inhibitör olarak görev almıştır. Bu sınıf bileşikler, tıbbi olarak ilgili CA'lardan birkaçını hedefleyen izoform seçici inhibitörlere yol açabilir. Ayrıca fenolik antioksidan bileşikler ve karbonik

anhidraz izoenzimlerinin inhibitörüdür. Yapılan araştırmalarda CA I, mukoza epitelinde ve pankreas Langerhans adacıklarının A hücrelerinde bulunur (Gulcin ve Beydemir, 2013). Beslenme kanalının epitelinde yaygın görülen izoenzim olarak CA II'nin ve tükürüğe salgılanan CA VI'nın, özofagus, mide ve bağırsak mukozasını güçlü asitlikten koruyan izoenzimler olduğu bilinmektedir. CA I, II, III sitoplazmadaki izoenzimlerdir (S Parkkila, Parkkila, Juvonen ve Rajaniemi, 1994). CA IV, akciğer ve böbrekte hücre membranlarıyla ilgili bir glikoproteindir. CA-V ise mitokondride yer alır.

CA VI izoenzimi tükürükte salgılanır. Mide dokusunun hücrelerinde CA II, çizgili kasta CA III, akciğer ve böbrekte CA IV izoenzimleri bulunur (Christie, Thomson, Xue, Lucocq ve Hopwood, 1997). Ek olarak, tümörlerde pH düzenleyici bir enzim olarak CA IX kanser tedavisi için potansiyel bir hedefdir.

## 2.5. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri

16 tane izoenzimi olan memeli karbonik anhidrazların fizyolojik olarak görevleri vardır. Yapılan araştırmalarda hCA XIII izoenzimini aktive eden maddeler aminoasitler (histamin, DOPA, triptofan) ve serotonindir. Literatürde; tümör tedavisinde hCA IX ve hCA XII izoenzimlerini heterosiklik aminler, aminoasitler aktive ettiği bilinmektedir. İnsan karbonik anhidraz (hCA) izoenzimlerinden hCA III (sitozolik) ve hCA IV'ün (membran) amino asitler ve aromatik / heterosiklik aminler aktive etmektedir. En iyi hCA IV aktivatörleri, 4-amino-fenilalanin, serotonin ve 2-amino etildir (Seppo Parkkila ve diğerleri, 2006).

En iyi hCA III aktivatörleri de D-Histamin, serotonin, piridil-alkil aminler ve amino etil piperazinlerdir. Yapılan araştırmalarda hCA III ve hCA IV izoenzimlerinin aktivite grafikleri aminler ile etkileşimi için şimdiye kadar yapılan tüm araştırmalarda diğer memeli CA izoenzimlerinden çok farklıdır. Yapılan çalışmalarda; AE-1, polifenol oksidaz enzimi saflaştırıldıktan sonra esterleşme reaksiyonu sonucu sentezlenen eterlerdendir. AE-1'in karboksil ucunda bulunan DADD sekansını bulunduran tetrapeptidler, hCA II izoenzimini aktive etmekte hem de bikarbonat iyonu taşıyıcısıdır. Başka çalışmalarda ise farklı aminoasitlerin birleşmesi sonucu hCA izoenzimlerinin aktivatörleride sentezlenmektedir (Scozzafava ve Supuran, 2002a, s. 1).

*In vitro* deneylerde, yeni aktivatörleri insan eritrositleri ile ortamda beklettikten sonra hCA aktivitesinin kuvvetli şekilde arttığı gözlenmiştir. Oluşan yeni hCA aktivatör

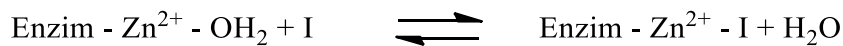
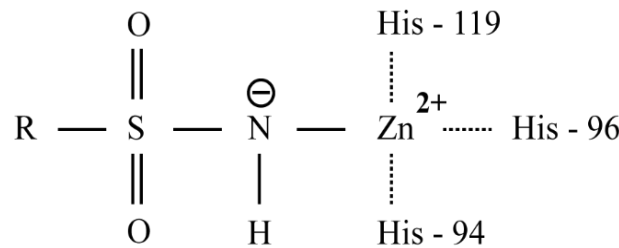
grubu, CA eksikliği sonucu oluşan hastalıkların tedavisi için ilaçların geliştirilmesinde, hafızanın iyileştirilmesinde katkı sağlar. Bununla Alzheimer tedavisi için yeni bir fikir oluşabilir (Scozzafava ve Supuran, 2002b).

L-Adrenalin, hCA II izoenziminin zayıf aktivatörüken izoenzim CA I'in güçlü aktivatörüdür. Bir çalışmada da D ve L Triptofanın hCA I ve hCA XIV izoenzimleri üzerine aktivasyon etkisi görülmüştür (Temperini, Innocenti, Scozzafava, Mastrolorenzo ve Supuran, 2007).

hCA II izoenzimlerinin aktivasyonuna yardımcı olanlar ise, protein kinazlar ve cAMP varlığında fosforilasyondur (Temperini, Scozzafava ve Supuran, 2008). Ayrıca patolojik ve ciddi fizyolojik bozuklukların tedavisi içinde hCA izoenzimlerinin aktivatörleri gereklidir. Bu bilgiler ilaç tasarımı için hedef olarak gösterilen aktivatörlerin gelişmesinde önemli görevleri vardır (Temperini, Innocenti, Scozzafava ve Supuran, 2008).

## 2.6. Karbonik Anhidrazın İnhibitörler ile Etkileşimi

Hidrasyonda ilk adım  $Zn^{2+}$  bağlı hidroksit iyonunun  $CO_2$  üzerine nükleofilik saldırısıdır. Sonucunda  $HCO_3^-$  oluşur sonra aktif bölgeden bir su molekülü ile yer değiştirir.  $H^+$  alışverişi olmaktadır. Protondan ayrılmış sülfonamidin CA izoenzimlerinin  $Zn^{2+}$  iyonuna bağlanır ve NH bölümünün 199. Aminoasit olan Treonin ile hidrojen bağına eklenir. Sülfonamid bölümünün oksijen atomlarından biri de Treoninin 7 omurga N-H bölümü ile hidrojen bağı kurdu. Bu bağlanma hCA enzimi ile Sülfonamidin spesifik bağlanmasının kanıtıdır (Akbaba ve diğerleri, 2014).



Ayrıca  $\alpha$  CA'nın (I, II, VA, IX, XII, XIV) ve *Mycobacterium*'dan sentezlenen CA'ların inhibisyonu dopamin bağlı sülfonamidlerle tüberküloz tedavisi için araştırılmıştır. Literatürde; obezite tedavileri içinde bazı antiobezite ajanları ya da CA

inhibitörleri geliştirilmeye çalışılmıştır (Aksu ve diğerleri, 2013). Çalışmalarda güçlü CA inhibitör özelliği olan bir antiepileptik ilaç olan topiramate maddesi kullanıldı. Çalışmalar sonucunda, topiramate'nin birkaç CA izoziminin (CA II ve CA V dahil) kuvvetli bir *in vitro* inhibitörü olduğu anlaşıldı. Önceden yapılan deneylerde sülfonamid CA inhibitörleri ile aynı şekilde yağ hücrelerinde lipogenezi inhibe ettiği saptanmıştır (C. T. Supuran, 2003). Araştırmalarda dipeptid sülfonamid konjugatları da CA II ve CA XII izoenzimlerine karşı inhibisyon aktivite göstermiştir (Küçükbay ve diğerleri, 2019).

Literatür araştırmalarında, 2-Amino-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-6,7-diol hidro bromür ve 2-amino-1,2,3,4-tetrahidro naftalin-5,6-diol hidrobromürün hCA izoenzimleri üzerine inhibisyon özelliği kanıtlanmıştır (Şentürk, Ekinci, Göksu ve Supuran, 2012).

Örneğin; CA II, gözün retina ve lens gibi hücresel bölgeleri, regülasyonunda daha belirgin bir rol oynar. Enzimin bu izoformu ayrıca beyin, böbrek, mide mukozası, osteoklastlar, iskelet kası, pankreas, testislerde bulunur. CA II inhibitörleri, sülfonamidler; asetazolamidler, diklorfenamidler, metazolamidler anti glokom tedavisinde sistemik olarak kullanılabilir (Ghorai ve diğerleri, 2020).

Enzim-inhibitör kompleksleri CA'ların farmakolojik uygulamaları olabilir. CA'ların katalitik mekanizmasını daha iyi anlamak için bu enzimlerin  $\alpha$ -CA'lara benzer şekilde hareket edip etmediklerini görmek gerekir. Proton taşıyan bileşiklerin aktivasyonu patojenik bakterilerden alınan CA'lar ile anlaşılması mümkündür. Ayrıca enzim- inhibitör kompleksleri oluşması için CA'lar ile etkileşime giren asetazolamid, sülfonamid, biyojenik aminler, amino asit türevleri, aminler, heterosiklik amino asitlerin olması gerekir. Yapılan araştırmalarda birçok patojenik bakteri, mantarlar veya protozoalar potansiyel olarak çeşitli nişleri vardır. Ayrıca bu canlılar amin ve amino asit tipinin inhibitörleri bakımından da zengindir (C. T. Supuran, 2012).

## 2.7. Karbonik Anhidrazın Aktivatörler ile Etkileşimi

Araştırmalarda insan beyni CA'ların (I, II, IV, VA, VII ve XIV) D ve L formu fenilalanin ile aktive edilir. L-fenilalanin hCA izoenzimleri (I, II, XIV) için güçlü aktivatörlerdir (Şentürk ve diğerleri, 2012). D ve L fenilalanin alt gruplarından Histidin-64, Triptofan-5, Treonin-200, Pro-2 enzimin aktif bölgesinde fazla bağ kurarak veya hidrofobik etkileşime katılır. hCA II izoenzimi aktif bölgesine aktivatörler farklı

yerlerden bağlanabilir. Aynı zamanda enzimin katalitik aktivitesi için proton değişimi önemli bir olaydır. Bazı aktivatörlerinde hCA izoenzimleri ile ilişkili proton yer değişikliği aktivasyon verimliliğini sağlamaktadır (Temperini, Scozzafava, Vullo ve Supuran, 2006).

CA aktivatörlerinin etkinliğinin artırılması farmakolojik açıdan ilaç tasarımı çalışmalarına yardımcı olur. CA aktivatörleri; Alzheimer, yaşlanma, hafıza tedavileri için kullanılmaktadır. Yapılan başka çalışmalarda da dopamin türevi bileşikler hCA (I, II, VI) izoenzimlerini aktive ettiği bilinmektedir (Şentürk ve diğerleri, 2012). Bazı çalışmalarda ise,  $\beta$ -amino selenidler ve  $\beta$ -aminotellüridler aktivatör görevi göstermişlerdir. Ayrıca güçlü bir antioksidandır. Genel olarak CA aktivatörlerinin uygulaması hafıza tedavisi ve CA eksikliği sendromları içindir (Tanini, Capperucci, Supuran ve Angeli, 2019).

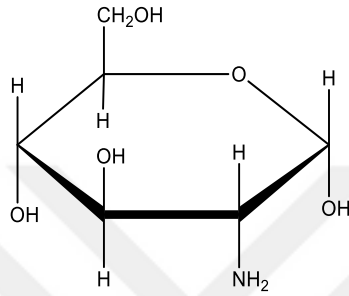
L-Karnosin (alanin ve L-histidin) imidazol halkasındaki N-metillenmiş formu, histidin içeren peptidler, karboksil ucu değiştirilmiş türevler, N-asetil türevleri hCA izoenzimlerine (I, II, VA, IX) karşı aktivatör özelliği de araştırılmıştır. Bu izoenzimlerin yapısı oldukça karmaşıktır. Bu aktivatörler yapay doku mühendisliği çalışmalarında da kullanılabilir (Vistoli ve diğerleri, 2020).

### 3. GLUKOZAMİN

#### 3.1. Glukozaminin Özellikleri

Glukozaminin formülü;  $C_6H_{13}NO_5$ , molar kütlesi, 179,17 g/mol'dür. Erime noktası, 150 °C. Yoğunluğu, 1,56 g/cm<sup>3</sup>. Sınıflandırma olarak hekzoaminler grubundadır.

**Şekil 3.1:** Glukozamin Yapısı



Glukozamin bir bileşendir. Eklemlerimizdeki kıkırdak yapılarında bulunmaktadır. Proteinlerin ve şeker zincirlerinin birleşmesi sonucu oluşur. Glukozamin bağ dokusunun ana bileşenlerindedir. Glukozamin, yetişkinlerin çok tercih ettiği gıda takviyelerindedir. İlaç değildir. Kas yapmak isteyenler ve yaşlılar en çok kullanmaktadır. Glukozamin takviyeleri genelde denizde yaşayan canlılardan elde edilmeye çalışılmışlardır (Yan ve diğerleri, 2007).

Glukozamin ile ilgili çalışmaların geneli, insan bedeninde yer alan doğal madde olan glukozamin sülfat ile ilişkilidir. Bu konu ile ilgilenen çalışmalarda, glukozamin türevlerinin kullanılabilir ya da bu maddenin kemik suyu çorbası gibi doğal olarak tedarik etmesinin, eklem zarar görmesini engellemeye, ağrıyı geçirmeye faydalı olmakta ayrıca epifiz plağının onarımı ve eklem sıvısı oranını arttırabilmektedir.

Glukozamin, agrekan ve proteoglikanlar gibi bileşikler kıkırdağın yapısına girebilen birer amino sakkaritlerdir. Eklem yapısının bozulması ve kıkırdak zedelenmesi, kireçlenme belirtileridir. Glukozamin bu tür hastalıklara iyi gelmektedir. Kireçlenme insan yaşamı boyunca eklemlerdeki hasarın meydana gelmesi ile sürekli olan ağrılar ile boy gösteren bir hastalıktır (Zhang, Roytrakul ve Sutheerawattananonda, 2017).



Glukozamin, insanın yediğine dikkat etmesi ve hareket etmesi ile eklem iltihabını ve hasarını geçirmede doktorlar tarafından yan etkisi bulunmayan en doğal gıda takviyelerinden biridir.

Kireçlenme araştırmaları, kırık yapının bozulması zaman geçtikçe kemiklerin birbirine sürtünerek zarar vermesi ağrı ve acılara sebep olmakta ayrıca insanın yaşam kalitesini en aza indirmektedir (Zhang ve diğeri, 2017). Günde 800 ile 1.500 mg glukozamin kullanmanın kemik hastalıklarından yakınan milyonlarca insanda; genellikle dirsek, kalça ve diz gibi çok etkilenen eklemlerin daha fazla zarar görmesini engellemektedir.

### 3.2. Glukozaminin Önemi

- ✓ Eklem sağlığını korur. Eklem ağrısını azaltır.
- ✓ Bağırsak astarını onarma ve inflamatuvar bağırsak sorunlarını hafifletir.
- ✓ Düşük iltihaplanma ve immün reaksiyonları tersine çevirmeye yardımcıdır.
- ✓ Kırıklara ve yaralanmalara iyi gelir.
- ✓ Osteoartrit, zamanla artan eklem yapısının bozulması sonucu yürümeyi koşmayı zorlaştırır ve eklemler acı verebilmektedir.
- ✓ Glukozamin osteoartrite de iyi gelmektedir.
- ✓ Daha sağlam kemiklerin oluşumunu sağlar.
- ✓ Eklemlerde kayganlaştırıcı görevi vardır.
- ✓ Sindirime faydası vardır.

Glukozamin, aynı zamanda insan sindirim sistemini kolaylaştırmak ve GI (gastrointestinal) sisteminin mukoza yapısının stabil kalması için kullanılabilir.

Glukozamin, hayvan deneylerinde bile etkili bağırsak yardımcısı olduğu araştırılmıştır.

GI sisteminde yabancı maddeler (gluten, toksinler ve mikroplar) kana karışmıştır. Bu maddeler genellikle iltihap oluşumuna neden olur. Böylece bazı maddelere alerji reaksiyonu başlar. Bu da bağışıklık sistemi hastalıklarının meydana gelmesini sağlar.

Araştırmalar, glukozamin ve türevlerinin veya doğal bulunan glukozamince zengin kemik suyu çorbanın; eklemlerin onarımı ve fazla ağrılı geçen iltihaplı bağırsak hastalığına (IBD) iyi geldiği bilinmektedir (Figueroba ve diğeri, 2020).

İnsan kafatasında bulunan Temporal mandibular eklem iltihaplanmış ise, kişi şiddetli ağrı çeker. Bu yüzden kişi konuşmakta zorluk çekmektedir. Yapılan araştırmalarda glukozamin, TMJ belirtilerini azaltmıştır. TMJ, çenedeki temporal mandibular eklem iltihabı sonucu oluşan bir tür hastalıktır. Genellikle yaşı ilerlemiş insanlarda görülmektedir.

TMJ, insan anatomisinde çeneyi kafatasına bağlı kılan eklemdir. Kafatasının sorunsuz acı çekmeden sağa sola döndürülmesine yardımcı olur. Bu hastalık da genellikle çene acısı ve uyuyamama gibi belirtiler görülür. 4 ya da 5 ay süresince günlük olarak 500 ile 1500 mg glukozamin kullanmak; çenedeki acıyı azaltır ve daha rahat uyumanıza ayrıca yemekleri dişlerimizle öğütmeye kolaylık sağlar (Figueroba ve diğerleri, 2020).

Yapılan bir araştırmada oral glukozamin alınmasında kan, idrar veya fekal parametreler üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Yan etkileri, steroid olmayan veya anti-enflamatuar ilaçlardan önemli derecede daha azdır. Glukozamin için ciddi veya ölümcül bir yan etki bildirilmemiştir. Sonuç olarak, glukozamin uygun kullanım koşulları altında güvenlidir. Ayrıca glikoz metabolizmasını etkilememektedir (Figueroba ve diğerleri, 2020).

Birçok çalışma, glukozaminin, hücre ölümü (apoptoz) hücre çoğalması ve anjiyogenezde (var olan damardan tomurcuklanma olayıyla yeni damar oluşumu) yer alan biyolojik yollar üzerinde anti-kanser aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, glukozamin anti-kanser moleküllerin oluşumuna destek olur (Cahlin ve Dahlström, 2011).

### **3.3. Glukozaminin Uygulama Alanları**

Glukozamin, tek kullanıldığında ya da kondroitinle birleşik kullanıldığında, herkese fayda sağlamamaktadır. Fakat çalışmalarda genellikle eklem iltihabına iyi geldiği görülmektedir.

Ezilmiş veya kapsül görünüşünde olan glukozaminler genel olarak her gün 1500-2000 mg içilir ve bu miktarın içimi gün içinde bölünür. Genelde insanlar glukozamini gün içinde yalnız veya sülfat, omega-3, MSM maddelerin birleşimi şeklinde 500-1500 mg içmektedir (Vasiliadis ve Tsikopoulos, 2017).

Glukozaminin yararını fazlalaştırmak amacıyla kondroitin sülfat da kullanılır. Glukozamin sülfat, glukozamin hidroklorür ve N-asetil glukozaminden daha çok yararı

vardır. Çünkü sülfat vücudun kırkırdak üretmesine yardımcı olmaktadır. Etkisinin anlaşılması açısından Glukozamin alırken Glukozamin-Kondroitin birleşimi ürün tercihi yapılmalıdır.

Glukozamin bileşiklerinin cilt veya cilt hücreleri üzerinde birçok yararlı etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Hyaluronik asit sentezini uyarmasından dolayı, glukozaminin yara iyileşmesini hızlandırdığı, cildin neminin sağlanmasında ve kırışıklıkları azalttığı da bilinmektedir. Ek olarak, bir tirozinaz aktivasyonunun bir inhibitörü olarak glukozamin melanin üretimini inhibe eder. Hiper pigmentasyon (ciltte koyulaşma) bozukluklarının tedavisinde de kullanılır.

Diğer gözlemlere dayanarak, migren, baş ağrıları ve viral enfeksiyonlarda dahil ek klinik kullanımlar için glukozamin önerilmiştir (Sibbritt, Adams, Lui, Broom ve Wardle, 2012).

### **3.4. Glukozamini Kimler İçmeli, İçebilir?**

Yalnızca romatizma veya eklem acısı hissedenler değil de eklem yapısına iyi bakmak isteyenler içebilirler. Her yaş için kullanıma elverişlidir. Ancak hamile ve diyabet hastalarına tavsiye edilmemektedir.

Deniz canlılarına alerjik reaksiyon verenler, diyabet olanlar ve idrar söktürücü içenlere önerilmez. Deniz canlılarına alerjik reaksiyon verenler, vejetaryen formundaki glukozamini içebilirler (Winitz, Birnbaum ve Greenstein, 1957).

### **3.5. Glukozaminin Başka İlaçlar ile Etkileşimi**

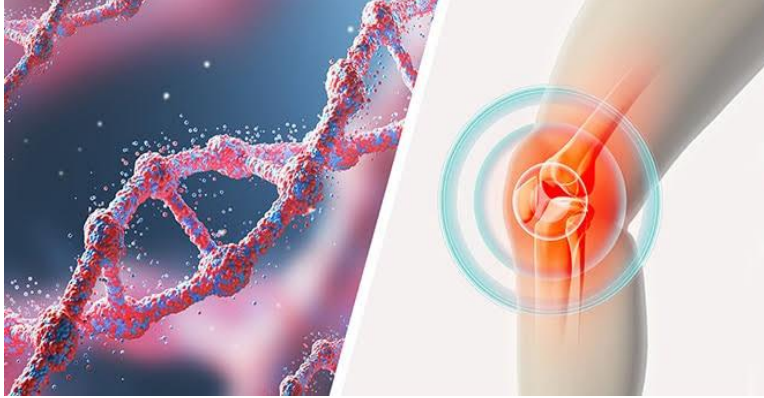
Glukozamin takviyesi genellikle güvenlidir. Fakat belli kan sulandırıcı haplara ve kanser ilaçlarına tepki verebilir. Aldığınız tüm gıda takviyelerinden doktorunuzun haberi olmalıdır. Böylece olası riskler engellenmiş olur.

### **3.6. Glukozaminin Doğal Besinlerden Temini**

Glukozamin takviyelerinin yapımı için gerekli maddeler doğada bulunur. Genelde karides, yengeç ve ıstakoz kabuk bulunduran deniz canlılarında yer alan kitinden elde edilir. Kitin, polisakkaritlerden biri olan büyük moleküldür. İnsanlar deniz canlılarının

kabukları sert yani tüketemedikleri için insanlar beslenme şeklinde glukozaminin faydasını göremezler (Wang ve diğerleri, 2020).

### **Görsel 3.2: Glukozaminin İnsan Üzerindeki Etki Noktası**



### **3.7. Glukozaminin Formları**

Glukozamin sülfat, insanlar tarafından en çok kullanılan formdur. Glukozamin hidroklorür pek kullanılmaz. Glukozamin genellikle kondroitin ile birleşik olarak bulunur ve bu birleşimin yalnız glukozamin sülfat gibi yan etkisi olmadığı anlaşılmıştır.

#### **3.7.1 Glukozamin Kondroitin**

Kondroitin, kıkırdak yapısına suyun bağlaması için gerekli olan mühim bir maddedir. İnsan vücudunda kendiliğinden üretilir.

Ticari amaçla kullanım için hayvanların kıkırdak yapılarından elde edilmekte veya laboratuvar çalışmalarıyla yapılabilir. Glukozamin kondroitin, glukozamin formlarının kombinasyonudur. Yapılan araştırmalarda kondroit sülfat ise; sığır, kümes hayvanları, köpek balığı kıkırdağından elde edilebilmektedir. Köpekbalığı kıkırdağı esas olarak 6. pozisyonda mono sülfatlanmış disakkaritlerden oluşur. Sığır ve domuz kıkırdağı esas olarak 4. pozisyonda mono sülfatlanmış disakkarit birimlerinden meydana gelir (Sim ve diğerleri, 2007).

Kondrositler ile sentez ve klevaj enzimlerini inhibe ederek kıkırdak dejenerasyonunu geciktirir. Glikoz amino glikanlar ise, büyük doğrusal hetero polisakkaritlerdir. Bir amino şeker N-asetil glukozamin, glukozamin, N-asetil galaktozamin, iduronik asit veya galaktoz fizyolojik süreçte temel rolleri vardır. Ayrıca tüm gliko amino glikanların proteine kovalent olarak bağlı olduğu ve proteoglikanları

oluşturduğu bulunmuştur. Bunlar hücre dışı matris ve hücre yüzeylelerinde bulunur. Doğada proteoglikanlar mantarda bulunmaktadır (Sim ve diğerleri, 2007).

Sülfonamidler, CA inhibitörleri olarak kullanılırlar. Glukozamin de bir amin türevidir. Bu özelliğinden dolayı CA inhibitörü olarak kullanılması mümkün olabilir. Bu çalışma ile glukozaminin Glokom tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymak üzere yapılmış bir çalışmadır.



## 4. MATERYAL VE METOT

### 4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda siyanür bromürle aktifleştirilmiş Sefaroz 4B, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin(TEMED), L-tirozin, tris(hidroksimetil)amino metan (Tris) sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, tiyonil klorür, piridin, N,N metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250 ve R-250 E, sodyum hidroksit ve CO<sub>2</sub> gazı ilgili firmalardan sağlanmıştır.

### 4.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Deneyler sırasında aşağıda yazılı olan alet ve cihazlar kullanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar DPÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümünde bulunmaktadır.

Santrifüj: Nüve NF800

Soğutmalı santrifüj: Sigma K30

Spektrofotometre: SHIMADZU UV 1700 Pharmaspec

pH metre: Schott Instruments/Lab850

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

Karıştırıcı: Vortex- Genie, Heidolp

Hassas terazi: Ohaus- Adventurer

Kronometre: Hanhard, Electronische Digital- Stoppuhr Germany

Otomatik Pipetler: Biohit Proline

Magnetik karıştırıcı: Heidolp hR 3001

Çalkalayıcı: GFL

### 4.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal deneylerde hazırlanması gereken çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanması aşağıda gösterilmiştir.

Biyokimyasal deneylerde hazırlanması gereken çözeltilerin kullanım yerleri ve hazırlanması önemlidir. Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub>, pH=7,4: 6,055 g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı. Sefaroz 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH=8,8: 16,8 g (0,02 mol) NaHCO<sub>3</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı. Ardından 0,0025 M Veronal tamponu: 5,15 g sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp, pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı. Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon 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'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı. Hemolizatin kolona aktarılmasından sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon 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 çözülüp, 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

Kolona bağlanmış hCA I izoenzimi ve hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon 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 2,09 g (0,15 mol) NaCH<sub>3</sub>COO.H<sub>2</sub>O, 120 mL destile su ile çözüldü. Sonrasında 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı. CO<sub>2</sub> hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti CO<sub>2</sub> çözeltisi: 0 oC'de yarım Saat saf suyun içine CO<sub>2</sub> gazı basılarak hazırlandı. Proteinlerin kantitatif tayinde kullanılan çözelti Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı. Jelin boyanması için hazırlanan çözelti boyama çözelti: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

Jelin yıkanması için hazırlanan çözelti yıkama çözeltisi: %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak belli oranlarda kullanıldı. Sonra Jeldeki proteinlerin

sabitleştirilmesi için hazırlanan çözelti sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı. İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olan bileşiklerin %1'lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5'er mg alınıp 1 mL etil alkolde çözüldükten sonra, hacimleri 5'er mL'ye tamamlandı. Bu işlemler sonunda biyokimyasal çalışma için kullanılacak çözeltiler hazırlanmış oldu.

#### **4.4. Metotlar**

##### **4.4.1. Protein tespiti**

###### **4.4.1.1. Nitel Protein Tespiti**

Kromatografik işler sonucunda aynı hacimde toplanan tüm kalıntılarda nitel protein tespiti gerçekleştirildi. Bu tespitin nedeni; 280 nm'de proteinlerin içerisinde yer alan triptofan ve tirozin aminoasidinin en fazla optik yoğunluk vermesi ile ilgilidir. Kalıntılar kuvarz küvetlere koyularak, optik yoğunlukları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşılık sonuca bakıldı.

###### **4.4.1.2. Bradford (coomasie blue) metodu ile nicel protein tespiti**

Bu metotla, afinite kromatografi ile elde edilen protein çözeltisinde ve enzim bulunan çözeltide protein tespiti gerçekleştirildi. Metot coomasie brilliant blue G-250'nin fosforik asidin olduğu kısımda enzimlere tutunmasına bağlıdır. Tutunmasıyla ortaya çıkan büyük moleküllü yapı, 595 nm'de maksimum optik yoğunluk verir. Proteine boyanın tutunması hemen gerçekleşir. (2 dk). Metodun, en ince noktasına kadar algılaması 1-100 µg arasındadır.

Tespit işlerinde bir mL'sinde bir mg protein yer alması normal olarak enzim bulunan çözeltiden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL koyuldu ve saf su ile bütün tüplerin hacmi 0,1 mL'ye kadar getirildi. 5 mL coomasie reaktifi tüplere koyuldu ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dk sonra 595 nm'de üç mL'lik küvetlere köre karşılık optik yoğunluk verilerine bakıldı. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve beş mL Coomasie maddesi bulunan çözelti kullanıldı. Optik yoğunluk verilerine göre mikrogram protein verileri normal grafik şeklinde oluşturuldu (Pierce ve Suelter, 1977).



#### 4.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tespiti

##### 4.4.2.1. CO<sub>2</sub>- Hidrataz aktivitesi tespiti

Aktivite tespiti Wilbur Anderson yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu metotta; CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu ile oluşan H<sup>+</sup> nedeniyle pH'ın 8,2'den 6,3'e azalması ile sürenin ilerlemesi, pH-stat yöntemi ile ölçüldü. Tampon için pH'sı 10 karbonat tamponundan (0,15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) yararlanıldı. Enzim ise; enzimsiz CO<sub>2</sub> hidrasyon saniyesi (t<sub>0</sub>) ile enzimli tepkime saniyesi (t<sub>c</sub>) değişimi, t<sub>c</sub>'ye bölünmesiyle belirlendi.

Deneyde tüpe ilk olarak 1 mL Veronal tamponu, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL CO<sub>2</sub> çözeltileri eklendi. pH metreden pH'ın 6,3'e azalması ile sürenin ilerlemesi kronometre ile bulundu (t<sub>c</sub>). Benzer adımlar tüm analiz edilecek maddenin deneyinden önce, enzim değil de saf su koyularak tamamlandı. (t<sub>0</sub>) İnhibitör olan deneylerde; saf suyun hacmi, elindeki inhibitör hacmi gibi düşürülerek ona karşılık inhibitör koyuldu. Böylelikle aktivite değerlendirme yerinin hacmi aynı kalmış oldu (4,2 mL). Metoda göre, CA enziminin hızı bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz gerçekleşen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini %50 oranında azaltır buna enzim oranı denir.

Sonuç olarak,  $EU = (t_0 - t_c) / t_c$  denkleminde yer alan enzim çözeltisi hacmi ile EU bulunmuştur.

##### 4.4.2.2. Esteraz aktivitesi tespiti

İnhibitörlerin CA enzimini nasıl etkilediğini bulmak amacıyla bu metot uygulandı. Metot, karbonik anhidraz enziminin esteraz hızı mevcuttur. Metodun önemli kısmı ise karbonik anhidrazın, substratı için p-nitro fenil asetat, 348 nm'de optik yoğunluk gösteren p-nitro fenol veya p-nitro fenolat'a parçalanmaktadır.

348 nm'de p-nitro fenol ve p-nitro fenolat bu maddelerin ikisinde eşit optik yoğunluk vermektedir. Bundandır ki fenol kümesindeki proton ayrılıp ayrılmaması değeri değiştirmemektedir. Dalga boyundaki p-nitro fenil asetat'ın da az optik yoğunluğu var olduğu için kör olarak görev almaktadır. Tespit adımlarında kuartz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim eklenmesinden 3 dk geçince 25 °C'de 348 nm'de optik yoğunluk not alındı. Spektrofotometre, öncesinde enzim koymayıp 0,1 mL tampon koyularak, çözeltinin 3 dk geçince optik yoğunluk sıfırlandı. Bunun için 3 dk da esterin müdahale etmeden suyla tepkimeye giren kısmı, p-nitro fenil

asetatın optik yoğunluk için düzenlendi. İnhibitör bulunan deneylerde ise suyun hacmi düşürülerek, su koymayarak, su oranı kadar inhibitör koyularak aktivite tespiti yapılmıştır.

Deneyde yer alan p-nitro fenil asetat substrat çözeltisi, yeni ortaya kondu. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL asetonda çözüldü ve hemen eklenen 49 mL saf suya azar azar koyuldu. Bu çözelti 3 mM'lık ve yoğunluğu fazla olanı ortaya çıkarmak esterinin çözünürlüğü az olduğu için pek kolay değildir. Aseton ise başka çözücülere göre hidroliz tepkimesinin hızına çok az etki ettiği için kullanıldı. Enzim çözeltisinin pH değişikliklerine direnci 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) çözeltisi ile yapılmıştır. Pek çok enzim substratı, ürünü ya da kullanılan koenzim UV bölgede absorbans verir. Substratın ürüne dönüşmesi ile absorbansta değişiklik gözlenir. Bu nicel olarak izlenebilir.

Bu yöntemde absorbans (OD) değişimi belli miktardaki enzimin varlığını gösterir. Bu sayede enzim ünitesi belirlenir. Enzim ünitesi, 1 dk'da 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır.

Esteraz aktivitesi için;

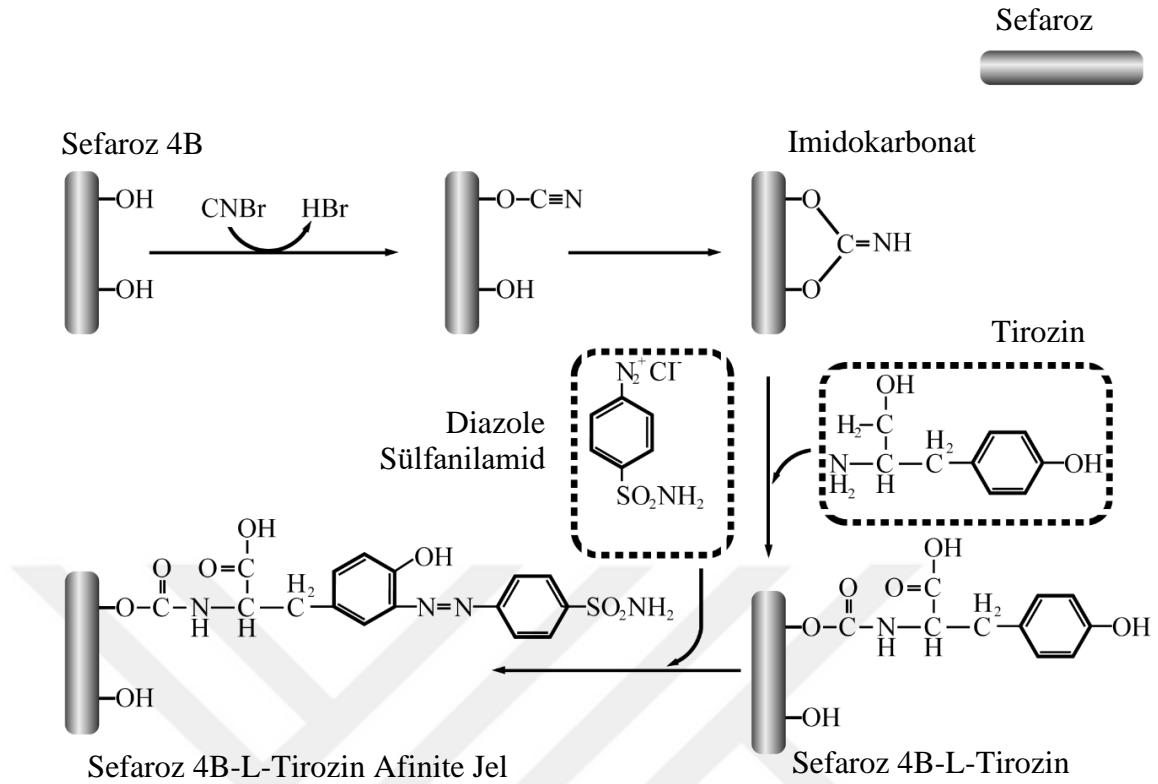
$$\text{p-nitro fenol miktarı} = \frac{A(\text{OD})/5}{3} \times 3 = A(\text{OD})/5 \text{ (}\mu\text{mol/dk)}$$

#### 4.4.3. Afinite jelinin oluşturulması

##### 4.4.3.1. Sefaroz 4B matriks üzerine afinite jelinin oluşumu

Jel, Sefaroz 4B matriksi üzerine oluşturuldu. Sefaroz 4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin aminoasidi kovalent bağla bağlandı. Sonra sülfanamid grubu diazonlanarak, tirozin aminoasidine tutundu. Bu ortamda tirozin aminoasidi; jelin uzantı dalını, sülfanilamid, enzimi özel olarak tutan bölümdür. Sülfanilamid grubu karbonik anhidrazın özel inhibitörüdür. Sülfonamid jelin içeriğine karışarak CA enziminin dahafazla miktarda jelden ayrılması mümkün olmaktadır.

**Şekil 4.1:** Sefaroz 4B'ye Tirozin Bağlanma Reaksiyonu



#### 4.4.3.2. Sefaroz 4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin bağlanması

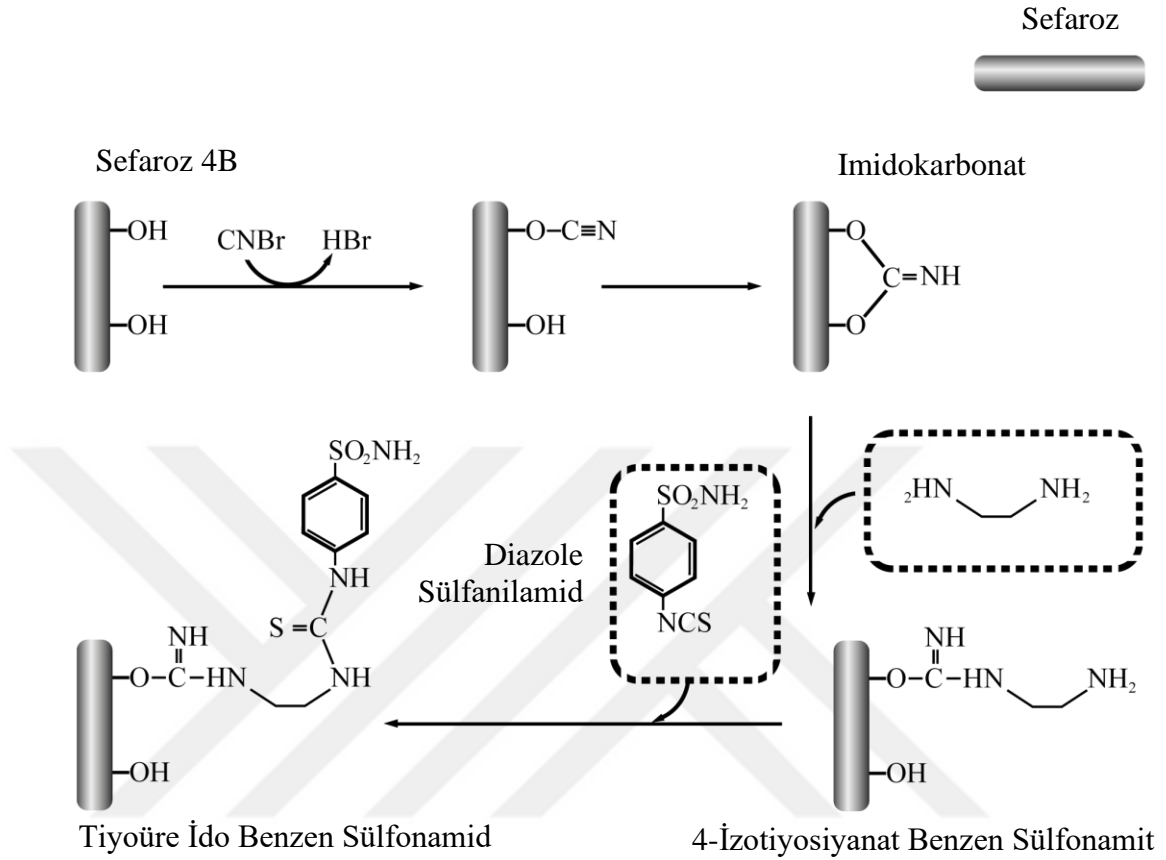
Siyanür bromürle aktifleştirilmiş Sefaroz 4B pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponuyla bulandı. Bir beher içerisine eklendi. Benzer tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin aminoasidi çözüldü; behere eklenerek çalkalandı. Süspansiyon 4 °C'de 2 saat çalkalandı ve 16 saat değişmeyen sıcaklıkta durduruldu. Süre bittikten sonra jel, yıkama suyu 280 nm'de optik yoğunluk değeri çıkmayana dek fazla suyla başka yere aktarıldı. Dolayısıyla tepkimeye dahil olmayan tirozin aminoasidi, çözeltiden bütünüyle ayrılmış oldu. Yıkama işlevi 100 mL 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> tamponu ile (pH=8,8) yine yıkandı ve tirozin bağlanmış jel, tamponun 40 mL'si içine koyuldu.

#### 4.4.3.3. Sülfanilamid tutundurulması

25 mg-sülfanilamid, 0 °C de 10 mL HCl ile karıştırıldı. 75 mg NaNO<sub>2</sub> içeren 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid grubu içeren çözeltiye 10 dk da azar azar eklendi. Diazonlanmış şeklindeki sülfanilamid, 40 mL Sefaroz 4B L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'e yükselttilerek aynı kalması sağlandı. 3 saat oda 25 °C'de

azar azar çalkalandı. Sonra 1 L saf su ve 200 mL 0,005 M tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) tamponuyla durulandı. Sonrasında benzer tampon içinde korundu.

**Şekil 4.2:** Afinite Jelinin Sentez Reaksiyonu



#### 4.4.3.4. Afinite Kromatografisi

Bağlanma afinitesine dayalı bir yöntemdir. Kolondaki afinite jeli (ligand-protein gibi) bir makromoleküle kovalent bağlanan sülfonamid gibi bir grup içerir. Bir protein karışımı kolona eklendiğinde, bu liganda ilgisi (afinite) olan CA (enzim) jele tutunur. Böylece enzimin kolon boyunca göçü gecikir. Bağlanmayan proteinlerin kolondan atılmalarını takiben, bağlanan protein pH'ları farklı tampon çözeltiler ile ayrımı yapılabilir (Williams ve diğerleri, 2009).

#### 4.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin ayrılması

##### 4.4.4.1. Hemolizat eldesi

Kan, hastaneden temin edilen antikoagulantlı 400 mL'lik kan torbasına alındı. Kanın yapısının bozulmaması için 4 °C'de saklandı. Ayrıca kanın 2 gün içinde

kullanılması gerekmektedir. Alınan kanın eritrositlerini ayrıştırmak amacıyla 10 ml'lik tüplere yerleştirildi ve 20 dk santrifüj işlemi uygulandı. Ardından tüplerin yukarıda kalan fazı plazma ve lökosit kümesi bölündü özenle ayrıştırıldı. Daha sonra aşağıda yer alan eritrositler %0,9'luk NaCl çözeltisi ile 2-3 kere durulandı ve yukarıda kalan bölmeler çöpe atıldı. Eritrositler hacimlerinin 1,5 misli soğuk saf su ile parçalandı. Parça parça olan eritrositler birleştirilerek parçalanmanın tamamen olması için tam yarım saat çalkalandı. Hücre zarlarının da ortamdan uzaklaşması iyi olur bu yüzden hemolizat 4 °C'de 20.000 rpm'de 30 dk santrifüj işlemi uygulandı. Ardından tüplerin dibinde görülen hücre zarları ayıklandı yukarıdaki kısım özenle ayrıldı. Hücre zarlarından ayıklanan içinde enzim bulunan çözeltinin pH'sı katı Tris ile 8,7'ye ayarlandı. Bu şekilde sorun olmadan hemolizat kolona aktarılacak hale geldi (Blackwell ve Huang, 1965).

#### 4.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna aktarılması ve enzimin ayrılması

İşlemlerden geçen hemolizat kolona tatbik edilir. Kanın kolona yüklenme işlemi bittikten sonra yıkama tamponu ilave edilir. Yıkama işlemi kanın kırmızı rengi kolondan tamamen gidinceye kadar ve yıkama tamponuna karşı 280 nm'de 0,05 değerine ulaşınca kadar sürdürülür. Bu değere ulaşıldığında sırasıyla hCA I ve hCA II enzimlerinin elüsyon çözeltileri kolondan geçirilir. Elüsyon her tüp için 5 ml şeklindedir. Elüsyondan alınan her tüpün 280 nm'de absorbansına bakılır. Son olarak elde edilen enzimlere diyaliz işlemi uygulanır.

**Şekil 4.3:** Hemolizatın Kolona Tatbik Edilmesi

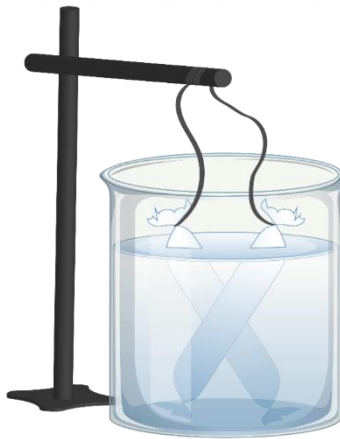


#### 4.4.4.3. Diyaliz işlemi

Diyaliz, büyük moleküllerin gruplandırılması için ve seyreltik çözeltideki moleküllerin büyüklükleri göz önüne alınarak yapılır. Böylece diyaliz torbasının porları molekül kütlesi, 10 000'den yüksek kütleye sahip olan büyük moleküllerin geçmesini engeller. Dolayısıyla, diyaliz torbasındaki küçük maddeler, diyaliz suyuna karışırken, torbada protein molekülünün yoğun çözeltisi bulunur. Ufak maddelerin çıkması torbadaki yoğunluk ile diyaliz tamponundaki yoğunluk aynı olana kadar sürer. Dengeye ulaşmak için genellikle 4-6 saatlik sürenin geçmesi gerekmektedir. Eşitlendikten sonra, diyaliz tamponu yeni diyaliz tamponuyla değişir. Sonra diyaliz tekrar sürer. Böylelikle, eşit olana kadar diyaliz süresi bir iki gün uzatılabilir.

Diyalizde gerekli olan kısmi geçirgen zarlar farklı maddelerden (selüloz) oluşmuş araçlardır. Por çapı zar geçişinde maddelerin iriliği çok önemlidir. Diyaliz metodu, çoğunlukla çözeltideki sodyum, potasyum tuzları ve ufak maddeleri bulunduğu yerden götürmektedir. Aynı olarak, biyolojik moleküllere çok az bağlanan ufak anyonlar, kanyonlar bu şekilde istenmeyen durumdan kurtarılabilir.

**Şekil 4.4:** Diyaliz İşleminin Uygulanması



Saflaştırılan enzim çözeltisi diyaliz torbasına koyulmuş ve buz dolabına kurulan bir düzenele diyaliz tamponu sayesinde diyaliz gerçekleştirildi. 1 gün sürecektir. Ayrıca her sekiz saatte diyaliz tamponu yenilenmiştir. Diyaliz bittiğinde saflaştırılan enzim kısmi saf halini almıştır. Saflaştırılan enzim çözeltisi, diğer çalışmalarda, hidrataz veya esteraz aktivite çalışmalarında işe yarayacağı için üçer mililitrelik tüplerde ağzı kapatılarak dondurucuda saklanmıştır (DeLoach ve Ihler, 1977).

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Kandan saflaştırılan hemolizatlar beklemeden kolona aktarıldı. Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işleminden sonra hCA I, 0,025 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 1 M NaCl, (pH=6,3) tamponu ile hCA II; 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5,6) tamponuyla ayrıldı. Ayrılanlar beş mL'lik tüpler şeklinde ayrılarak, bütün tüplerdeki enzim için 280 nm'de nitel protein tespiti yapıldı. Optik yoğunluk var olan tüplerde CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi çalışılır.

### 5.1. İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılması Sonucu hCA I ve hCA II İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez Sonuçları

Elektrofrez çalışması, uygun pH'da ve belirli elektrik ortamda pozitif, negatif parçacıkların hızlarının değişik olmasıyla ayrıştırılmasıdır. Alanın pH'ı tampon çözelti ile belli amperdeki akım ise, güç kaynağından gelir. Elektrofrezde ayırım, kütle ile ters ve yükü doğru orantılıdır. Bu yüzden proteinler farklı yük ve kütlere sahip olduklarından elektrofrezle ayrılabilir. Bu yöntemin üstünlüğü proteinlerin gözle görülebilir hale gelmesidir. Elektrofrez aynı zamanda izoelektrik nokta, yaklaşık molekül kütlesi gibi bir proteinin önemli özelliklerinin bulunmasını da sağlar.

Poliakrilamid jel üç farklı şekilde hazırlanabilir.

1. Jelin hazırlandığı yere göre: Slab jel, disk jel
2. Şartlara göre: Tabii şartlar, denatüre edici şartlar
3. Jelde akrilamid konsantrisine göre: Kesiksiz jel, kesikli jel

Slab Jel: İki katman aralığındaki jele denir.

Disk Jel: Deney tüplerinde olur.

Uygun koşullar: Ortam koşulları uygun şekilde getirilerek proteinin yapısı muhafaza edilir. Bu koşullarda elektrofrez, buz gibi ortamda yapılıp ve protein denatüre edici bütün şartlardan korunur.

Elektrofrezde, izoenzim deneyleri de gerçekleştirilebilir. İzoenzimle deney yaparken, proteinler dağılıncaya ardından jel proteine sonra substratın bağlanması sağlanır. Enzimin olduğu bölgeler renkli düz bantlar şeklinde görülür.

Saflığın ve molekül kütlesinin belirlenmesinde yararlanılan yöntem olan elektroforezde deterjan (Sodyum dodesil sülfat) kullanılır. Denatüre edici şartlarda ise, ortama SDS katarak ve de  $\beta$ -merkapt etanol ile  $\beta$ - sülfid bağları bölerek, proteinin yapısı bozulur. Aynı zamanda SDS, protein katlanmalarının kısmen açılmasını sağlayarak proteinlerin benzer şekilde olmasını sağlar. Sonuç olarak ayırım; yükle alakalı değil, molekül büyüklüğüyle alakalıdır. Bu yüzden SDS, poli peptid bağı yerine bir SDS molekülü tutunacak halde olduğundan, proteinler hep SDS ile elektrik alanda hareket edecek hale gelmiştir. SDS, yükün farklılığını yok eder. Proteinlerin ne kadar ayrıştırıldığını ortaya koymak SDS PAGE elektroforezi sayesinde olur.

Kesiksiz jelde, jelin uzandığı kısmı kadar akrilamid yoğunluğu aynıdır. Kesikli jelin, yukarı bölümüne yığılma jeli, aşağı bölümüne ayırma jeli denir. Kesikli jelin kullanılabilirliği fazladır. Bantlar belirgindir.

Jelin üstünde enzim yürüdüktan sonra, nerde olduğunu görmek için Coomassie brilliant blue R-250 bulunduran bir çözelti içinde iki saat karıştırılır. Coomassie brilliant blue R-250, proteinleri görünür kılar. Bu sırada hem protein olan yerler hem de zemin renklenir. Daha sonra jel renksizleştirme çözeltisi içine konarak ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) karışımı, uzun süre çalkalanır. Bu sırada zeminin rengi açılır, proteinlerin olduğu yerlerde bantlar oluşur. Asetik asit, metanol ve su karışımı boyalı iken; aktif karbondan geçirildiğinde maviyi tutar. Yeniden çözelti elde edilebilir.

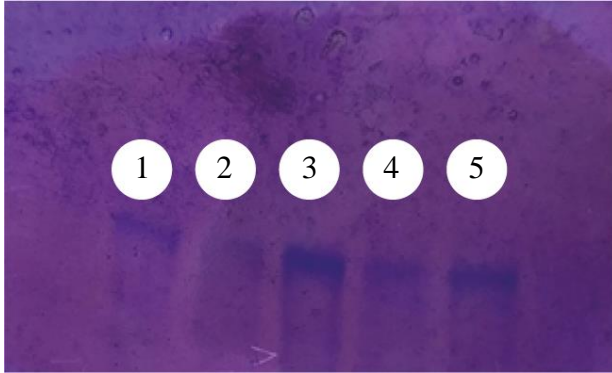
SDS-PAGE jel elektroforezi uygulanarak sonuç olarak yalnız bandın görülmesi, enzimin yabancı maddelerden ayrıştırılmış hali olduğuna işarettir.

Aynı zamanda tanımlanmamış bir protein molekül kütlesi bilinen molekül kütlesine sahip diğer proteinlerin jel üzerindeki konumlarıyla kıyaslanarak yaklaşık olarak hesaplanabilir. Eğer proteinin iki ya da daha fazla alt birimi varsa bu alt birimler SDS ile karıştıktan sonra ayrılmıştır, böylece her bir alt birim için ayrı bir bant gözlenir.

Bu elektroforezde afinite kolonundan izole edilen karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflığını görmek için SDS-poliakrilamid jel elektroforezi uygulandı. Bu amaç için oluşturulan SDS- poliakrilamid jel elektroforezine, insan kanından saflaştırılan izoenzimler aktarıldı. Zamanla oluşan enzimin çizgileri aşağıda belirtilmiştir.



**Görsel 5.1:** Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Fotoğrafi



1. standart hCA I, 2. saflaştırılan hCA I, 3. standart hCA II, 4. ve 5. saflaştırılan hCA II

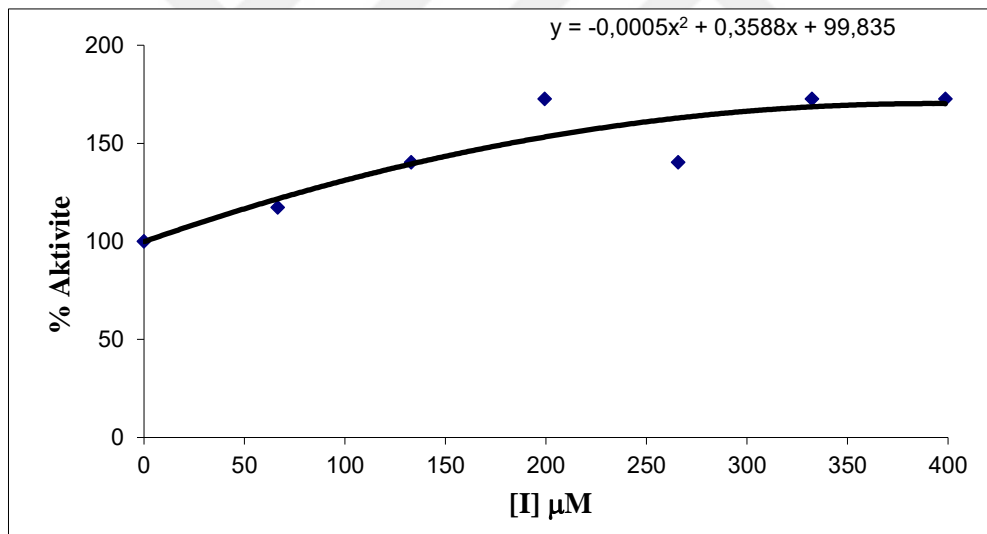
## 5.2. Glukozamin ve Türevlerinin İnsan Eritrosit hCA I Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

### 5.2.1. Bitkisel glukozaminin insan eritrosit hCA I enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

Kırmızı kan hücresi CA I enzimlerinin hidrataz aktiviteleri, bitkisel glukozaminin inhibisyon etkileri enzim üzerinde çalışılarak bulundu. Sonuca ulaşmak amacıyla kandan saflaştırılan CA I enzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı. %1'lik glukozamin çözeltisinin konsantrasyonları arttırılarak enzimin reaksiyon hızı belirlenerek aktivite-inhibitör grafiği ve tablosu oluşturuldu. %1'lik bitkisel glukozaminin CA enzimi üzerine aktivasyon etkisinin olduğu görüldü. Bu sonuç aşağıda grafikte verilmiştir.

**Tablo 5.2:** Bitkisel Glukozaminin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi

[I] ( $\mu\text{M}$ )	Aktivite (%)
0	100
50	117,29
100	140,35
200	172,63
250	140,35
350	172,63
400	172,63

**Grafik 5.3:** Bitkisel Glukozaminin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi

### 5.2.2. Glukozamin sülfatın insan eritrosit hCA I enziminin hidrataz aktiviteyi üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

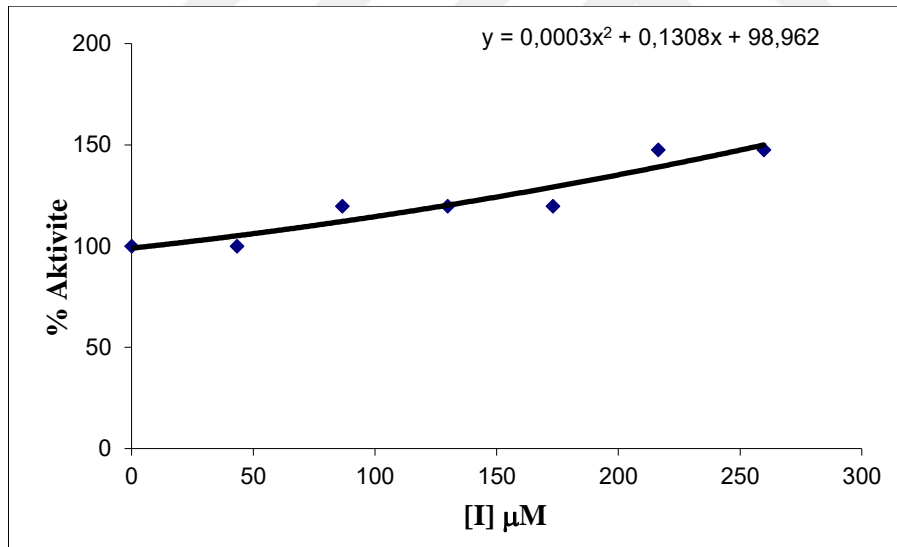
Kırmızı kan hücresi CA I enzimlerinin hidrataz aktiviteyi, glukozamin sülfatın inhibisyon etkileri enzim üzerinde çalışılarak bulundu. Sonuca ulaşmak amacıyla kandan ayrılan CA I enzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktiviteyi ölçümü yapıldı. %1'lik glukozamin sülfat çözeltisinin konsantrasyonları artırılarak enzimin reaksiyon hızı belirlenerek aktivite-inhibitör grafiği çizildi ve tablosu oluşturuldu. %1'lik

glukozamin sülfatın CA enzimi üzerine aktivasyon etkisinin olduğu görüldü. Bu sonuç aşağıda grafikte verilmiştir.

**Tablo 5.4:** Glukozamin Sülfatın hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi

[I] (μM)	Aktivite(%)
0	100
50	100
100	119,81
150	119,81
200	119,81
250	147,56
300	147,56

**Grafik 5.5:** Glukozamin Sülfatın hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi



### 5.2.3. Glukozamin kondroitin MSM'nin insan eritrosit hCA I enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

Kırmızı kan hücresi CA I enzimlerinin hidrataz aktiviteleri, glukozamin kondroitin MSM'nin inhibisyon etkileri enzim üzerinde çalışılarak bulundu. Sonuca ulaşmak amacıyla kandan ayrılan CA I enzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı. %1'lik glukozamin kondroitin MSM çözeltisinin

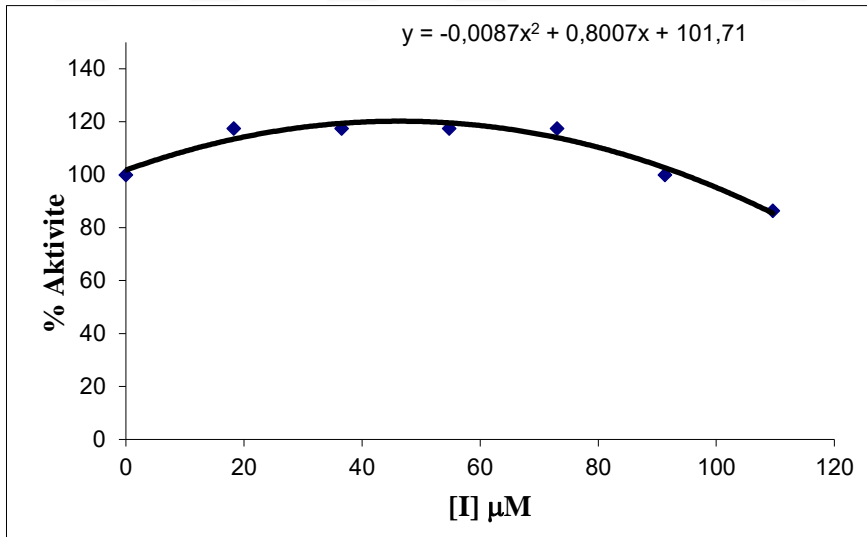
konsantrasyonları arttırılarak enzimin reaksiyon hızı belirlenerek aktivite-inhibitör grafiği çizildi ve tablosu oluşturuldu.

%1'lik glukozamin kondroitin MSM'nin CA enzimi üzerine aktivasyon etkisinin olduğu görüldü. Bu sonuç aşağıda grafikte verilmiştir.

**Tablo 5.6:** Glukozamin Kondroitin MSM' nin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi

[I] (μM)	Aktivite (%)
0	100
20	117,46
40	117,46
60	117,46
80	117,46
100	100
120	86,41

**Grafik 5.7:** Glukozamin Kondroitin MSM' nin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi



### 5.3. Glukozamin ve Türevlerinin İnsan Eritrosit hCA II Enzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin *İn Vitro* Olarak İncelenmesi

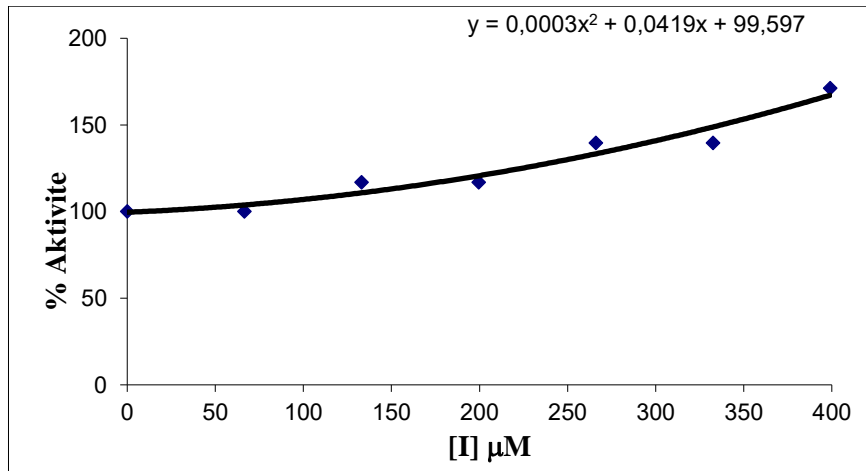
#### 5.3.1. Bitkisel glukozaminin insan eritrosit hCA II enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

Kırmızı kan hücresi CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri, bitkisel glukozaminin inhibisyon etkileri enzim üzerinde çalışılarak bulundu. Sonuca ulaşmak için insan kanından elde edilen CA II enzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı. %1'lik glukozamin çözeltisinin konsantrasyonları artırılarak enzimin reaksiyon hızı belirlenerek aktivite-inhibitör grafiği ve tablosu oluşturuldu. %1'lik bitkisel glukozaminin CA enzimi üzerine aktivasyon etkisinin olduğu görüldü. Bu sonuç aşağıda grafikte verilmiştir.

**Tablo 5.8:** Bitkisel Glukozaminin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi

[I] ( $\mu\text{M}$ )	Aktivite (%)
0	100
50	100
100	116,94
150	116,94
200	139,53
250	13953
300	171,16

**Grafik 5.9:** Bitkisel Glukozaminin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi



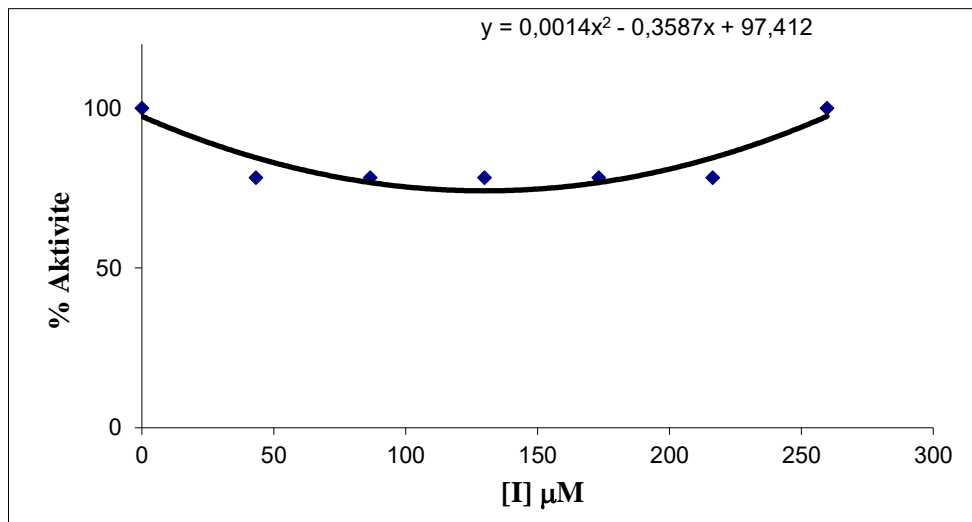
### 5.3.2. Glukozamin Sülfatın insan eritrosit hCA II enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

Kırmızı kan hücresi CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri, glukozamin sülfatın inhibisyon etkileri enzim üzerinde çalışılarak bulundu. Sonuca ulaşmak için insan kanından elde edilen CA II enzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı. %1'lik glukozamin çözeltisinin konsantrasyonları artırılarak enzimin reaksiyon hızı belirlenerek aktivite-inhibitör grafiği ve tablosu oluşturuldu. %1'lik glukozamin sülfatın CA enzimi üzerine aktivasyon etkisinin olduğu görüldü. Bu sonuç aşağıda grafikte verilmiştir.

**Tablo 5.10:** Glukozamin Sülfatın hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi

[I] ( $\mu\text{M}$ )	Aktivite (%)
0	100
50	78,26
100	78,26
150	78,26
200	78,26
250	78,26
300	100

**Grafik 5.11:** Glukozamin Sülfatın hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi



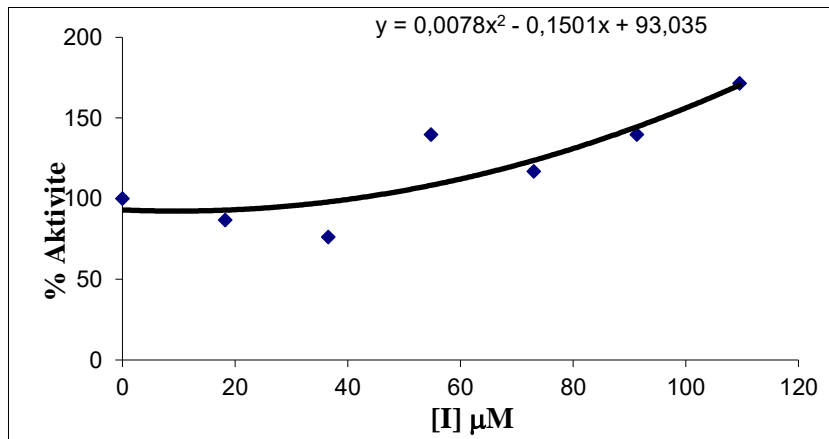
### 5.3.3. Glukozamin Kondroitin MSM'nin insan eritrosit hCA II enziminin hidrataz aktiviteleri üzerine inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi

Kırmızı kan hücresi CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri, glukozamin kondroitin MSM'nin inhibisyon etkileri enzim üzerinde çalışılarak bulundu. Sonuca ulaşmak için insan kanından elde edilen CA II enzimleri için uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivitesi ölçümü yapıldı. %1'lik glukozamin çözeltisinin konsantrasyonları artırılarak enzimin reaksiyon hızı belirlenerek aktivite-inhibitör grafiği ve tablosu oluşturuldu. %1'lik glukozamin kondroitin MSM nin CA enzimi üzerine aktivasyon etkisinin olduğu görüldü. Bu sonuç aşağıda grafikte verilmiştir.

**Tablo 5.12:** Glukozamin Kondroitin MSM'nin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi

[I] ( $\mu\text{M}$ )	Aktivite (%)
0	100
20	113,88
40	131,25
60	183,33
80	153,57
100	225
120	225

**Grafik 5.13:** Glukozamin Kondroitin MSM'nin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi



## 6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz enzimleri (E.C. 4.2.1.1) metaloproteinlerdir. Neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunur. CA enzimatik aktivitesi ilk önce hemolize kan örnekleri karbon oranının belirlenerek hemolizli kandan CO<sub>2</sub> salınımı ve CO<sub>2</sub> oluşumuna izin veren bikarbonatın dehidrasyonunu sağlayan biyokatalizörlerdir. Eritrositlerden ekstrakte edilmiştir. Metal grubu, hidroksit türü bu enzimlerin aktif bölgesinde dördüncü ligand olarak bulunur. Güçlü bir nükleofil (fizyolojik pH'da) gibi davranır ve CO<sub>2</sub>'in koordine edilmiş Zn (II) ile HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a dönüştürülmesi sağlanır. Su molekülü ile reaksiyon serbestleşmeye başlamıştır. Bundandır ki çözeltilindeki HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ın asidik bir formu üretilir. Bu da karbonik asittir. (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) Karbonik anhidraz, nükleofillik oluşturmak için hız belirleyici bir H<sup>+</sup>(proton) transfer reaksiyonu meydana gelir. Bu oldukça hızlı bir reaksiyondur. Bu katalitik döngü için karbonik anhidraz enzimi metal iyonu kullanır.

Aktivatörler, hCA'nın aktif bölgesine farklı bağlanma yerlerine bağlanabilir. Protonun yer değiştirmesi enzim aktivitesi için önemlidir. Ayrıca katalitik tepkimenin daha iyi anlaşılması için hem de farmakolojik olarak yararlı ilaçların tasarımı için ilk adımdır. Alzheimer, glokom tedavisinde, göz içi basıncın azalması için prostaglandin analogları, beta bloke edici ajanlar ve karbonik anhidraz inhibitörleri kullanılmaktadır. Glokom tedavisinde CA I ve CA II inhibitörleri; dorzolamid, brinzolamid bileşikler ve karbonhidratlardır. Lipofiliktir ve seçici değildir. Asetazolamid ve metazolamid de anti-glokom ajanları olarak kullanılır. Ancak tabletler şeklinde oral olarak verilir. Ayrıca, CA II izoformu kuvvetli inhibisyonu ilaç tasarımına adaydır. Çünkü bu enzim kritik bir enzimdir ve çok önemlidir. Bu yüzden CA II inhibitörleri glokom tedavisinde ilaç olması beklenir. Yani glokom tedavisi için CA enziminin bazı bileşikler ile inhibe edilmesi gerekir. Bu çalışmada inhibisyon grafiklerinde IC<sub>50</sub> değeri yoktur. Çünkü glukozamin ve türevleri hCA enzimini inhibe etmeyip, aktive etmiştir.

Yapılan çalışmalarda sülfonamidlerin, glokom tedavisi için kullanılan CA enziminin en güçlü organik inhibitörleri olduğu belirtilmiştir. Sülfonamidlerin (SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) araştırmacılar tarafından dikkatini çeken en önemli özelliği kolay iyonlaşabilen bir organik grup olmalarıdır. Sülfonamidler, CA inhibitörleri olarak kullanılırlar. Glukozamin de bir amin türevidir. Bu özelliğinden dolayı CA inhibitörü olarak



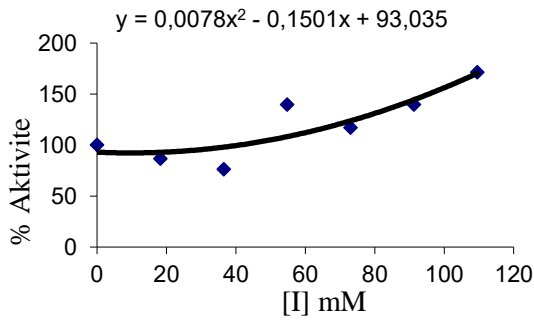
kullanılması mümkün olabilir. Bu çalışma ile glukozaminin Glokom tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağını ortaya koymak üzere yapılmış bir çalışmadır.

Daha önceki çalışmalarda asetazolamid, dorzolamid, brinzolamid, metazolamid, etokszolamid ve pazopanib, sülfonamid gibi bileşikler çalışılmıştır. Glukozamin ve türevleri de bir amin türevi olduğu için hCA izoenzimleri üzerine etkisi araştırılabilmektedir. hCA'ların inhibe olmasıyla tedaviler geliştirilebildiği gibi enzimlerin aktive olmasıyla da farklı tedaviler geliştirilebilmektedir. hCA enzimini aktive eden maddeler aminoasitler ( histamin, DOPA, triptofan) ve serotoninidir. Literatürde; tümör tedavisinde hCA IX ve hCA XII izoenzimlerini heterosiklik aminler, aminoasitler aktive ettiği bilinmektedir. İnsan karbonik anhidraz (hCA) izoenzimlerinden hCA III (sitozolik) ve hCA IV'ün (membran) amino asitler ve aromatik / heterosiklik aminler aktive etmektedir. En iyi hCA IV aktivatörleri, 4-amino-fenilalanin, serotonin ve 2-amino etildir. En iyi aktivatörlerden D-Histamin, serotonin, piridil-alkil aminler ve amino etil piperazinlerdir.

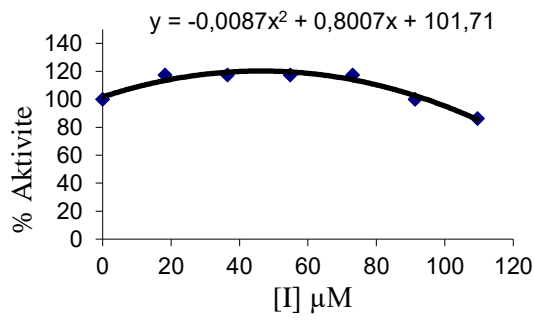
hCA izoenzimleri beyin ve sinir sisteminde de bulunur. Gözlerde göz sıvısı salgısını sağlayan hCA VII izoenzimi etkilidir. Glukozamin ve türevleri hCA VII izoenzimini aktive ettiği için göz sıvı salınımı artmaktadır. Bu yüzden gözde bir basınç meydana gelir. Bu da göze ciddi anlamda zarar vermektedir. Dolayısıyla glukozamin ve türevleri glokom tedavisinde kullanılmaya aday değildir. Glukozamin ve türevleri glokom tedavisi için önerilmemekte fakat Alzheimer veya nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılması ileriki çalışmalarda CA VII izoenzimi üzerine değerlendirilmesi mümkün olabilir.

Sonuç olarak grafiklerde görüldüğü gibi glukozamin ve türevlerinin karbonik anhidraz enzimi üzerine aktivasyon etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden glukozamin ve türevleri glokom tedavisi için kullanıma aday değildir. Fakat glukozamin ve türevlerinin Alzheimer tedavisinde kullanımı için çalışmalar yapılabilir.

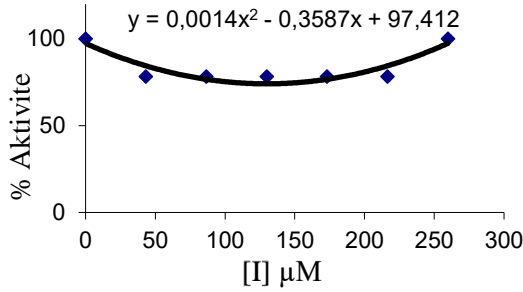
**Şekil 6.1:** Glukozamin Kondroitin MSM'nin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi



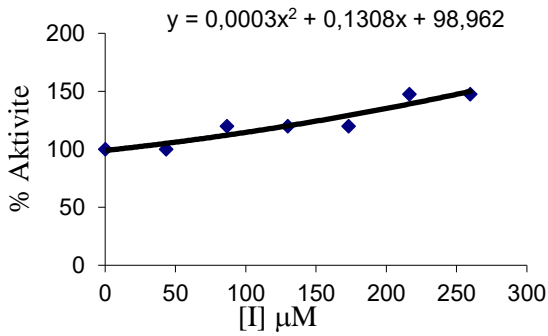
**Şekil 6.2:** Glukozamin Kondroitin MSM' nin hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi



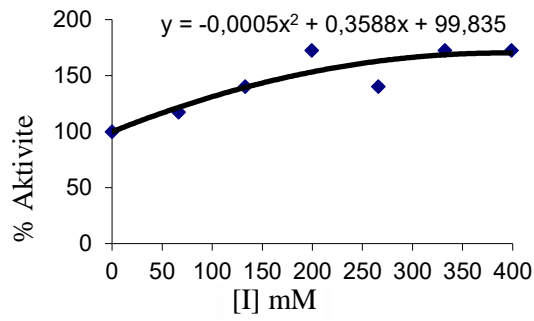
**Şekil 6.3:** Glukozamin Sülfatın hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi



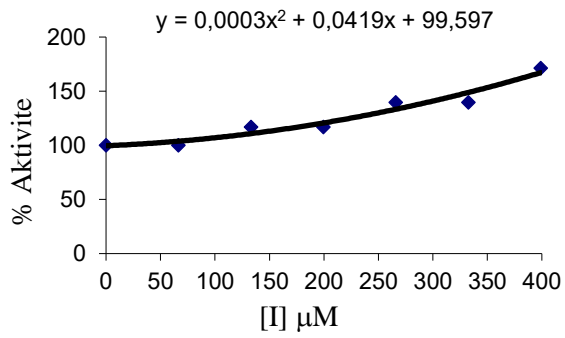
**Şekil 6.4:** Glukozamin Sülfatın hCA I Hidrataz Aktivitesine Etkisi



**Şekil 6.5:** Bitkisel glukozaminin hCA I hidrataz aktivitesine etkisi



**Şekil 6.6:** Bitkisel Glukozaminin hCA II Hidrataz Aktivitesine Etkisi



## KAYNAKÇA

- Aguiar, H. de F., Yamashita, A. S. ve Gut, J. A. W. (2012). Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 110-116. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.027
- Akbaba, Y., Akıncıoğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T. (2014). Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(1), 35-42. doi:10.3109/14756366.2012.750311
- Aksu, K., Nar, M., Tanc, M., Vullo, D., Gülçin, İ., Göksu, S., ... Supuran, C. T. (2013). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of sulfamides structurally related to dopamine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(11), 2925-2931. doi:10.1016/j.bmc.2013.03.077
- Baban, N. (1980). *Protein biyokimyası*. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları.
- Behçet, A., Çağlılar, T., Barut Celepci, D., Aktaş, A., Taslimi, P., Gök, Y., ... Gülçin, İ. (2018). Synthesis, characterization and crystal structure of 2-(4-hydroxyphenyl)ethyl and 2-(4-nitrophenyl)ethyl Substituted Benzimidazole Bromide Salts: Their inhibitory properties against carbonic anhydrase and acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Structure*, 1170, 160-169. doi:10.1016/j.molstruc.2018.05.077
- Blackwell, R. Q. ve Huang, J. T.-H. (1965). Simplified Preparation of Blood Hemolysates for Hemoglobin Electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 11(6), 628-632. doi:10.1093/clinchem/11.6.628
- Buker, S. M., Boriack-Sjodin, P. A. ve Copeland, R. A. (2019). Enzyme–Inhibitor Interactions and a Simple, Rapid Method for Determining Inhibition Modality. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery*, 24(5), 515-522. doi:10.1177/2472555219829898
- Cahlin, B. J. ve Dahlström, L. (2011). No effect of glucosamine sulfate on osteoarthritis in the temporomandibular joints—A randomized, controlled, short-term study.

*Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 112(6), 760-766. doi:10.1016/j.tripleo.2011.06.012

Carter, M. J. (1972). CARBONIC ANHYDRASE:ISOENZYMES. PROPERTIES. DISTRIBUTION. AND FUNCTIONAL SIGNIFICANCE. *Biological Reviews*, 47(4), 465-513. doi:10.1111/j.1469-185X.1972.tb01079.x

Cengiz, S. ve Cengiz, M. (1994). *Tip ve Fen Bilimleri Öğrencileri için Enzim Bilgisi*. İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı.

Cer, R. Z., Mudunuri, U., Stephens, R. ve Lebeda, F. J. (2009). IC50-to-Ki: A web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), W441-W445. doi:10.1093/nar/gkp253

Chance, B. (1957). A simple relationship for a calculation of the “on” velocity constant in enzyme reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 71(1), 130-136. doi:10.1016/0003-9861(57)90015-2

Christie, K. N., Thomson, C., Xue, L., Lucocq, J. M. ve Hopwood, D. (1997). Carbonic Anhydrase Isoenzymes I, II, III, and IV Are Present in Human Esophageal Epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(1), 35-40. doi:10.1177/002215549704500105

Cleland, W. W. (2009). Enzyme Kinetics: Steady State. John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences* içinde (s. a0000719.pub2). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9780470015902.a0000719.pub2

De Simone, G., Alterio, V. ve Supuran, C. T. (2013). Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8(7), 793-810. doi:10.1517/17460441.2013.795145

Deloach, J. ve Ihler, G. (1977). A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, 496(1), 136-145. doi:10.1016/0304-4165(77)90121-0

Figueroba, S. R., Moreira, J. C., Amorim, K. S., Cunha, L. D. L. L., Morais, T. M. L., Ferreira, L. E. N. ve Groppo, F. C. (2020). The Effect of Glucosamine Sulfate on Temporomandibular Joint of Ovariectomized Rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, S0266435620304691. doi:10.1016/j.bjoms.2020.08.078

- Geers, C. ve Gros, G. (2000). Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 681-715. doi:10.1152/physrev.2000.80.2.681
- Ghorai, S., Pulya, S., Ghosh, K., Panda, P., Ghosh, B. ve Gayen, S. (2020). Structure-activity relationship of human carbonic anhydrase-II inhibitors: Detailed insight for future development as anti-glaucoma agents. *Bioorganic Chemistry*, 95, 103557. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103557
- Gulcin, I. ve Beydemir, S. (2013). Phenolic Compounds as Antioxidants: Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(3), 408-430. doi:10.2174/138955713804999874
- Küçükbay, H., Buğday, N., Küçükbay, F. Z., Berrino, E., Bartolucci, G., Del Prete, S., ... Supuran, C. T. (2019). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide-dipeptide conjugates. *Bioorganic Chemistry*, 83, 414-423. doi:10.1016/j.bioorg.2018.11.003
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. ve Elçin, Y. M. (2016). *Lehninger biyokimyanın ilkeleri*. Ankara: Palme Yayınları.
- Leow, J. W. H. ve Chan, E. C. Y. (2019). Atypical Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450 enzymes: A focus on substrate inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 169, 113615. doi:10.1016/j.bcp.2019.08.017
- Liddle, L., Seegmiller, J. E. ve Laster, L. (1959). The enzymatic spectrophotometric method for determination of uric acid. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 54(6), 903-913. doi:10.5555/uri:pii:0022214359901210
- Menten, M. ve Michaelis, L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* içinde (C. 49, ss. 333-369). <http://web.lemoyne.edu/~giunta/menten.html> adresinden erişildi.
- Moi, D., Nocentini, A., Deplano, A., Balboni, G., Supuran, C. T. ve Onnis, V. (2019). Structure-activity relationship with pyrazoline-based aromatic sulfamates as carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII inhibitors: Synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 182, 111638. doi:10.1016/j.ejmech.2019.111638

- Nocentini, A., Moi, D., Balboni, G., Salvadori, S., Onnis, V. ve Supuran, C. T. (2018). Synthesis and biological evaluation of novel pyrazoline-based aromatic sulfamates with potent carbonic anhydrase isoforms II, IV and IX inhibitory efficacy. *Bioorganic Chemistry*, 77, 633-639. doi:10.1016/j.bioorg.2018.02.021
- Palmer, T. (1981). *Understanding enzymes*. Ellis Horwood series in biological science. Chichester: Horwood [u.a.].
- Parkkila, S, Parkkila, A. K., Juvonen, T. ve Rajaniemi, H. (1994). Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II, and VI in the human alimentary tract. *Gut*, 35(5), 646-650. doi:10.1136/gut.35.5.646
- Parkkila, Seppo, Vullo, D., Puccetti, L., Parkkila, A.-K., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase activators: Activation of isozyme XIII with amino acids and amines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(15), 3955-3959. doi:10.1016/j.bmcl.2006.05.023
- Pierce, J. ve Suelter, C. H. (1977). An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Analytical Biochemistry*, 81(2), 478-480. doi:10.1016/0003-2697(77)90723-0
- Poli, G., Bozdog, M., Berrino, E., Angeli, A., Tuccinardi, T., Carta, F. ve Supuran, C. T. (2020). N-aryl-N'-ureido-O-sulfamates as potent and selective inhibitors of hCA VB over hCA VA: Deciphering the binding mode of new potential agents in mitochondrial dysfunctions. *Bioorganic Chemistry*, 100, 103896. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103896
- Scozzafava, A. ve Supuran, C. T. (2002a). Carbonic anhydrase activators: Human isozyme II is strongly activated by oligopeptides incorporating the carboxyterminal sequence of the bicarbonate anion exchanger AE1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 12(8), 1177-1180. doi:10.1016/S0960-894X(02)00121-X
- Scozzafava, A. ve Supuran, C. T. (2002b). Carbonic Anhydrase Activators: High Affinity Isozymes I, II, and IV Activators, Incorporating a  $\beta$ -Alanyl-histidine Scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(2), 284-291. doi:10.1021/jm010958k

- Sibbritt, D., Adams, J., Lui, C.-W., Broom, A. ve Wardle, J. (2012). Who Uses Glucosamine and Why? A Study of 266,848 Australians Aged 45 Years and Older. *PLoS ONE*, 7(7), e41540. doi:10.1371/journal.pone.0041540
- Sim, J.-S., Im, A.-R., Cho, S. M., Jang, H. J., Jo, J. H. ve Kim, Y. S. (2007). Evaluation of chondroitin sulfate in shark cartilage powder as a dietary supplement: Raw materials and finished products. *Food Chemistry*, 101(2), 532-539. doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.011
- Stewart, W. C. (1997). Chronic open-angle glaucoma and lifestyle. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(4), 567-590. doi:10.1016/S1350-9462(96)00040-7
- Supuran, C. (2007). Carbonic Anhydrases as Drug Targets—An Overview. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(9), 825-833. doi:10.2174/156802607780636690
- Supuran, C. T. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 13(10), 1545-1550. doi:10.1517/13543776.13.10.1545
- Supuran, C. T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(6), 759-772. doi:10.3109/14756366.2012.672983
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. ve Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146-189. doi:10.1002/med.10025
- Şentürk, M., Ekinci, D., Göksu, S. ve Supuran, C. T. (2012). Effects of dopaminergic compounds on carbonic anhydrase isozymes I, II, and VI. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(3), 365-369. doi:10.3109/14756366.2011.591290
- Takeuchi, H., Supuran, C., Onishi, S. ve Nishimori, I. (2008). The  $\alpha$  and  $\beta$  Classes Carbonic Anhydrases from *Helicobacter pylori* as Novel Drug Targets. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7), 622-630. doi:10.2174/138161208783877875
- Tanini, D., Capperucci, A., Supuran, C. T. ve Angeli, A. (2019). Sulfur, selenium and tellurium containing amines act as effective carbonic anhydrase activators. *Bioorganic Chemistry*, 87, 516-522. doi:10.1016/j.bioorg.2019.03.062



- Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. ve Supuran, C. T. (2007). Carbonic anhydrase activators: L-Adrenaline plugs the active site entrance of isozyme II, activating better isoforms I, IV, VA, VII, and XIV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(3), 628-635. doi:10.1016/j.bmcl.2006.11.027
- Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A. ve Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrase activators: Kinetic and X-ray crystallographic study for the interaction of d- and l-tryptophan with the mammalian isoforms I–XIV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(18), 8373-8378. doi:10.1016/j.bmc.2008.08.043
- Temperini, C., Scozzafava, A. ve Supuran, C. (2008). Carbonic Anhydrase Activation and the Drug Design. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7), 708-715. doi:10.2174/138161208783877857
- Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. ve Supuran, C. T. (2006). Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with l- and d-Phenylalanine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isozyme II: Stereospecific Recognition within the Active Site of an Enzyme and Its Consequences for the Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(10), 3019-3027. doi:10.1021/jm0603320
- Tomashefski, J. F., Chinn, H. I. ve Clark, R. T. (1954). Effect of Carbonic Anhydrase Inhibition on Respiration. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 177(3), 451-454. doi:10.1152/ajplegacy.1954.177.3.451
- Vane, J. R. ve Botting, R. M. (1997). Mechanism of action of aspirin-like drugs. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 26, 2-10. doi:10.1016/S0049-0172(97)80046-7
- Vasiliadis, H. S. ve Tsikopoulos, K. (2017). Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. *World Journal of Orthopedics*, 8(1), 1. doi:10.5312/wjo.v8.i1.1
- Vistoli, G., Aldini, G., Fumagalli, L., Dallanoce, C., Angeli, A. ve Supuran, C. T. (2020). Activation Effects of Carnosine- and Histidine-Containing Dipeptides on Human Carbonic Anhydrases: A Comprehensive Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1761. doi:10.3390/ijms21051761
- Wang, J., Zang, H., Jiao, S., Wang, K., Shang, Z., Li, H. ve Lou, J. (2020). Efficient conversion of N-acetyl-D-glucosamine into nitrogen-containing compound 3-

acetamido-5-acetylfuran using amino acid ionic liquid as the recyclable catalyst. *Science of The Total Environment*, 710, 136293. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136293

Williams, B. A. R., Diehnelt, C. W., Belcher, P., Greving, M., Woodbury, N. W., Johnston, S. A. ve Chaput, J. C. (2009). Creating Protein Affinity Reagents by Combining Peptide Ligands on Synthetic DNA Scaffolds. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17233-17241. doi:10.1021/ja9051735

Winitz, M., Birnbaum, S. M. ve Greenstein, J. P. (1957). Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. IV. Influence of various carbohydrates on growth, with special reference to d-glucosamine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 72(2), 437-447. doi:10.1016/0003-9861(57)90219-9

Wu, Y.-R., Ren, S.-T., Wang, L., Liu, X.-J., Wang, Y.-X., Liu, S.-H., ... Cao, Z.-L. (2019). Synthesis and AChE inhibitory activity of N-glycosyl benzofuran derivatives. *Heterocyclic Communications*, 25(1), 162-166. doi:10.1515/hc-2019-0021

Yan, Y., Wanshun, L., Baoqin, H., Changhong, W., Chenwei, F., Bing, L. ve Liehuan, C. (2007). The antioxidative and immunostimulating properties of d-glucosamine. *International Immunopharmacology*, 7(1), 29-35. doi:10.1016/j.intimp.2006.06.003

Zhang, P., Roytrakul, S. ve Sutheerawattananonda, M. (2017). Production and purification of glucosamine and angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from mushroom hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 36, 72-83. doi:10.1016/j.jff.2017.06.049

Zinad, D. S., Mahal, A., Mohapatra, R. K., Sarangi, A. K. ve Pratama, M. R. F. (2020). Medicinal chemistry of oxazines as promising agents in drug discovery. *Chemical Biology & Drug Design*, 95(1), 16-47. doi:10.1111/cbdd.13633

