

AMİNOPİRİDİN TÜREVLERİNİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN KARBONİK
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gözde İMDAT

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Temmuz 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Gözde İMDAT tarafından hazırlanan “AMİNOPİRİDİN TÜREVLERİNİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

10/07/2019

Prof. Dr. Önder UYSAL
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Anabilim Dalı Başkanı, Biyokimya Bölümü


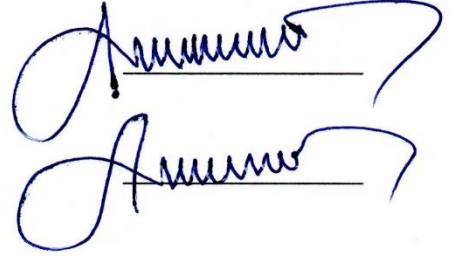
Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Danışman, Biyokimya Bölümü,
Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL
Biyokimya Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

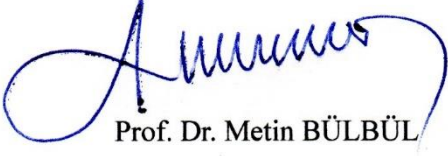
Prof. Dr. İsmail ÖZMEN
Kimya Bölümü, Süleyman Demirel Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA
Biyokimya Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığımı ve benzerlik oranının %24 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.


Prof. Dr. Metin BÜLBÜL


Gözde İMDAT

AMİNOPİRİDİN TÜREVLERİNİN VE METAL KOMPLEKSLERİNİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gözde İMDAT

Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi, 2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1.), karbondioksitin HCO_3^- ve H^+ iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidrasyonu reaksiyonunu katalizleyen, aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduran bir metaloenzimdir. İnsan göz dokusunda CA I, CA II ve CA IV izoenzimleri bulunur. Bunlardan CA I ve CA II izoenzimleri sitozolik iken, CA IV izoenzimi membrana bağlıdır. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aköz humorun fazla salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncını (IOP) düşürdükleri için glokom tedavisinde kullanılırlar.

Bu çalışmada, glokom hastalığı tedavisinde kullanılmaya aday yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin bu enzim üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Öncelikle insan eritrositlerinden hCA I ve hCA II izoenzimleri afinite jeli (Sephrose4B-L-tirozin-sülfanilamid) kullanılarak saflaştırıldı. Kalitatif ve kantitatif protein tayini yapıldı ve SDS-PAGE elektroforezi ile enzimlerin saflığı kontrol edildi. Enzim aktiviteleri kinetik çalışmalarla belirlendi.

Daha sonra sentezlenen yeni bileşiklerin (1-16) insan eritrosit hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bileşiklerin inhibisyon etkisini belirlemek için karbonik anhidraz enziminin hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü. İnhibisyon etkisi gösteren bileşikler için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri belirlendi. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i sabitleri hesaplandı.

Sentezlenen yeni bileşiklerin, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermediği, fakat esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösterdiği tespit edildi. Esteraz IC_{50} değerleri hCA I için 7,11-1,73 μM arasında, hCA II için ise 5,92-1,48 μM arasında bulundu. K_i değerleri ise hCA I için 3,64-1,12 μM arasında, hCA II için ise 2,63-0,63 μM arasında bulundu.

Anahtar Kelimeler: Aminopiridin türevleri, Glokom, IC_{50} değerleri, Karbonik anhidraz, Sülfonamidler.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF AMINOPYRIDINE DERIVATIVES AND METAL COMPLEXES ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ENZYME

Gözde İMDAT

Biochemistry, M. Sc. Thesis, 2019

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Carbonic anhydrase (CA) (E.C. 4.2.1.1.) is a metalloenzyme that contains zinc ion in its active site. It catalyses that the reversible hydration of carbon dioxide to yield bicarbonate and proton in a two-step reaction. Human eye tissue contains CA I, CA II and CA IV isoenzymes. CA I and CA II isoenzymes are cytosolic, but CA IV isoenzyme is membrane-bound. Carbonic anhydrase inhibitors have been used for treatment of glaucoma, because of their decrease higher intraocular pressure which occurs with excessive secretion of aqueous humor.

In this study, the inhibitory effects of new carbonic anhydrase inhibitors, which candidates for treatment of glaucoma, on this enzyme were investigated in vitro.

Firstly, hCA I and hCA II isoenzymes were purified from human erythrocytes by using affinity gel (Sephacrose-4B-L-tyrosine-sulfanilamide). The qualitative and quantitative protein assay was made and the purity of the enzymes was checked with SDS-PAGE electrophoresis. Enzyme activities were determined with kinetic studies.

Later, the inhibition effects of newly synthesized compounds (1-16) on hCA I and hCA II isoenzymes were determined. To determine inhibitory effects of the compounds, the hydratase and esterase activities of carbonic anhydrase enzyme were measured. %Activity vs. [I] graphics were drawn and the IC_{50} values were calculated for potential inhibitory compounds. The K_i constants were calculated from Lineweaver-Burk graphics.

According to in vitro studies, any inhibition effects of 1-16 compounds were not observed on hydratase activity of hCA I and hCA II isoenzymes. These new compounds inhibited the esterase activities of hCA I and hCA II isoenzymes. The IC_{50} values of compounds for esterase activity are 7,11-1,73 μ M for hCA I and 5,92-1,48 μ M for hCA II, respectively. The K_i values of these inhibitors are 3,64-1,12 μ M for hCA I and 2,63-0,63 μ M for hCA II, respectively.

Keywords: Aminopyridine derivatives, Glaucoma, IC_{50} values, Carbonic Anhydrase, Sulfonamides,

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Metin BÜLBÜL'e, maddelerin sentez ve karakterizasyon işlemlerini yapan Prof. Dr. Cengiz YENİKAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Halil İLKİMEN'e, bu çalışmada desteğini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ekrem TUNCA'ya, her zaman yanımda olup beni destekleyen aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GLOKOM.....	3
2.1. Primer Glokom.....	3
2.1.1. Primer açık açılı glokom.....	3
2.1.2. Primer kapalı açılı glokom.....	4
2.2. Sekonder Glokom	4
2.3. Steroid Bağımlı Glokom	4
2.4. Pigmentel Glokom	4
2.5. Psödoeksfolyasyon Glokom.....	4
2.6. Neovasküler Glokom	5
2.7. Mercek Bağımlı Glokom.....	5
2.8. Glokom Tedavisi	5
2.8.1. Prostaglandin analogları	5
2.8.2. Beta blokerlar.....	5
2.8.3. Adrenerjik ajanlar.....	6
2.8.4. Kolinergik ilaçlar	6
3. ENZİMLER	8
3.1. Enzimlerin Yapısal Özellikleri	8
3.2. Enzim Kinetiğine Etki Eden Faktörler.....	9
4. KARBONİK ANHİDRAZ.....	13
4.1. α Karbonik Anhidraz.....	14
4.2. β Karbonik Anhidraz.....	16
4.3. γ Karbonik Anhidraz.....	18

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4. δ Karbonik Anhidraz	19
5. DENEYSEL KISIM	20
5.1. Kimyasallar	20
5.2. Cihazlar	20
5.3. Deneylerde Kullanılan İnhibitörler	20
5.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	23
5.5. Protein Analizi	25
5.5.1. Kalitatif protein analizi	25
5.5.2. Kantitatif protein analizi	25
5.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçümü	25
5.6.1. Hidrataz aktivitesi analizi	25
5.6.2 Esteraz aktivitesi analizi	25
5.7 Afinite Jelinin Sentezlenmesi	26
5.7.1. Jel matrisine tirozin bağlanması	26
5.7.2. p-aminobenzen-sülfonamit kenetlendirilmesi	26
5.8. Eritrosit hCA I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması	28
5.8.1. Hemolizat hazırlanışı	28
5.8.2. Hemolizatın afinite kolonuna yüklenmesi ve CA izoenzimlerinin elüsyonu	28
5.8.3. Diyaliz işlemi	28
5.8.4. SDS-PAGE	28
5.9. İnhibitör Bileşiklerin hCA I ve II Üzerindeki Etkilerinin In vitro Koşullarda İncelenmesi	29
5.9.1. Hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyonun incelenmesi	29
5.9.2. Esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyonun incelenmesi	29
5.9.3. İnhibitör K_i değerlerinin belirlenmesi	30
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	31
6.1. hCA I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasına İlişkin Sonuçlar	31
6.2. SDS-PAGE Sonuçları	32
6.3. In vitro İnhibisyon Sonuçları	33
6.3.1. Hidrataz aktivitesi inhibisyonu	33
6.3.2. Esteraz aktivitesi inhibisyonu	33
6.3.3. İnhibitör bileşiklerin esteraz K_i sabitlerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	78

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Dönüşümsüz inhibisyon.....	10
3.2. Yarışmalı inhibisyon.....	11
3.3. Yarışmasız inhibisyon.....	11
3.4. Yarı yarışmalı inhibisyon.....	11
3.5. Lineer - Karışık tip inhibisyon (Gürsoy ve Gürsoy, 2017).....	12
4.1. CA'nın kataliz mekanizması.....	16
5.1. Afinite jelinin sentezi.....	27
6.1. hCA I ve hCAII izoenzimlerinin afinite kolonundan saflaştırılması (1-25: hCA I, 26-35: hCA II).....	31
6.2. Bradford metoduna göre protein kalibrasyon grafiği.....	32
6.3. SDS-PAGE sonuçları (Soldan sağa sırasıyla; standart hCA I (29 kDa), saflaştırılan hCA II, saflaştırılan hCAI).....	32
6.4. 1 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	34
6.5. 7 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	35
6.6. 8 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	36
6.7. 9 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	37
6.8. 10 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	38
6.9. 11 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	39
6.10. 12 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	40
6.11. 13 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	41
6.12. 14 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	42
6.13. 15 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	43
6.14. 16 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.....	44
6.15. 1 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	45
6.16. 7 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	46
6.17. 8 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	47
6.18. 9 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	48
6.19. 10 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	49
6.20. 11 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	50
6.21. 12 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	51
6.22. 13 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	52
6.23. 14 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.....	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
6.24. 15 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.	54
6.25. 16 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.	55
6.26. 1 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	56
6.27. 7 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	57
6.28. 8 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	58
6.29. 9 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	59
6.30. 10 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	60
6.31. 11 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	61
6.32. 12 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	62
6.33. 13 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	63
6.34. 14 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	64
6.35. 16 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.	65
6.36. 1 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	66
6.37. 7 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	67
6.38. 8 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	68
6.39. 9 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	69
6.40. 10 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	70
6.41. 11 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	71
6.42. 12 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	72
6.43. 13 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	73
6.44. 14 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	74
6.45. 16 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.1. Deneylerde kullanılan inhibitörler	21
5.1. Deneylerde kullanılan inhibitörler (devam)	23
6.1. 1 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	34
6.2. 7 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	35
6.3. 8 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	36
6.4. 9 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	37
6.5. 10 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	38
6.6. 11 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	39
6.7. 12 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	40
6.8. 13 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	41
6.9. 14 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	42
6.10. 15 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	43
6.11. 16 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	44
6.12. 1 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	45
6.13. 7 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	46
6.14. 8 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	47
6.15. 9 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	48
6.16. 10 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	49
6.17. 11 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	50
6.18. 12 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	51
6.19. 13 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	52
6.20. 14 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	53
6.21. 15 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	54
6.22. 16 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar	55
6.23. 1 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	56
6.24. 7 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	57
6.25. 8 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	58
6.26. 9 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	59
6.27. 10 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	60
6.28. 11 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	61
6.29. 12 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
6.30. 13 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	63
6.31. 14 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	64
6.32. 16 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	65
6.33. 1 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	66
6.34. 7 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	67
6.35. 8 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	68
6.36. 9 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	69
6.37. 10 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	70
6.38. 11 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	71
6.39. 12 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	72
6.40. 13 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	73
6.41. 14 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	74
6.42. 16 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlemesi amacıyla yapılan ölçümler	75
6.43. Esteraz IC_{50} ve K_i değerleri	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
Å	Angstrom
μ	Mikro
M	Molarite
°C	Celcius
mL	Mililitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
kDa	Kilodalton
K_m	Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu
K_i	İnhibisyon denge sabiti
V_{max}	Maksimum hız
[I]	İnhibitör konsantrasyonu
IC ₅₀	Enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu
[S]	Substrat konsantrasyonu

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CA	Karbonik anhidraz
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
DMSO	Dimetilsülfoksit
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250

1. GİRİŞ

Glokom terimi eski Yunanca'da "gri-mavi" anlamında kullanılan Glaukos kelimesinden türetilmiştir (dosya-depo/ Nevbahar Tamçelik). Glokom, dünya üzerinde körlük nedenleri arasında katarakttan sonra ikinci sırada gelen bir hastalıktır. İlerleyebilen retina gangliyonu hücre hasarı, optik sinir başında (OSB) çukurlaşma, kendine has görme alanı hasarları ile belirlenen kronik optik nöropatidir. Glokom hastalarında sıklıkla açık açılı glokom ve kapalı açılı glokom görülmektedir. Dünyada ise, açık açılı glokom ve kapalı açılı glokom, diğer tüm glokom şikayetlerinin yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (ICOGlaucomaGuidelines). Glokom hastalığı, geri dönüşümü olmayan görme kaybının en önemli nedeni olmakla birlikte, bu hastalığın yarattığı hasar, ırklar ve etnik gruplar arasında değişiklik göstermektedir. Batı ülkelerinde açık açılı glokoma bağlı görme kaybına daha fazla rastlanırken, Doğu Asya da kapalı açılı glokoma daha fazla rastlanmaktadır (ICOGlaucomaGuidelines).

Glokoma bağlı geri dönüşümü olmayan sinir hasarında esas risk etkeni göz içi basıncı (GİB) olarak görülsede, GİB nin normal görüldüğü ama ilerleyici optik sinir hasarı gelişebilen ya da GİB yüksek olmasına rağmen sinir hasarının görülmediği durumlar bulunmaktadır. Bu durum ise GİB yüksekliğinin hastalığın tanısında yeterli olmayacağını göstermektedir (Dursun vd., 2016).

Görme alanı optik sinir fonksiyonunu ölçmede en iyi test olarak bilinmektedir. Görme alanı, hasarları belirlemek ve hastalığın takibini yapmak için yeterlidir ancak görme alanının nesnel ve psikofiziksel bir test olması hastalığın erken teşhisini zorlaştırmaktadır. Glokomun tanısında ve hastalığın izlenmesinde meydana çıkan olumsuz durumları aşmak için, standart görme alanı testi, optik sinir başı ve retinal sinir lifi analizatörleri kullanılmaktadır (Dursun vd., 2016).

İlaç tedavisi, optik disk yıkımını, görme alanı değişikliklerinin önlenmesi amacıyla GİB'yi kişiye yeterli gelecek düzeye indirmektir. Glokom tedavisinde ilk olarak tercih edilen ilaçlar Beta blokerler, prostaglandin analogları, karbonik anhidraz inhibitörleridir. Bu ilaçların GİB üzerinde farklı etki tipleri vardır. Prostaglandin analogları GİB'i %30 a varan oranlarda düşürebilirken, GİB'nin çok yüksek olduğu durumlarda tak başına etkili olamayabilir. Timolol %0,5 ve dorzolamid %2 kombinasyonu GİB'i prostaglandin analogları ile aynı oranda düşürdüğü saptanmıştır (Bilgin vd., 2014).

Bu çalışmada ise glokom tedavisi için aminopiridin türevleri ve metal komplekslerinin insan karbonik anhidraz izo-enzimleri üzerinde inhibisyon etkilerinin incelenmesi sonucunda daha etkili ve daha az yan etkilere sahip yeni inhibitör bileşikler bulunması amaçlanmıştır.



2. GLOKOM

Glokom, göz içi basıncının artmasıyla ortaya çıkan ve körlüğe neden olabilen bir göz rahatsızlığıdır (Tunca, 2012). Glokom erkeklerden ziyade kadınlarda daha fazla ortaya çıkmaktadır (Taşkesen, 2002). Göz içi sıvısının serbest dolaşımı ve Schlemm kanalının drene olmasındaki bozukluk sebebi ile göz içi basıncında artış olması durumudur. Göz içi basıncı normal durumda 10-30 mmHg iken glokomlu durumda 70 mmHg seviyesine yükselir (Tunca, 2012).

Göz içi basıncı, göz içi sıvısının oluşumu ve akışı arasındaki dengenin oluşumudur. Göz içi sıvısı, gözün optik özelliklerini sağlamak için, oküler yapısını stabilize eder ve mercek ile korneayı besler. Göz içi sıvısının salgılanması kan-su bariyer yapısının bütünlüğüne ve pigmente olmamış epitel hücreleri arasında osmatik bir gradient oluşturan çözülmüş maddelerin aktif taşınmasıyla ilişkilidir. Bu durum ise su ve diğer maddelerin arka odaya taşınmasını uyarır (Tunca, 2012).

Hastalığın risk faktörleri içinde en belirgin olanı göz içi basıncının yükselmesidir. Miyopi, diyabet, yetersiz kan dolaşımı, lamina cribrosa bağ dokusu anomalileri, kafa içi basıncı düşüklükleri, otoimmün reaksiyonlar, birincil gangliyon hücresi dejenerasyonları diğer risk faktörleri olarak sıralanabilir (Taşkesen, 2002).

Glokom, Primer Glokom ve Sekonder Glokom olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır.

2.1. Primer Glokom

Primer glokomda, oküler ve sistemik hastalıklarla bir bağlantı yoktur. Yükselen göz içi basıncı, aköz humör yapımı ve dışa akımı arasındaki oluşan dengesizlik sonucu ortaya çıkar. Bu dengesizliğin nedeni olarak dışa akımın tıkanması görülür (Taşkesen, 2002).

2.1.1. Primer açık açılı glokom

Primer açık açılı glokom bilinen glokom çeşitlerinin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Primer açık açılı glokom hastalarında tipik glokomatöz optik sinir hasarı ve görme alanı kaybı bulunmaktadır. Araştırmalar trabeküler ağ örgüsü hücrelerinin yaşlılık ile birlikte devamlı olarak azaldığını göstermiştir. Bu azalma durumu PAAG hastalarında kısmen daha fazladır (Tunca, 2012).

2.1.2. Primer kapalı açılı glokom

Birçok ülkede primer glokomun en yaygın şeklini oluşturmaktadır. Primer kapalı açılı glokom, kapalı ön oda açısı ile bağlantılı olan glokom periferel iris ile trabeküler ağ örgüsünün geçici bir süre için bir araya gelmesinden veya ön oda açısındaki kalıcı adhezyonlardan kaynaklanmaktadır. PKAG'un en yaygın olan tipi aköz humörün arka odadan ön odaya geçişinin engellendiği, sığ odası olan gözler içinde ortaya çıkmaktadır. Arka oda içerisindeki basıncı geçen iridolentiküler blok tarafından bir direnç oluşturulduğunda periferel iris ön tarafa doğru itilecek ve eğer dar bir açı varsa tamamen kapatılacaktır. Eğer açı geniş ise arka odada basınç oluşmayacak ve normal şekilde akışına devam edecektir (Morrison ve Pollack, 2003).

2.2. Sekonder Glokom

Sekonder glokomda, glokom ilişkili olarak oküler ve sistemik anormallik söz konusudur. Sekonder glokom, gözbebeği yoluyla aköz humörün arka kamaradan ön kamaraya geçmesi ve Schlemm kanalına ulaşmasını etkileyen herhangi bir nedenle oluşmaktadır (Taşkesen,2002).

Bu çeşit glokom iltihaplar, damar hastalıkları, tümörlerden sonra ortaya çıkmaktadır (Tunca, 2012).

2.3. Steroid Bağımlı Glokom

Bu glokom türü çok nadir olmakla birlikte primer açık açılı glokom ile bazı bağlantılar göstermektedir (Morrison ve Pollack, 2003). Steroidler trabeküler ağ örgüsünde hücresel, biyokimyasal, moleküler değişikliklere neden olurlar ve bu değişikliklerden bir ya da birkaçı aköz humör akışına karşı direnç göstermeyi artırıp göz içi basıncını yükseltir. Bunun sonucunda glokomatöz optik sinir hasarına neden olur (Tunca, 2012).

2.4. Pigmentel Glokom

Trabeküler ağ örgüsünde pigment tortulaşması, göz içi basıncının artmasına neden olur ve bu artmada glokomatöz optik nöropatiye neden olur (Morrison ve Pollack, 2003).

2.5. Psödoeksfolyasyon Glokom

Schlemm kanalının fibröz doku ile dolmasına ve kanalın lümeninin kapanmasına neden olur. Bu kapanma ise glokoma sebep olur (Schlötzer-Schrehardt ve Naumann, 1995).

2.6. Neovasküler Glokom

Bu glokom çeşidi, diğer glokom çeşitleri arasında en şiddetli olandır. Anormal olarak yeni kan damarları aköz humor akışını engellemektedir. Bu glokom çeşidi tamamen ilerlediğinde kapalı bir ön oda açısı ve fazlasıyla yüksek göz içi basıncı oluşturur (Morrison ve Pollack, 2003).

2.7. Mercek Bağımlı Glokom

Bu glokom çeşidi açık açılı ya da kapalı açılı glokoma yol açar. Mercek bağımlı glokom kendi içinde fakolitik glokom, mercek partikül glokomu ve fakoanafilaktik glokom olmak üzere üçe ayrılır (Morrison ve Pollack, 2003).

2.8. Glokom Tedavisi

Glokom tedavisinde lazer ve cerrahi müdahalenin yanı sıra ilaç tedavisi de kullanılır. İlaç tedavisinde prostoglandin analogları, beta blokerler, adrenerjik ajanlar, kolinerjik ilaçlar, karbonik anhidraz inhibitörleri ve osmotik ilaçlar kullanılmaktadır (Tunca, 2012).

2.8.1. Prostoglandin analogları

Prostoglandin analogları göz içi basıncını düşürmek için kullanılan en iyi ilaçlardır (Van der Valk vd., 2005; Eisenberg ve Camiras, 2002; Netland vd., 2001; Sherwood ve Brandt, 2001).

Çoğu prostoglandin analogu mekanizması üveoskleral akış yolundan akışı arttırarak göz içi basıncını düşürmeye dayanır (Tunca, 2012).

Prostaglandin analogları, beta blokerlerle kıyaslandığında daha etkili ve potansiyel oküler hipotensif ajanlardır. Prostaglandin analoglar hem gece hem de gündüz etkili iken beta blokerler gündüz etkilidir (Orzalesi vd., 2006; Larsson vd., 2002).

2.8.2. Beta blokerlar

Propanolol 1964 yılında geliştirilen ve klinik olarak uygulanabilen ilk beta-adrenerjik antagonisttir (Netland, 2008; Tunca, 2012). Philips ve arkadaşları glokomlu hastalarda propanololün sistemik uygulamasında göz içi basıncı düşüşünü gözlemlemişlerdir (Philips vd., 1967). Ancak göz kaşınması, tahriş ve korneal anestezi gibi lokal yan etkiler ilacın kullanımında, geliştirilmesinde birtakım kısıtlamalara neden olmuştur (Netland, 2008).

Oküler beta bloker (OBB) ler topikal beta-adrenerjik antogonistlerdir. OBB'ler otuz yılı geçkin süredir göz içi basıncını düşürmede öncelikli olarak tercih edilmektedir. OBB'ler aköz oluşumunu azaltarak göz içi basıncını düşürürler. Aköz akışında bir değişiklik bulunmamakla birlikte aköz oluşumu %50 oranında azalabilmektedir (Yablonski vd. , 1987; Neufeld vd. , 1983; Coakes ve Brubaker, 1987; Gaul vd. , 1989; Reiss ve Brubaker, 1983; Yablonski vd. , 1987). OBB'ler genel olarak oküler hipertansiyonlu hastalarda ve açık-açılı glokomlu hastalarda kullanılmaktadır (Netland, 2008).

2.8.3. Adrenerjik ajanlar

Epinefrin: Açık-açılı glokomlu hastalarda göz içi basıncını düşürmek için kullanılan ilk adrenerjik ajandır. Epinefrinin göz içi basıncına yaptığı etki zamanla değişmektedir. Başlangıçta göz içi basıncı hafifçe yükselirken sonrasında 12 saatten 24 saate kadar değişiklik gösteren kalıcı bir azalma olur (Brubaker ve Gaasterland, 1984).

Epinefrin korneayı zayıf bir şekilde etkilediği için, %0,5'ten az konsantrasyonlar göz içi basıncını hafifçe düşürürken, %0,5 ve %1'lik konsantrasyonlar daha fazla etkilemektedir. Epinefrin taşikardi, sistemik hipertansiyon, kalp çarpıntısı gibi rahatsızlıklara neden olabilir (Tunca, 2012).

Dipivefrin: Epinefrin ve pivalik asidin diesterifikasyonu ile elde edilir ve epinefrine kıyasla daha az hidrofilik etkisi olan bir ilaçtır (Netland,2008). Dipivefrin, epinefrine kıyasla korneaya bağlı epitelyumu daha kolay etkiler. Bu yüzden epinefrine göre 10 veya 20 kat seyreltik konsantrasyonlarda kullanılabilir (Wei vd., 1978).

Klonidin: Glokom tedavisinde sistemik ve topikal olarak kullanılmaktadır (Tunca, 2012). Topikal klonidinin uzun süre boyunca kullanılması sistemik hipotansiyonun yol açtığı yan etkilere sebep olabilmektedir (Netland, 2008).

2.8.4. Kolinergik ilaçlar

Kolinergik ajanların, aköz humor oluşumu ve episkleral venöz basıncı üzerine etkileri oldukça azdır (Mindel, 2006). Bu ilaçlar göz içi basıncını aköz humor akışını etkileyerek düşürürler (Netland, 2008).

Pilokarpin: Pilokarpin nitrat solüsyon değerleri %0,5 ve %4 arasında değişiklik göstermektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde korneanın pilokarpini hızlı bir şekilde absorbe ettiğini ve aköz humorun salınmasında bir yavaşlama sağladığını göstermiştir. Ancak korneada oluşan yıkım sonucu, pilokarpinin %3'den az bir kısmı ön odaya ulaşabilmektedir.

Solüsyonun konsantrasyonuna bağlı olarak, göz içi basıncındaki en fazla düşüş 75 dk içerisinde meydana gelmektedir.

Pilokarpin ucuz ve etkili bir ajandır ancak lokal yan etkileri ve günde birkaç doz kullanılması gerekliliğinden dolayı günümüzde çok sık kullanılmamaktadır (Netland, 2008).

Karbakol: Ticari olarak satılan solüsyonları, koruyucu ve nemlendirici ajan olarak benzalkonyum klorür içerirler. Karbakol lipitlerde çözünmediği için korneal epitele zayıf nüfuz eder. Klinik olarak kullanılabilmesi için benzalkonyum klorür gibi korneal nüfuzu arttıran nemlendirici ajanlar ilave edilmesi etkinliğini arttıracaktır. Karbakolün uygulanmasından sonra göz içi basıncındaki maksimum düşüş dört saat içerisinde gözlemlenmektedir (Netland, 2008).

Ekotiyofat: Hastalar üzerinde yapılan doz analizinde ekotiyofatın konsantrasyonunun %0,06'nın üzerine çıkması göz içi basıncındaki düşme miktarını çok fazla etkilemediği gözlemlenmiştir (Stockdill ve Drance, 1965; Harris, 1971). Ekotiyofatın etki süresi pilokarpine kıyasla daha uzun sürelidir. Bazı durumlarda göz içi basıncı düşmesi bir haftadan uzun sürebilir (Netland, 2008).

3. ENZİMLER

Enzimler, hücrenin intermediyer metabolizmasını oluşturan binlerce kimyasal tepkimeyi yöneten protein molekülleridir. Proteinlerin primer yapısını meydana getiren aminoasitlerin dizilişi, genler ile belirlenir. Enzim proteininde bulunan aminoasitlerin dizilişi, enzimin üç boyutlu yapı kazanmasında önemlidir (Yöntem, 2011).

Enzim yapısındaki proteinlerin; primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapıları katalitik etkinlikleri için önemlidir. Bir enzimin protein bölümü aminoasit komponentlerine yıkılırsa katalitik etkinlik gösteremez (Bülbül, 2014).

3.1. Enzimlerin Yapısal Özellikleri

Enzimin, başka bir bileşiğe çevirmek için reaksiyona girdiği bileşiğe substrat denir. Bazı enzimler tamamen protein konstrüksiyonunda iken bazıları metal iyonları, şeker ya da lipitlere yapışık vaziyettedir. Enzimin konstrüksiyonuna katılan bu gruplar prostetik grup olarak isimlendirilir. Eğer prostetik grup, metal iyonu ise kofaktör, ısıya dayanıklı organik bir grup ise koenzim olarak isimlendirilir (Yöntem, 2011).

Enzimlerde ayrıştırılmayan ve ısıya dayanamayan protein kısmına apoenzim, enzim+koenzim kompleksine holoenzim denir (Yöntem, 2011).

Enzimlerde büyük bir katalitik kuvvet vardır. Enzimler olmaksızın reaksiyonlar çok yavaş ilerler. Katalizörler çok sayıda kimyasal reaksiyonda görev alırken, enzimler çoğunlukla tek tür reaksiyonu katalizlerler. Enzimler katalizledikleri reaksiyonların aktivasyon enerjilerini düşürürler. Enzimlerin katıldığı reaksiyonlarda verim %100'dür. Hiçbir yan ürün oluşmaz. Enzimler tersinir özelliktedirler. Hücrenin gereksinimi ile sentezi artan veya azalan enzimler indüklenebilir enzim, hücredeki konsantrasyonları sabit olan enzimler yapısal enzim olarak isimlendirilir (Yöntem, 2011).

Substratın enzim ile birleştiği bölgeye katalitik bölge (aktif bölge) denir. Binlerce molekül içinde bir enzim substratındaki çok ufak bir ayırmadan tanıyarak bağlanır. Enzimler dört tip özellik gösterir:

Mutlak Spesifite: Mutlak spesifite gösteren enzimlerde, enzim sadece kendine uyum sağlayan tek bir substrata bağlanır (Yöntem, 2011).

Nispi Spesifite: Nispi spesifite gösteren enzimlerde, enzimlerin birden substrata gösterdikleri tercihe denir (Yöntem, 2011).

Stereospesifite: Stereospesifite gösteren enzimlerde, enzimin birbirine eşdeğer iki substrat grubundan sadece birini seçmesine denir (Yöntem, 2011).

Bağ Spesifikliğı: Bir enzimin belirli bağ tipleri üzerinde etkili olmasıdır. Aktif bölge ve substratın anahtar-kilit gibi birbirlerine uymaları veya enzim substrata bağlandıktan sonra enzimin substratın yapısına göre değişiklik geçirdiğı ve katalizi sağladığı düşünülür. Kimi zaman enzimler inaktif olarak sentezlenir ihtiyaç olduğunda aktif hale getirilir. İnaktif yapıdaki bu öncü maddelere proenzim veya zimojen denir. Enzimin bu şekilde sentezlenmesinin sebebi, sentezlendiğı dokuya zarar vermemesi ve enzimin inaktif şekilde depolanabilmesidir (Yöntem, 2011).

3.2. Enzim Kinetiğine Etki Eden Faktörler

Enzim kinetiğı enzimler aracılığıyla katalizlenen tepkimelerin süratlerini inceler (Bülbül, 2016).

Sıcaklık: Her enzimin en verimli olduğu sıcaklık vardır. Bu sıcaklık derecesi enzimin hızını etkiler. Her enzimin verimli olduğu sıcaklık derecesine optimal sıcaklık denir (Yöntem, 2011).

pH: Enzimler farklı pH'larda farklı hızlarda çalışırlar. Her enzimin en randımanlı olduğu pH derecesine optimal pH denir (Yöntem, 2011).

Enzim konsantrasyonu: Enzimatik tepkimelerin hızı ortamdaki enzim ölçüsüyle eş zamanlı olarak değişir (Yöntem, 2011)

Substrat konsantrasyonu: Belirli miktar enzimin tepkime hızının substrat konsantrasyonuna bağlı olarak değişmesidir. İlk başta enzim-substrat ilişkisi düz bir çizgi şeklinde artarken, bir vakit sonra bir eğri yaparak değişmeden devam eder. Enzimatik tepkimenin artarak devam ettiği duruma birinci dereceden kinetik denirken, değişmeden devam ettiği duruma sıfırıncı dereceden kinetik denir. Tepkime hızı, substrat yoğunluğunun artmasıyla artacak ve sonunda ortamda hiç boş enzim kalmayacaktır. Sonrasında ortama substrat eklense bile tepkime hızında bir değişiklik olmayacaktır. Bu durumun sebebi enzimin doyum noktasına ulaşmış olmasıdır. Bu doyum noktasına V_{max} (V_m) denir. Enzimatik tepkimenin hızı maksimuma ulaştığında enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat yoğunluğuna Michealis-Menten sabitesi ismi verilir ve K_m ile gösterilir (Yöntem, 2011).

$$K_m = V_m / 2 \text{ 'dır.}$$

Zaman: Enzimatik tepkimede, enzim inaktive olmadığı sürece ürün oluşumu zamana bağlı olarak artmaya devam eder (Yöntem, 2011).

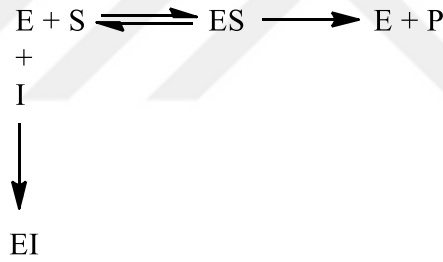
Reaksiyon ürünleri: Tepkimede oluşan ürünlerin ortamda birikmesi, enzimatik aktivite için sınırlayıcı etki yapar (Yöntem, 2011).

Fiziksel etkenler: Enzimatik aktivite, bazı ışınlar, kuvvetli çalkalama gibi etkenlerden olumlu ya da olumsuz şekilde etkilenir (Yöntem, 2011).

Hormonlar: Enzimatik aktivite bazı hormonlar tarafından da etkilenir (Yöntem, 2011).

İnhibitörler Enzim aktivitesini ortadan kısmen veya tamamen kaldıran maddelere inhibitör, bu olaya ise inhibisyon denir (Yöntem, 2011). Enzim inhibisyonu iki şekilde incelenebilir:

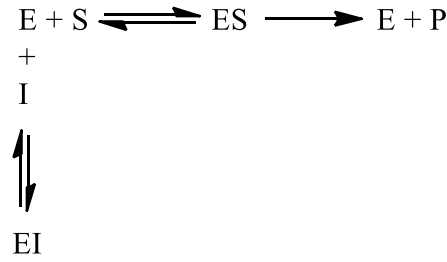
I. İrreversible inhibisyon: Bu inhibisyonda ortama eklenen madde enzim aktivitesini geri döndürülemez biçimde ortadan kaldırır (Yöntem, 2011).



Şekil 3.1. Dönüşümsüz inhibisyon.

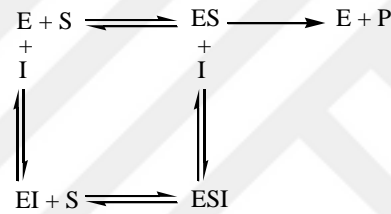
II. Reversible inhibisyon: Bu inhibisyonda ise enzim aktivitesi geri döndürülebilir. Bu inhibisyon dörde ayrılır:

a) Kompetitif inhibisyon: Bu inhibisyonda enzimin aktif bölgesi için substrat ve inhibitör yarışır. Enzim-inhibitör bağlanması sonucu ürün oluşmaz.



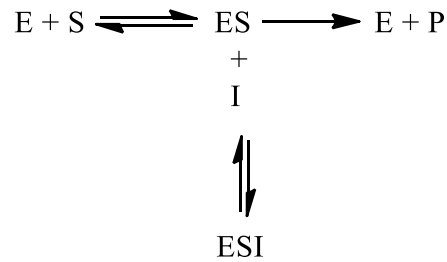
Şekil 3.2. Yarışmalı inhibisyon.

b) Nonkompetitif inhibisyon: Bu inhibisyonda, inhibitör enzimin aktif bölgesi dışında herhangi bir bölgeye bağlanarak eninde yapısal değişiklik meydana getirir (Bülbül, 2014). Böylece substrat aktif bölgeye bağlanamaz ve ürün oluşmaz (Yöntem, 2011).



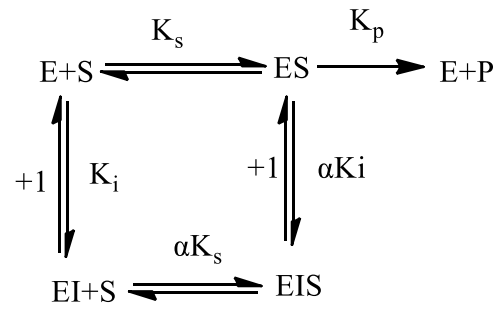
Şekil 3.3. Yarışmasız inhibisyon.

c) Unkompetitif inhibisyon: Bu inhibisyonda inhibitör substrat ile yarışmaz. İnhibitör serbest enzim yerine enzim-substrat birleşimine bağlanır ve ürün oluşumunu engeller. Aynı ortamda enzim, substrat, inhibitör olduğu için denge söz konusudur (Yöntem, 2011).



Şekil 3.4. Yarı yarışmalı inhibisyon.

d) Lineer- karışık tip inhibisyon: Bu inhibisyon ise, substratın EI kompleksine bağlanmasıyla, inhibitörün ise ES kompleksine bağlanmasıyla gerçekleşir. Her iki durumdada ESI kompleksi aktif durumda değildir (Tunca, 2012).



Şekil 3.5. Linear - Karışık tip inhibisyon (Gürsoy ve Gürsoy, 2017).



4. KARBONİK ANHİDRAZ

Karbonik anhidraz (CA), karbondioksitin bikarbonata tersinir hidrasyonunda etkili, katalizör olarak davranan, prokaryotlar ve ökaryotlarda bulunan çinko enzimidir. Karbonik anhidraz evrimsel olarak akraba olmayan dört farklı gen ailesinden kodlanmaktadır (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005).

Alfa-CA'lar omurgalılarda, bakterilerde, algler ve yeşil bitkilerin sitoplazmasında bulunur, beta- CA'lar algler, monokotiledon ve dikotiledonların kloroplastlarında ve bakterilerde baskın olarak bulunur Gama-CA' lar başlıca Arkea ve bazı bakterilerde bulunur. Teta- CA' lar diğerlerinden ayrı olarak bazı deniz memelilerinde bulunur (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005).

Memelilerde 16 farklı Alfa-CA izozimi veya CA bağımlı proteinler (CARP), dağıldığı doku ve çok farklı subselüler bölgeler ile tanımlanmıştır (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005).

Temel olarak, salgılanan CA izozimlerinde CA VI yanısıra, birkaç sitozolik form (CA-I, CA-III ve CA VII), beş membrana bağlı izozim (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV), bir mitokondrial (CA V) vardır (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005).

Bu enzimler, birçok basit fizyolojik tepkimeleri, karbondioksit ve bikarbonat iyonu arasındaki geri dönüşümü katalizler, akciğerler ve metabolizma dokuları arasındaki CO₂/bikarbonat'ın taşınması ve solunum ile bağlantılı çok önemli fizyolojik işlemlerde rol alır, pH ve CO₂ homeostazisi, çeşitli doku ve organlardaki elektrolit yayılımı, biyosentetik tepkimeler (glukoneogenezis, lipogenezis ve üreogenezis gibi), kemik geri emilimi, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik işlemleri katalizler (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005).

4.1. α Karbonik Anhidraz

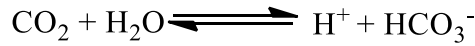
Metal iyonu (şimdiye kadar incelenen bütün CA'lar için Zn(II) dir.) katalizleme için esastır (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005). X-ray kristalografik verileri, metal iyonunun üç histidin proteini (His 94, His 96, His 119) ve bir su molekülü/ hidroksit iyonu ile koordine edildiği, 15 Å derinlikte bir aktif alan yarığının tabanında bulunduğunu göstermiştir (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005). Çinko bağlı su, Glu106'nın karboksilat parçasına köprü oluşturan Thr199'un hidroksilaz parçasına hidrojen bağı etkileşimleri yaparak bağlanır. Bu etkileşimler çinko bağlı su molekülünün nükleofilitesini artırır ve substratı (CO₂) nükleofilik saldırılar için uygun bir bölgeye yönlendirir (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supran vd., 2003; Smith ve Ferry, 2000; Liljas vd., 1972; Liljas vd., 1994; Lane ve Morel, 2000; Hilvo vd., 2005). Enzimin aktif formu, Zn(II) 'ye hidroksitin bağlanmasıyla oluşan temel bir yapıdır. Zn(II)' nin etrafındaki hidrofobik bir cebe CO₂ molekülünün bağlanması, bu güçlü nükleofil saldırılarını oluşturur (CA(II) izozimi durumunda, bağlanması zor olan substrat bağlanma bölgesi Val121, Val143 ve Leu198 kalıntılarını içerir.), böylece, Zn(II)' ye uyum sağlayan bikarbonat iyonunun oluşumu gerçekleşir. Bikarbonat iyonu daha sonra bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözelti içinde serbest hale gelir. Katalitik olarak pasif olan Zn(II)ye koordine edilmiş su ile enzimin asit formuna ulaşır. α CA' nın temel formunu yeniden canlandırmak için, aktif bölgedeki ortamdaki çevreye doğru bir proton transfer reaksiyonu gerçekleşir ve bu aktif bölgedeki amino asitler (His64) ya da ortamda bulunan tamponlar tarafından desteklenir. Katalizde hız sınırlama aşaması ikinci reaksiyondur, yani, enzimin çinko-hidroksit türünü yeniden üreten proton transferidir. CAII, CAIV, CA VII ve CAIX gibi katalitik açıdan çok aktif izozimlerde bu süreç, aktif bölgenin girişine yerleştirilmiş histidin kalıntıları (His64) ve aynı zamanda enzimin yüzeyinde aktif bölgenin kenarından çıkıntı yapan histidin ile desteklenmektedir, böylelikle CAII en etkili CA izozimi için çok verimli bir proton transfer süreci sağlar. Bu ayrıca niçin CAII'nin en aktif enzimlerden biri olarak bilindiğini, difüzyon kontrol sınırına yaklaştığını ve klinik uygulamalarla inhibitörlerin tasarımı için önemli sonuçlara sahip olduğunu açıklar. Bir CA inhibitörünün iki ana sınıfı vardır. Bunlar: metal kompleks anyonlar ve trigonal-bipiramidal türlerde oluşmuş ya proteinsiz çinko ligandına eklenerek ya da metal koordinasyon küresine eklenerek, enzimin Zn(II) iyonuna bağlanan sübstitüe edilmemiş sülfonamidlerdir. CAI'lerin en önemlileri olan sülfonamidler (klinik olarak kullanılan asetazolamid, metazolamid, etoxzolamid, diklorofenamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi), Thr199 ve Glu106 kalıntılarını

içeren, genişletilmiş hidrojen bağları ağı ve Zn(II)'ye koordine edilen sülfonamid parçasının azot atomu, deprotonlanmış bölge içerisinde, Zn(II) iyonunun tetrahedral geometrisine bağlanır. Bu bağlanmada inhibitör molekülü metal iyonuna sağlam bir şekilde bağlanır. İnhibitorun aromatik/heterosiklik kısmı, boşluğun hidrofilik ve hidrofobik kalıntıları ile etkileşime girer. Anyonlar, hem metal iyonun tetrahedral geometrisine hem de trigonal-bipiramidal eklentilere bağlanabilirler. X ışını kristalografik yapıları, CAI, CAII ve IV izozimleri ile sülfonamid/ sülfamat/ sülfamid inhibitörlerinin birçok eklentisi için mevcuttur. Bütün bu katkı maddelerinde, deprotonlanmış sülfonamid / sülfamat / sülfamid, enzimin Zn (II) iyonuna koordine edilir ve NH kısmı, Thr199'un bir hidrojen bağına katılır ve bu da Glu106'nın karboksilat grubunda başka bir hidrojen bağına tutunur. Ayrıca SO₂NH kısmının oksijen atomlarından biri Thr199'ün omurgasında NH kısmı ile bir hidrojen bağına katılır. CA II ile inhibitörlerinin çeşitli eklentilerinin örnekleri sülfonamid, sülfamat ve sülfamid inhibitörleri olarak sağlanmaktadır (Stams ve Christianson, 2000).

CA aktif bölgesinde, çok yüksek affiniteye ulaşan CAI sülfonamid etkileşimlerinin farklı tipleri, flor içeren sülfonamid inhibitör, PFMZ (Abbate vd., 2003), steroid sülfamat CA inhibitör, EMATE (Abbate vd., 2004), antiepileptik ilaç topimaratate 7 ve onun sülfamid analogu, bileşik 8 bulunmuştur (Winum vd., 2006). Bu yüzden kuvvetli CAI'ler sülfonamid, sülfamat veya sülfamid, çinko bağlantılı grupları kullanarak tasarlanabilir (Abbate vd., 2003; Abbate vd., 2004; Winum vd., 2006). Sülfonamid bileşiği PFMZ için, iyonize sülfonamid parçasının, doğal enzimde Zn'ye koordine edilen hidroksil iyonunun yerini aldığı, metal iyonunun stabil tetrahedral geometrisinde kaldığı, His94, His96 ve His119'un imidazolik azotları tarafından sülfonamidat azotuna ek olarak koordine edildiği gözlemlenir. Koordine sülfonamid azot atomunun protonu ayrıca Thr199'un hidroksil grubu ile bir hidrojen bağı yapar, bu da Glu106'nın karboksilatından bir hidrojen bağı kabul eder. Sülfonamid parçasının oksijen atomlarından biri Thr199'un omurga amidi ile bir hidrojen bağı oluşturur, diğeri ise katalitik Zn (II) iyonuna (3.0Å'lık O-Zn mesafesi) yarı-koordinasyona sahiptir. İnhibitörün tiyadiazolin halkası, aktif bölge yarığının hidrofobik kısmında yer alır, burada halka atomları, Leu204, Pro202, Leu198 ve Val135'in yan zincirleri ile Van der Waals etkileşimleri yapar. PFMZ'nin karbonil oksijeni, Gln92'nin (2.9Å'un) omurga amidinin azotu ile güçlü bir hidrojen bağı yapar, bu da asetazolamid-hCAII katkısı için de kanıtlanmıştır. Gln92'in yanı sıra, CA aktif alanın hidrofilik yarısında bulunan diğeri iki amino asit kalıntısı, yani Glu69 ve Asn67, hCAII'ye kompleks hale getirilmiş PFMZ molekülü ile Van der Waals etkileşimi yapar. Ancak, bu kompleksdeki kanıtlanmış en belirgin ve eşi görülmemiş etkileşimler, inhibitörün ekzosiklik azot atomunu içeren hidrojen bağı ağını, iki su molekülünü (Wat1194 ve Wat1199) ve PFMZ'nin

perfluorobenzoil kuyruğuna ait bir flor atomunu dikkate alır. Böylece, güçlü bir hidrojen bağı (2.9 Å), aktif bölgede ikinci bir su molekülü olan Wat1199 ile bir hidrojen bağı yapan PFMZ'nin imino azotu ve Wat1194 arasında kanıtlanmıştır ($2.7 \pm$ bir mesafe ile). Wat1194'ün ikinci hidrojeni, aynı zamanda, PFMZ'nin karbonil oksijeni ile daha zayıf bir hidrojen bağına (3.3 Å) katılmaktadır. Wat 1199'un diğer hidrojen atomu, PFMZ'nin perfluorobenzoil kuyruğunun 3. pozisyonunda flor atomu ile zayıf bir hidrojen bağı yapar. Son olarak, hCAII'ye uzun kuyrukları ile inhibitörlerin bağlanması için kritik bir kalıntı olan Phe131'in fenil kısmı ve PFMZ'nin perfluorofenil halkası arasında bir etkileşim gözlenmiştir (Supuran vd., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2000; Supuran vd., 2003). Aslında bu iki halka 3.4-4.7 Å'lık bir mesafede mükemmel paralellikte yerleşmişlerdir. Bu tip yığılma etkileşimleri bir hCAII sulfonamid eklentisinde asla gözlemlenmez. Benzer etkileşimler CA inhibitörlerinin sülfamat (EMATE ve topiramet) veya sülfamid için gözlemlenebilmektedir (Abbate vd., 2004; Winum vd., 2006).

Dört sistemik sülfonamid CAI geliştirildi ve antiglokom ilaçları uzun bir süre klinik ağırlıklı olarak kullanılmıştır. Bunlar: asetozolamid, methazolamid, etoksazolamid ve diklorofenomid'dir (Supuran vd., 2004).



Şekil 4.1. CA'nın kataliz mekanizması.

4.2. β Karbonik Anhidraz

Birçok türü Bacteria'ya ait olan, bazıları Archaea'ya (*Methanobacterium thermoautotrophicum* gibi), algler ve üst bitkilerin kloroplastlarında beta sınıfına ait olan CA ları içerir. Yukarıda tartışılan bu enzimler ve alfa CA lar arasındaki temel fark, beta CA ların genellikle 25-30 kDa molekül ağırlığında 2-6 arasında monomerden oluşan oligomerler olduğu gerçeğine dayanmaktadır. Şu anda ulaşılabilir olan dört beta CA X-ray yapısı vardır. Bunlar; *Porphyridium purpureum* kırmızı alg inden elde edilen enzim, *Pisum sativum*' ün kloroplastlarından elde edilen enzim, bu zamanda *Escherichia coli* ve *cab*' den izole edilmiş olan bir prokaryotik enzim, archeon *M. Thermoautotrophicum*' dan elde edilen enzimlerdir (Smith ve Ferry, 2000; Cronk vd., 2001; Mitsuhashi vd., 2000; Smith ve Ferry, 1999; Strop vd., 2001). *Po.purpureum* CA monomeri, üç alfa sarmal çıkıntısı ve bir alfa/beta_domain temel eşdeğer motiflerinin bir çiftinin katlanmasıyla oluşan iki katlı iç yapıardan oluşur. Bu motif hem alfa hem de teta CA dan çok farklıdır. Bu homodimerik CA yalancı bir 2-2-2 simetrisi ve

bir tetramer gibi görünür (Mitsuhashi vd., 2000). Beta CA'lar alfa sınıfı enzimlerden çok farklıdır. Zn(II) iyonu her iki enzim ailesinin katalizi için gereklidir, ama çinkonun koordinasyonu beta CA'lar için oldukça çeşitli ve farklıdır, bu yüzden prokaryotik beta CA içindeki Zn(II) iyonu iki sisteinat kalıntısı, bir His kalıntısından olan imidazol, ve bir Asp kalıntısına ait olan bir karboksilat tarafından koordine edilir, oysa iki sisteinat tarafından koordine edilen Zn(II) iyonuna sahip kloroplast enzimi, bir His kalıntısına ait olan imidazol ve bir su molekülü ile koordine edilir (Kimber ve Pai, 2000; Mitsuhashi vd., 2000). Polipeptid zincir katlanması ve aktif bölge yapısı, alfa sınıfına ait CA'lardan açıkça çok farklıdır (Mitsuhashi vd., 2000).

Çift katlı yalancı bir eksen tarafından birbirine bağlanan iki homolog kattan oluşan *Po.purpureum* enziminin bir monomerinde iki simetrik yapısal motif olduğu için üzerinde bulunan dört amino asit tarafından koordine edilen iki Zn(II) iyonu bulunur. Bu durumda bu çiftler; Cys149/Cys403, His205/His459, Cys208/Cys462 ve Asp151/Asp405 dir (Mitsuhashi vd., 2000). Her metal iyonunun yakınında bir su molekülü bulunur, ama Asp151/Asp405 çinko ligandına ait bir oksijen ile bir hidrojen bağı oluşturarak su molekülü metal iyonuna direkt olarak bağlanmaz. Trigonal-bipiramidal bir geometri elde eden Zn(II)'ye koordine olduğu zaman oluşabilen bir hidroksit iyonunun meydana gelmesi ile bu su molekülünden aspartat kalıntısının karboksilat parçasına koordine olmasıyla bir proton transfer reaksiyonu olabileceği varsayılmaktadır. Böylece, Zn(II)'ye bağlı bikarbonat üretimi ile bir hidrojen enzimin hidrofobik cebi içindeki CO₂ bağlarına tutunabilen güçlü nükleofil oluşturur. Bu ara bileşik alfa-CA katalitik döngüsü için önerilen reaksiyon ara bileşiği ile oldukça benzerdir, ancak beta sınıfı enzim için, başlangıçta çinkoya koordine edilmiş aspartik asit kalıntısı koordine edilmiş bikarbonat ile bir hidrojen bağına katılmak için önerilmiştir. Son adımda koordine edilmiş bikarbonat, Zn(II) iyonunun yeniden koordine edilmesi için oluşturulan aspartat ile birlikte solüsyon içerisinde serbest bırakılır ve beraberindeki su molekülü onunla bir hidrojen bağı oluşturur. Böylece enzim katalizin bir başka döngüsü için hazır olur (Mitsuhashi vd., 2000).

1.93 Å çözünürlükte *Pi. sativum* bitkisinin dikotiledonlarından β -CA'nın yapısı rapor edilmiştir. Molekül, dimer dizilişlerinin yeni bir dimeri ile oktomer olarak toplanır. Aktif bölge, asetik asit ile etkileşen Asp 162 (Arg 164 tarafından yönlendirildi), Gly 224, Gln 151, Val 184, Phe 179 ve Tyr 205 kalıntıları ve katalitik çinko iyonu bağı Cys 160, His 220 ve Cys 223 ile iki monomer arasındaki ara yüzde bulunur. Substrat bağlama grupları, α -CA aktif alanında fonksiyonel gruplarla birebir bir haberleşmeye sahiptir ve karşılık gelen kalıntılar bir ayna düzlemi gibi üst üste bindirilebilmektedir. Bu nedenle, farklı kıvrımlara rağmen, α - ve β -CA'lar

çok benzer bir aktif alan üzerinde birleşmişlerdir ve ortak bir etki mekanizmasını paylaşmaları muhtemeldir (Mitsuhashi vd., 2000).

Cab, β -CA'larda gözlemlendiği şekle benzer bir alt kat kıvrım ile bir dimer olarak bulunur. Aktif bölge çinko iyonu, bir su molekülü tarafından tamamlanan tetrahedral koordinasyon ile amino asit kalıntıları Cys32, His 87 ve Cys 90 tarafından koordine edildiği gösterilmektedir (Smith ve Ferry, 1999). Bitki ve cab tip β -CA'lar arasındaki ana farklılık, hidrofobik cebin organizasyonudur (yukarıda belirtilen çinko koordinasyonu hariç). Yapı ayrıca, aktif bölgeden çözücüye olası bir proton transfer yolu öneren aktif bölge çinkosundan 8Å uzaklıktaki bir Hepes tampon molekül bağı ortaya çıkarmıştır. Asetatın *Pi. sativum* enziminin Zn(II) iyonuna koordinatlanması haricinde, inhibitörlerin bu tip CA'lara bağlanması ile ilgili yapısal veriler şu anda mevcut değildir (Strop vd., 2001).

4.3. γ Karbonik Anhidraz

γ sınıfı CA'ların prototipi, Cam, metanojenik arkea *Methanosarcina thermophila*'dan izole edilmiştir (Iverson vd., 2000). Çinko içeren ve kobalt sübstitüe edilmiş Cam kristal yapıları, sülfat veya bikarbonat ile kristallenmiş ve bağlanmamış formda olduğu rapor edilmiştir. Cam, α - ve β - CA'lardan onu farklılaştıran birkaç özelliğe sahiptir. Protein katmanı, üç çıkıntılı ilmik tarafından kesilen ve ardından kısa ve uzun α sarmallar ile takip edilen iki yüzlü bir β heliks motifinden oluşur. Cam monomeri, yaklaşık 70 kDa molekül ağırlığı ile bir homotrimerde kendi kendine bağlanır. Aktif bölge içindeki Zn(II) iyonu, α - CA'larda olduğu gibi, aktif üç histidin kalıntısı tarafından koordine edilir, ancak α -CA'nın aktif bölgesinde görülen tetrahedral koordinasyon geometrisi ile karşılaştırılırsa, γ -CA'nın aktif bölgesi ek olarak metal bağlı su ligandları içerir, böylece tüm koordinasyon geometrisi, çinko içeren Cam için trigonal-bipiramidal yapıdadır ve kobalt ile ikame edilmiş enzim için oktahedraldir. Metal iyonunu koordine eden His kalıntılarının ikisi bir monomere (monomer A) ait iken üçüncüsü de bitişik monomerden (monomer B) gelmektedir. Böylece, üç aktif bölge, monomer çiftleri arasındaki ara yüzde bulunur. γ - CA'ların katalitik mekanizmasının, α sınıfı enzimler için sunulana benzer olduğu öne sürülmüştür. Yine de, Zn(II)'nin başlangıçta rapor edildiği gibi dört koordinatlı olmadığı, ancak metal iyonuna iki su molekülü bağlanması ile beş koordineli olduğu, bu enzimlerle ilgili olarak hala anlaşılması gereken çok şeyin olduğunu göstermektedir. Bu noktada çinko hidroksit mekanizması γ -CA'lar için geçerli kabul edilmektedir, çünkü enzim aktif bölgesinden gelen metal iyonunun trigonal-bipiramidal ve tetrahedral türü arasında bir denge olabileceği düşünülmektedir (Iverson vd., 2000). Aktif bölgeye bağlanan ligandların, bu yan zincirin muhtemel protonlanmasını önerecek şekilde Glu62'nin yan zinciri ile bağlantı

yaptığı gösterilmiştir. Basit bir şekilde çinko içeren Cam içerisinde, Glu62 ve Glu84'ün yan zincirlerinin bir protonu paylaştığı görülmektedir. Buna ek olarak Glu84 çoklu konformasyon sergilemektedir. Anyonların ve sülfonamidlerin de Cam'e bağlandığı gösterilmiştir (Innocenti vd., 2004; Zimmerman vd., 2004).

4.4. ̈ Karbonik Anhidraz

Zn X-ray absorpsiyon spektrokopisinde, deniz diatomu *Thalassiosira weissflogii* CA (TWCAI)'nın aktif bölgesinin memeli CA'lar ile çarpıcı şekilde benzer olduğunu göstermektedir. Çinko, üç histidin ligandına ve bir su molekülüne sahiptir, iki sistein tiyolat, bir histidin ve bir su molekülü tarafından koordine edilen çinko, yüksek bitkilerdeki β - CA'lardan oldukça farklıdır (Cox vd., 2000). Diatom karbonik anhidrazi, diğer karbonik anhidrazlar ile anlamlı bir dizi benzerliği göstermez ve moleküler seviyede yakın bir evrim örneği oluşturmaz. Aynı diatomda, CA tipi protein bulunduran ilk kadmiyum içeren enzim daha şaşırtıcı bir keşif olmuştur (Lane ve Morel, 2000).

5. DENEYSEL KISIM

5.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan materyaller olan CNBr-Sepharose®-4B, 4-nitrofenil asetat, TEMED, TRIS, NaCl, Na₂SO₄, NaClO₄, CH₃COONa, Na₂HPO₄, sodyum barbitol, NaHCO₃, HCl, H₃PO₄, aseton, etanol, H₂SO₄, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 ve R-250, NaOH ve CO₂ gazı Sigma Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

5.2. Cihazlar

Deneylede KDPÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü'nde bulunan aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır.

UV-Vis Spektrofotometre:	SHIMADZU UV1700 PharmaSpec
Soğutmalı Santrifüj:	SIGMA K30
Santrifüj:	HETTICH Rotofix 32A
pH metre:	MILWAUKEE Mi 150
Peristaltik Pompa:	ISMATEC Reglo Analog MS 2/6
Magnetik Karıştırıcı:	VELP Are
Vortex:	HEIDOLPH ReaxTop
Hassas Terazi:	SHIMADZU ATX 224
Mikropipetler:	METTLER TOLEDO Rainin

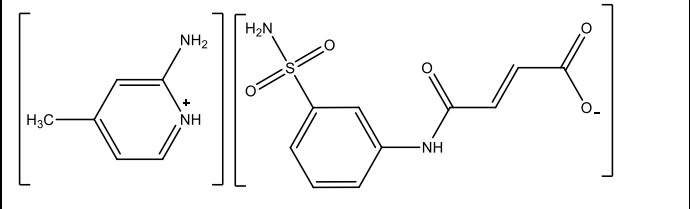
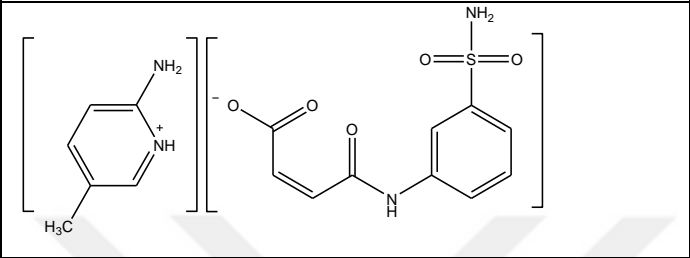
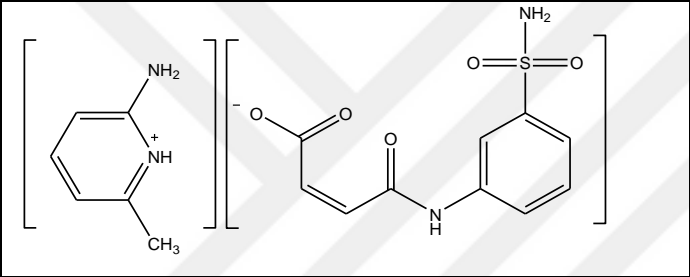
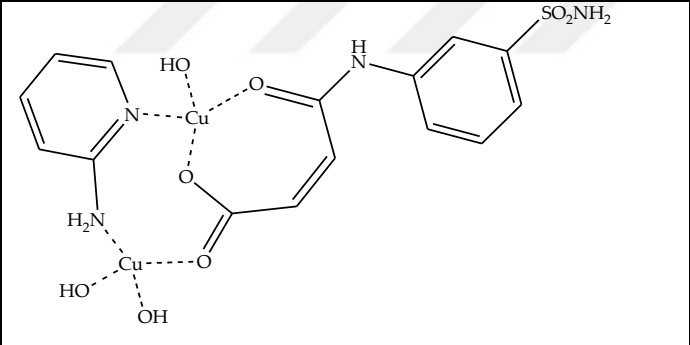
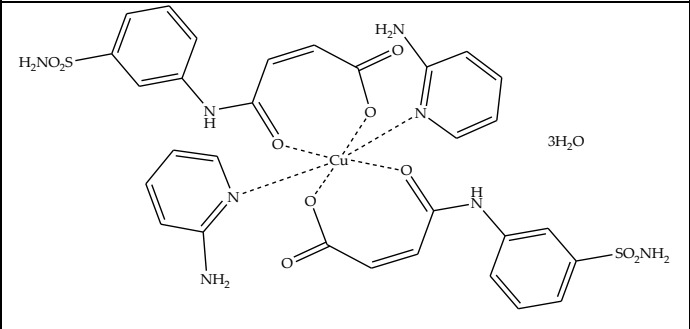
5.3. Deneylede Kullanılan İnhibitörler

Deneylede kullanılan inhibitör bileşikler Çizelge 5.1 de listelenmiştir.

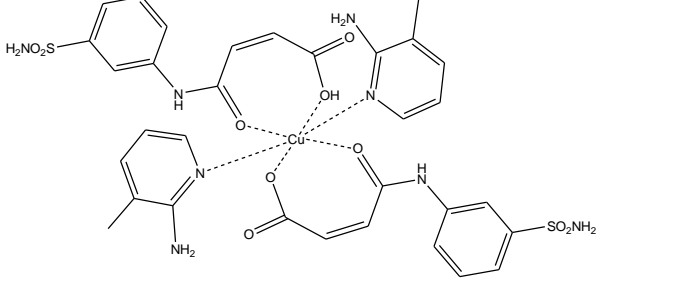
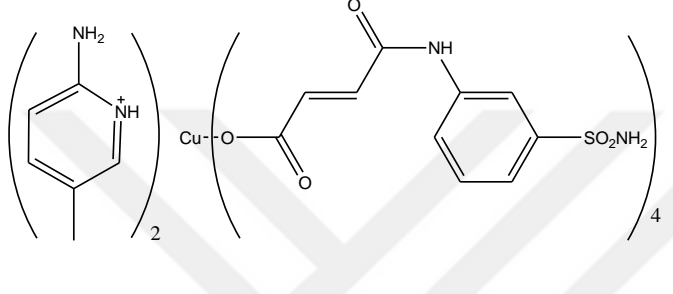
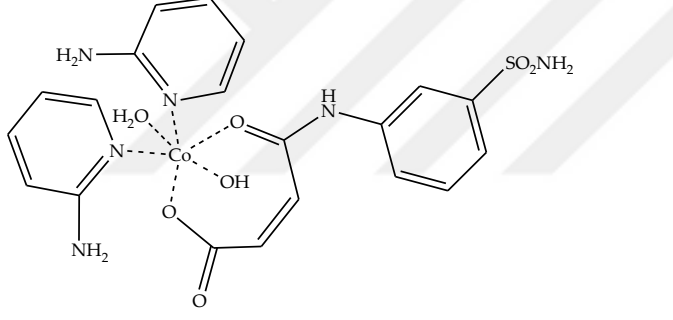
Çizelge 5.1. Deneylerde kullanılan inhibitörler.

Molekül Formülü	Bileşiğin Adı	Kodu
	(E)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoik asit	1
	2-aminopiridin	2
	2-amino-3-metilpiridin	3
	2-amino-4-metilpiridin	4
	2-amino-5-metilpiridin	5
	2-amino-6-metilpiridin	6
	2-aminopiridinyum (E)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enat	7
	2-amino-3-metilpiridinyum (E)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enat	8

Çizelge 5.1. (devam) Deneylede kullanılan inhibitörler.

	<p>2-amino-4-metilpiridinyum (<i>E</i>)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enat</p>	9
	<p>2-amino-5-metilpiridinyum (<i>E</i>)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enat</p>	10
	<p>2-amino-6-metilpiridinyum (<i>E</i>)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enat</p>	11
	<p>μ-(2-aminopiridin-κ^2-<i>N,N'</i>)-μ-{(<i>Z</i>)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato-κ^3-<i>O,O',O''</i>}hidrosobakır(II)</p>	12
	<p>bis(2-aminopiridin)hidrosobis{(<i>Z</i>)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato-κ^2-<i>O,O'</i>}bakır(II) (</p>	13

Çizelge 5.1. (devam) Deneyleerde kullanılan inhibitörler.

	<p>bis(2-amino-3-metilpiridin)bis{(Z)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato-κ²-O,O'}</p> <p>bakır(II)</p> <p>(Cu-<i>mabsmal-2a3mp</i>)</p>	14
	<p>2-amino-5-metilpiridinyum tetrakis{(E)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoato-κ¹-O'}</p> <p>bakır(II) (Cu-<i>mabsmal-2a5mp</i>)</p>	15
	<p>Akuabis(2-aminopiridin)hidrokso{(Z)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino}büt-2-enoato-κ²-O,O'}</p> <p>kobalt(II)</p> <p>(Co-<i>mabsmal-ap</i>)</p>	16

5.4. Deneyleerde Kullanılan Çözeltiler

Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve nasıl hazırlandıkları aşağıda belirtilmiştir:

1. Esteraz aktivitesi ve diyaliz tamponu, 0,05 M TRIS-SO₄, pH 7,4: 6,055 g TRIS, yeterli miktarda suda çözüldü. H₂SO₄ çözeltisi ile pH 7,4'e getirilerek hacim 1L ye tamamlandı.

2. Afinite jeli hazırlama tamponu, 0,2 M NaHCO₃, pH 8,8: 16,8 g NaHCO₃, yeterli miktarda suda çözüldü. NaOH çözeltisi ile pH 8,8'e getirilerek hacim 1 L ye tamamlandı.

3. Hidrataz aktivitesi tamponu; 5,15 g sodyum barbital yeterli miktarda suda çözüldü, HCl çözeltisi ile pH 8,2'ye getirilerek hacim 1 L ye tamamlandı.

4. Jel dengeleme tamponu, 25mM TRIS-HCl/0,1 M Na₂SO₄, pH 8,7: 3,0275g TRIS ve 14,2 g Na₂SO₄, yeterli miktarda suda çözüldü, HCl çözeltisi ile pH 8,7'ye getirilerek hacim 1 L ye tamamlandı.

5. Afinite jeli yıkama tamponu, 25 mM TRIS-HCl/22 mM Na₂SO₄, pH 8,7: 3,0275 g TRIS ve 3,124 g Na₂SO₄, yeterli miktarda suda çözüldü, HCl çözeltisi ile pH 8,7'ye getirilerek hacim 1 L ye tamamlandı.

6. hCA I elüsyon tamponu, 0,025 M Na₂HPO₄/1M NaCl, pH 6,3: 8,875 g Na₂HPO₄ ve 14,625 g NaCl 200 mL yeterli miktarda suda çözüldü, HCl çözeltisi ile pH 6,3'e getirilerek hacim 250 mL ye tamamlandı.

7. hCA II elüsyon tamponu, 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄, pH 5,6: 9,187 g NaClO₄ ve 2,09 g NaCH₃COO.H₂O, yeterli miktarda suda çözüldü, HCl çözeltisi ile pH 5,6'ya getirilerek hacim 150 mL ye tamamlandı.

8. Elektroforez numune yükleme tamponu: 3 mL 1 M TRIS-HCl (pH 6,8), 1,2 g SDS, 6 mL %100 lük gliserol , 0,005 g bromofenol blue ve 0,6 mL 2-merkaptoetanol karıştırıldı.

9. Elektroforez numune yürütme tamponu: 3,0 g TRIS, 14 g glisin ve 1,0 g SDS 500 mL suda çözüldü.

10. Doymun karbon dioksit çözeltisi: 0 °C de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

11. Kantitatif protein analiz çözeltisi, CBB G-250 reaktifi: 0,01 g CBB G-250, 5,0 mL saf etil alkol içerisinde çözüldü. Bu çözeltiliye 10 mL %95 lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi su ile 100 mL' ye tamamlandı.

12. Jel boyama çözeltisi: 0,1 g CBB R-250, %50 metanol, %10 glasiyel asetik asit ve %40 saf su karışımında çözümlenerek hazırlandı.

13. Elektroforez jeli yıkama çözeltisi: %10 metanol ve %7 glasiyel asetik asit içerecek şekilde hazırlandı.

14. İnhibitör stok çözeltileri: DMSO içerisinde %1 lik olarak hazırlandı.

5.5. Protein Analizi

5.5.1. Kalitatif protein analizi

Afinite kromatografisi sonunda birbirine toplanan elüatlar için kalitatif protein tayini 280 nm dalga boyunda yapıldı.

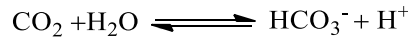
5.5.2. Kantitatif protein analizi

Analiz işlemlerinde; 1,0 mg/mL protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden cam tüplere 10-100 µL arasında değişen on farklı hacimde alındı. Saf su kullanılarak tüm tüplerin hacmi, 100 µL'ye tamamlandı. 5 mL CBB G-250 reaktifi tüplere eklenerek çalkalandı. 10 dk'lık inkübasyonun sonunda 595 nm dalga boyunda absorbanans değerleri ölçüldü. Standart eğri hazırlandı.

5.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesinin Ölçümü

5.6.1. Hidrataz aktivitesi analizi

Aktivite ölçümü Wilbur-Anderson metoduna göre yapıldı. Bu metotta; CO₂'nin hidratasyonu ile açığa çıkan H⁺ iyonunun pH'ı 8,2 den 6,3 e düşürmesi için gereken süre ölçülür. Aktivite; enzimsiz CO₂ hidratasyon zamanı (t₀) ile enzimli reaksiyon zamanı (t_c) arasındaki farkın t_c'ye bölünmesi ile belirlenir.

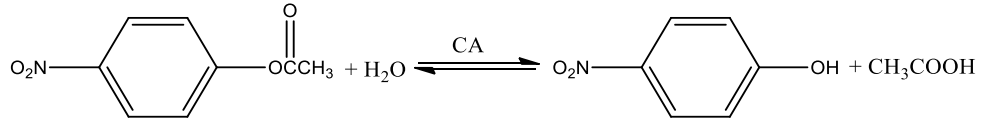


Reaksiyon ortamına 0,1 mL brom timol çözeltisi, 1 mL veronal tamponu, 0,5 mL su, 0,1 mL enzim çözeltisi ve son olarak 2,5 mL doymuş CO₂ çözeltisi eklenerek indikatörün mavi renginin sarıya dönmesi için gereken zaman ölçüldü (t_c). Enzimsiz hidratasyon zamanı ölçümü için enzim yerine saf su kullanıldı (t₀). Bu metoda göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz şekilde oluşan CO₂ hidratasyon zamanını, yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlamaktadır. Yani; EU= (t₀-t_c)/t_c formülüne göre enzim ünitesi hesaplanmıştır.

5.6.2 Esteraz aktivitesi analizi

Ölçüm için, reaksiyon ortamına 1,3 mL tampon, 1,0 mL p-nitrofenil asetat (substrat) çözeltisi, 0,6 mL su ve 100 µL enzim çözeltisi eklenip 25 °C de 348 nm de 3 dk boyunca absorbansta meydana gelen artış not edildi. Deneyde, öncelikle üç dakikada esterin kendi kendine hidrolizlenmesi sonucu meydana gelen absorbanans değişimi belirlendi. Ölçümlerde kullanılan substrat çözeltisi iki saatte bir tazelenildi. Substrat hazırlamak için 27,2 mg p-nitrofenil

asetat, 1,0 mL aseton içerisinde çözüldü, hızlıca karıştırılan 49,0 mL saf su içerisinde damla damla eklenerek hazırlandı (Kohn ve Wilchek, 1978).



5.7 Afinite Jelinin Sentezlenmesi

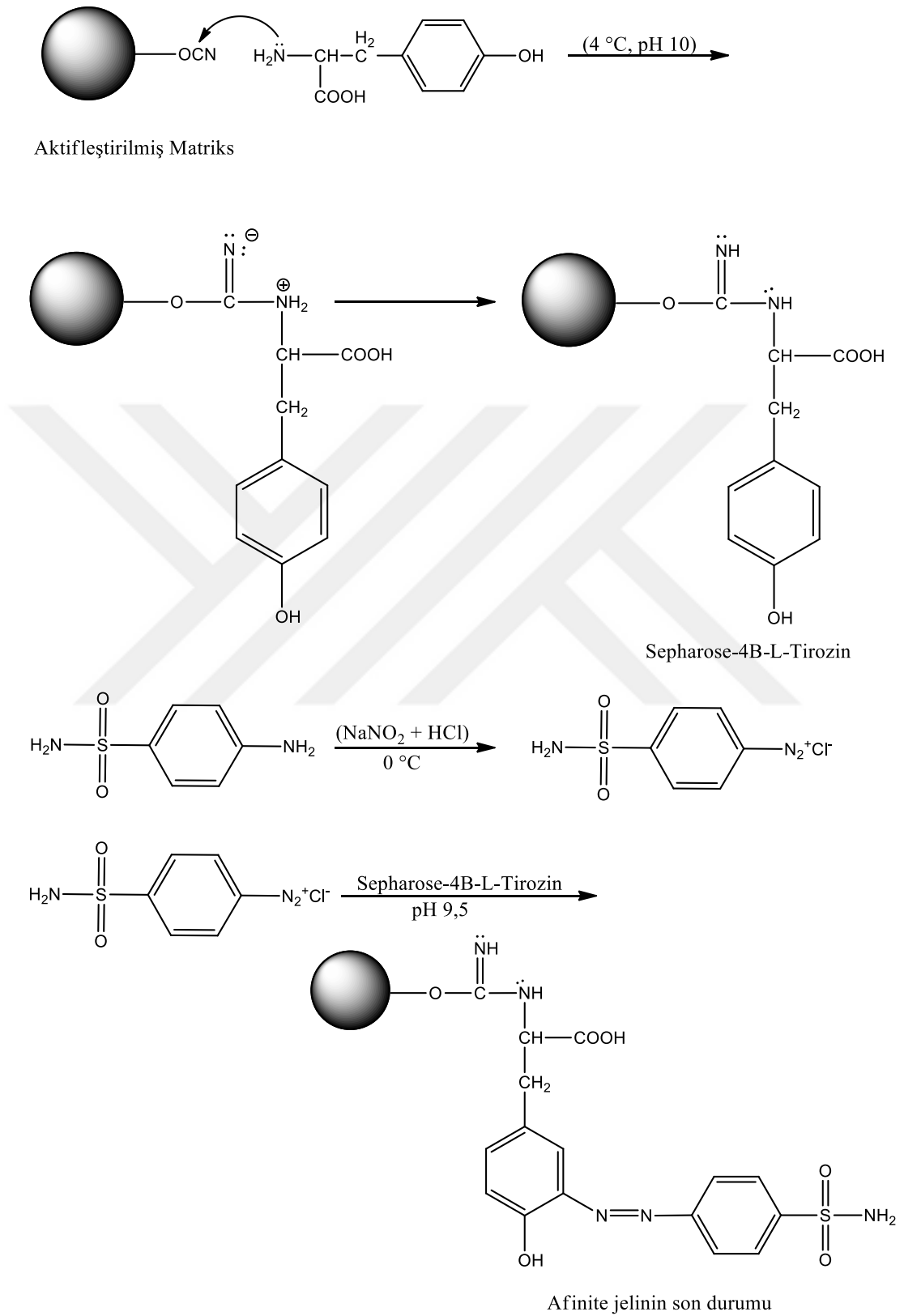
Afinite jelini sentezlemek için CNBr aktifleştirilmiş Sepharose[®]-4B üzerine tirozin kovalent olarak bağlandı. Sonrasında p-aminobenzensülfonamid diazonyum tuzu tirozine kenetlenme reaksiyonu ile bağlandı (Kohn ve Wilchek, 1978).

5.7.1. Jel matrigisine tirozin bağlanması

pH'ı 10 olan 20 mL NaHCO₃ tamponu içerisinde 80 mg tirozin çözüldü, üzerine 7,5 gr CNBr aktifleştirilmiş Sepharose[®]-4B ilave edildi ve aynı tamponla 250 mL ye tamamlandı. Daha sonra 4°C sıcaklıkta iki saat karıştırıldı ve aynı sıcaklıktaki buzdolabında 16 saat boyunca bekletildi. Bekleme süresi sonunda jel, yıkama suyu 280 nm de absorbans göstermeyinceye kadar bol suyla yıkandı. Yıkama aşaması 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (100 mL, pH 8,8) tekrar edildi ve tirozin bağlanmış jel bu çözeltinin 40 mL'sine alındı (Arslan vd., 1997; Laemmli, 1970).

5.7.2. p-aminobenzensülfonamid kenetlendirilmesi

25 mg p-aminobenzensülfonamid, yaklaşık 0 °C de 10 mL 1M HCl çözeltisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ içeren 0 °C de bulunan çözelti, p-aminobenzensülfonamid çözeltisine 10 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Diazolanmış olan p-aminobenzensülfonamid, 40 mL Sepharose[®]-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. 1M NaOH çözeltisi ile pH 9,5'a ayarlandı. Üç saat süreyle oda sıcaklığında yavaş bir şekilde karıştırıldı. Sonrasında 1L saf su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH 7,4) tamponu ile yıkandı. Aynı tampon içerisinde beklemeye bırakıldı (Cuatrecasas, 1970). Afinite jelinin sentezi Şekil 4.1 de özetlenmiştir.



Şekil 5.1. Afinite jelinin sentezi.

5.8. Eritrosit hCA I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması

5.8.1. Hemolizat hazırlanışı

Kan numuneleri, antikoagülanlı 10 mL'lik tüplere alındı ve 2500 rpm de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Sonrasında üst kısımda toplanan plazma ve lökosit katmanı dikkatlice ayrıldı ve altta bulunan eritrosit hücreleri %0,9'luk NaCl çözeltisi kullanılarak 3-4 kez yıkandı. Yıkama sonrası eritrositler, hacimlerinin 2 katı, buzlu saf su ile 30 dk. boyunca hemolizlendi. Sitozolün alınabilmesi amacıyla hemolizat 4 °C de 20000 rpm de 30 dk. santrifüjlendi. Ayrılan sitozolik sıvının pH'ı katı TRIS ile 8,7' ye ayarlandı (Rickli vd., 1964).

5.8.2. Hemolizatın afinite kolonuna yüklenmesi ve CA izoenzimlerinin elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1,5 cmx50 cm boyutlarındaki kolona paketlenildi ve 25mM TRIS-HCl/ 0,1 M NaSO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile dengelendi. Hemolizat kolona eklendi, yükleme tamamlandıktan sonra 25mM TRIS-HCl/25mM NaSO₄ (pH 8,7) çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemine 280 nm de absorban gözlenmeyinceye kadar devam edildi. Yıkama işlemi sonrasında hCA I ve hCAII izoenzimleri sırasıyla 25 mM Na₂HPO₄/1M NaCl (pH6,3) ve 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ (pH5,6) çözeltileri kullanılarak elüe edildi (Rickli vd., 1964). Elüatlarda kalitatif protein ölçümü ve CO₂ hidrataz aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi. Aktivitesi olan fraksiyonlar ayrılarak diyalizlendi.

5.8.3. Diyaliz işlemi

Deneyde kolondan elüe edilen hCA I ve II çözeltileri diyaliz torbalarına doldurularak 4 °C de diyaliz tamponu içerisinde 24 saat boyunca bırakıldı ve her 4 saatte bir tampon değiştirilerek diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonucunda elde edilen enzim çözeltisi *in vitro* inhibisyon çalışmalarında kullanılmak üzere 3er ml'lik tüplere alınarak -20 °C de depolanmıştır.

5.8.4. SDS-PAGE

Enzimlerin saflaştırılmasından sonra SDS-PAGE yapıldı (Laemmli, 1970). Ayırma jeli hazırlandı ve plakalar arasına ilave edildi, bu aşamada jelin hava almamasına özen gösterildi. Jel yüzeyinin pürüzsüz olması için %1'lik SDS ile ince bir tabaka yapıldı. Katılaşması için yaklaşık yarım saat süre ile bekletildi. Sonrasında yığılma jeli üst seviyeye kadar eklendi, üzerine tarak dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Bir saat sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankına yürütme tamponu dolduruldu. Her kuyuda 20 µg protein olacak şekilde numuneler yüklendi. 100 V da yaklaşık iki saat süreyle

akım geçirildi. Sonra jel üzerine boyama çözültüsü eklendi ve 2 saat süreyle boyama yapıldı. Boyama sonrası protein bantları belirgin oluncaya kadar renksizleştirme yapıldı. Bu işlemi takiben jelin görüntüsü alındı.

Ayrırma jeli; 3,0 mL 1M TRIS-HCl (pH 8,8), 3,0 mL %40'luk akrilamid-bisakrilamid, 0,1 mL %10'luk SDS, 0,006 mL TEMED ve 3,2 mL su karıştırılarak hazırlandı. Bu karışım üzerine en son olarak 0,1 mL %10'luk amonyum persülfat eklendi.

Yığıma jeli; 2,5 mL su, 0,4 mL 1M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,3 mL %40'luk akrilamid-bisakrilamid, 0,03 mL %10'luk SDS, 0,005 mL TEMED ve 0,03 mL %10'luk amonyum persülfat eklenerek hazırlandı.

5.9. İnhibitör Bileşiklerin hCA I ve II Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi

5.9.1. Hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyonun incelenmesi

Bölüm 4.6.1 de tarif edildiği şekilde inhibitörlü ortamda hidrataz aktivitesi ölçüldü. İnhibisyon etkisi gözlenen bileşikler için %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Çizelge ve şekillerde verilen [İnhibitör] değerleri, bu deneylerdeki aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir. (toplam hacim 4,2 mL).

5.9.2. Esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyonun incelenmesi

Bölüm 4.6.2 de tarif edildiği şekilde inhibitörlü ortamda esteraz aktivitesi ölçüldü. İnhibisyon etkisi gözlenen bileşikler için %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı. Çizelge ve şekillerde verilen [İnhibitör] değerleri, bu deneylerdeki aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir. (toplam hacim 3,0 mL) (Armstrong vd., 1966).

İnhibitörlü ortamdaki aktivite hesabı aşağıdaki gibidir:

$$p\text{-nitrofenol derişimi (M)} = \text{Absorbans} / 5 \times 10^{-3}$$

$$p\text{-nitrofenol derişimi (mM)} = \text{Absorbans} / 5 \text{ mM}$$

$$p\text{-nitrofenol miktarı} = (\text{Absorbans} / 5 \text{ mM}) / 3 \text{ dk} \times 3 \text{ mL} = \text{Absorbans} / 5 \text{ (}\mu\text{mol/dk)}$$

5.9.3. İnhibitör K_i değerlerinin belirlenmesi

K_i değerlerini belirlemek için beş farklı substrat konsantrasyonu ve her bir substrat konsantrasyonu için inhibitörsüz ve üç farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçüldü.

$$p\text{-nitrofenol miktarı} = \text{Absorbans}/5 \text{ (}\mu\text{mol/dk)}$$

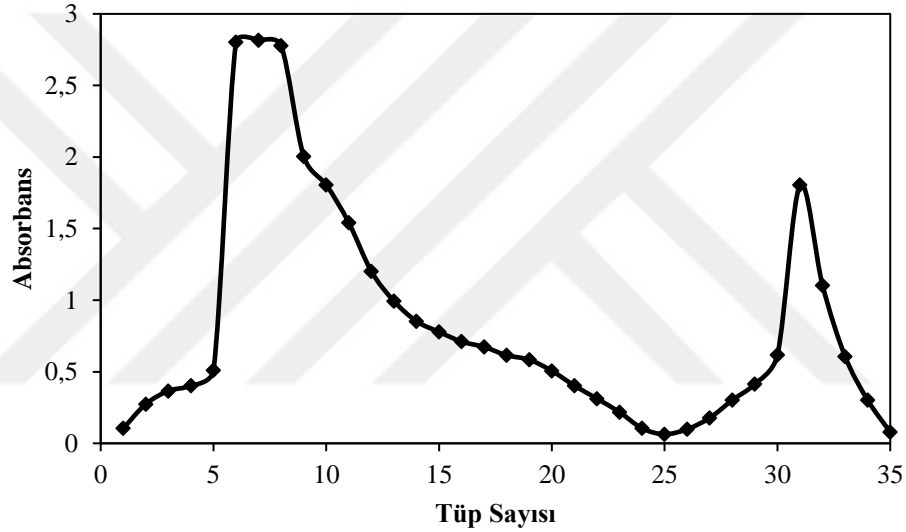
formülünden hesaplanan değer, V(hız) değeri olarak alındı, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi, K_m ve V_{\max} değerleri hesaplandı. Bu değerler yardımıyla aşağıdaki eşitlikten K_i değerleri hesaplandı.

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

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1. hCA I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasına İlişkin Sonuçlar

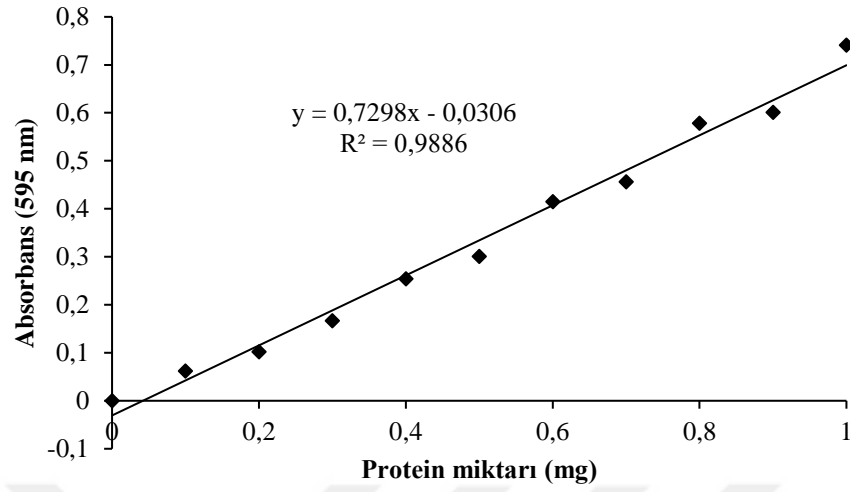
Hemolizat, afinite kolonunun dengelenmesini takiben kolona ilave edildi ve daha sonra kolon yıkandı. Bu işlemlerden sonra hCA I izoenzimi 0,025 M Na₂HPO₄/1 M NaCl (pH 6,3) tamponu ile, hCA II izoenzimi ise 0,1 M CH₃COONa/0,5 M NaClO₄ pH (5,6) tamponu ile elüe edildi ve 280 nm de kalitatif protein tayini yapıldı (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. hCA I ve hCAII izoenzimlerinin afinite kolonundan saflaştırılması (1-25: hCA I, 26-35: hCA II).

Elde edilen enzim çözeltilerinden absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesi tayini ve esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Bradford yöntemiyle kantitatif protein miktarı ölçümü yapıldı.

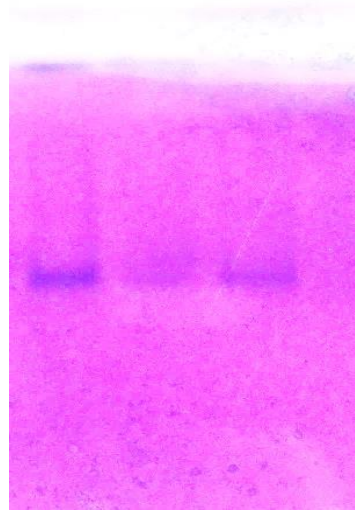
Bradford yöntemiyle yapılan kantitatif protein belirlemede bir standart eğri hazırlandı ve sonrasında hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarları bu eğriye göre belirlendi (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. Bradford metoduna göre protein kalibrasyon grafiği.

6.2. SDS-PAGE Sonuçları

hCA I ve II izoenzimlerinin saflığının kontrolü SDS-PAGE ile yapıldı. Belirgin duruma gelen protein bantlarının görüntüsü alındı (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. SDS-PAGE sonuçları (Soldan sağa sırasıyla; standart hCA I (29 kDa), saflaştırılan hCA II, saflaştırılan hCAI).

6.3. *In vitro* İnhibisyon Sonuçları

6.3.1. Hidrataz aktivitesi inhibisyonu

Bölüm 5.6.1 de tarif edildiği şekilde inhibitörlü ortamda hidrataz aktivitesi ölçüldü Bu ölçümler için inhibitörler klinikte lokal olarak kullanılan %1 lik konsantrasyonda hazırlandı. İnhibisyon etkisi gözlenen bileşikler için %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Ölçümler sonucunda bileşiklerin (1-16) hCA I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitelerini inhibe etmedikleri tespit edildi.

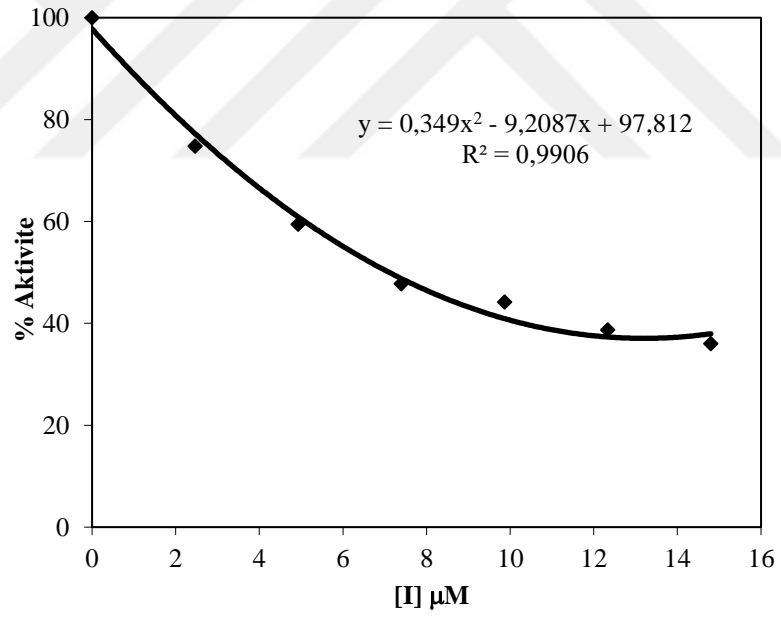
6.3.2. Esteraz aktivitesi inhibisyonu

Bölüm 5.6.2 de tarif edildiği şekilde inhibitörlü ortamda esteraz aktivitesi ölçüldü Bu ölçümler için inhibitörler klinikte lokal olarak kullanılan %1 lik konsantrasyonda hazırlandı. İnhibisyon etkisi gözlenen bileşikler için %Aktivite-[İnhibitör] grafikleri çizildi ve IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Ölçümler sonucunda 2-6 bileşiklerinin hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitelerini inhibe etmedikleri, diğer bileşiklerin inhibisyon etkisi gösterdikleri tespit edildi.

Çizelge 6.1. 1 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

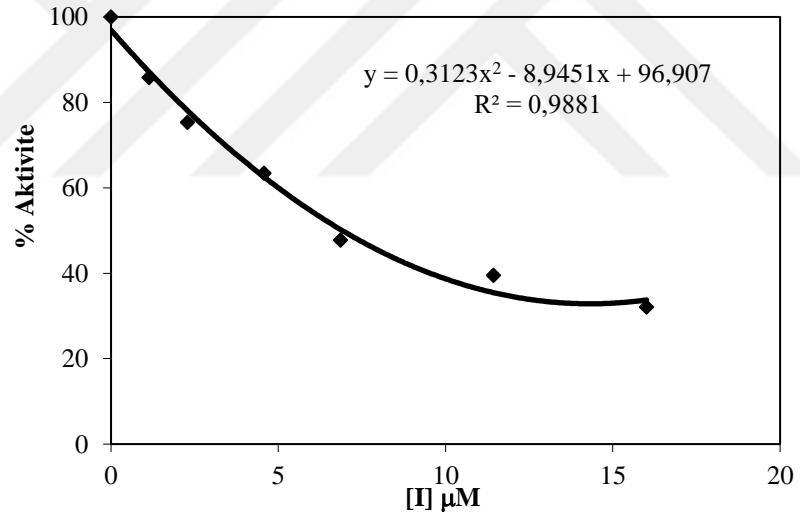
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
1	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	74,78	2,47
				20	580	59,50	4,93
				30	570	47,75	7,40
				40	560	44,14	9,87
				50	550	38,74	12,33
				60	540	36,04	14,80



Şekil 6.4. 1 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.2. 7 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

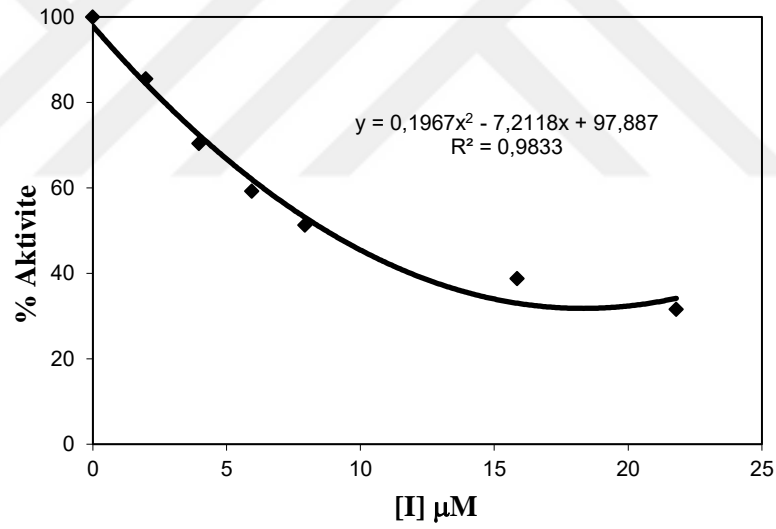
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
7	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	85,82	1,14
				10	590	75,37	2,29
				20	580	63,43	4,57
				30	570	47,76	6,86
				50	550	39,55	11,44
				70	530	32,90	16,01



Şekil 6.5. 7 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.3. 8 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

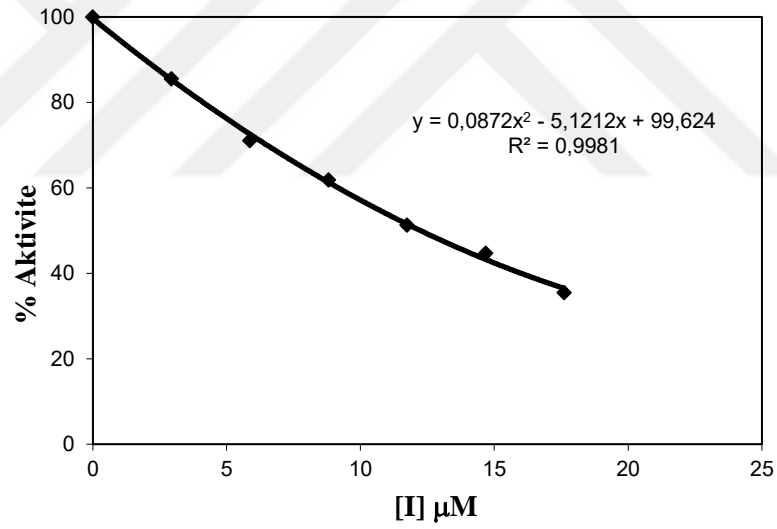
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
8	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	85,53	1,98
				20	580	70,39	3,96
				30	570	59,21	5,95
				40	560	51,32	7,93
				80	520	38,82	15,86
				110	490	31,58	21,80



Şekil 6.6. 8 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.4. 9 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

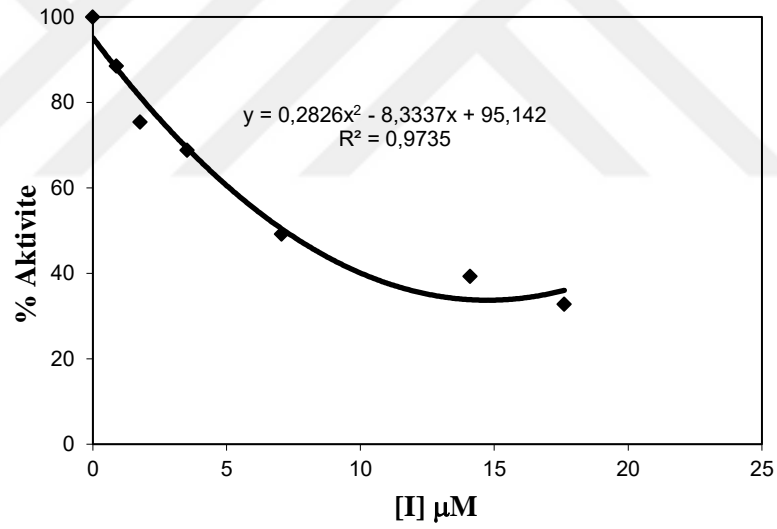
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
9	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	85,53	2,94
				20	580	71,05	5,87
				30	570	61,84	8,81
				40	560	51,32	11,75
				50	550	44,74	14,68
				60	540	35,53	17,62



Şekil 6.7. 9 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.5. 10 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

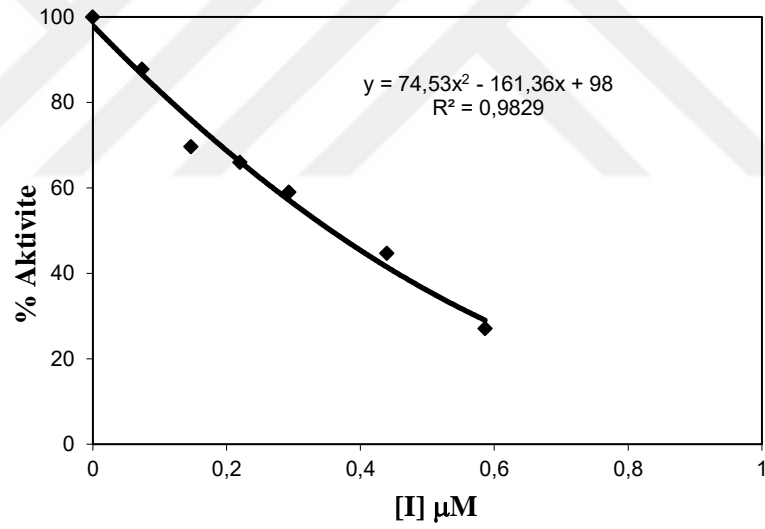
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
10	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	88,52	0,88
				10	590	75,41	1,76
				20	580	68,85	3,52
				40	560	49,18	7,05
				80	520	39,34	14,09
				100	500	32,79	17,62



Şekil 6.8. 10 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.6. 11 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

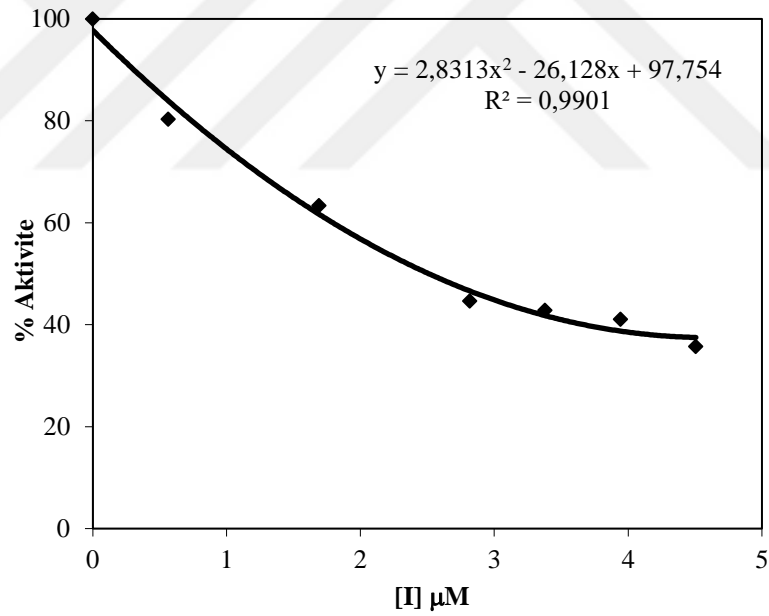
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
11	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	87,77	0,07
				10	590	69,68	0,15
				15	585	65,96	0,22
				20	580	59,04	0,29
				30	570	44,68	0,44
				40	560	27,13	0,59



Şekil 6.9. 11 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.7. 12 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

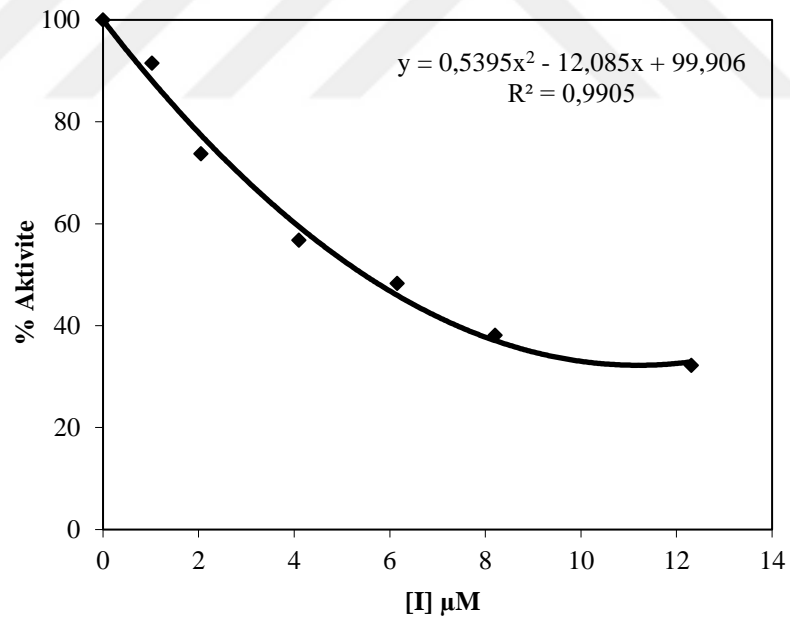
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
12	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	80,36	0,56
				30	570	63,39	1,69
				50	550	44,64	2,82
				60	540	42,86	3,38
				70	530	41,07	3,94
				80	520	35,71	4,51



Şekil 6.10. 12 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.8. 13 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

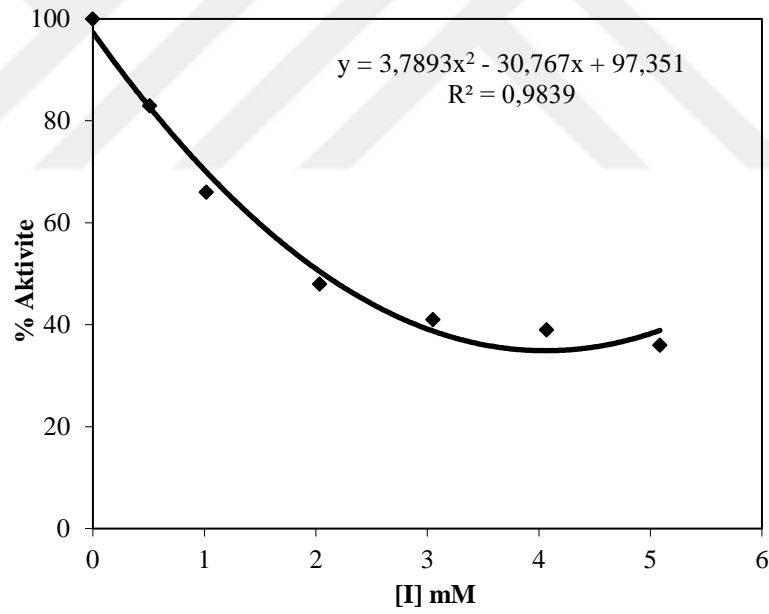
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
13	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	91,53	1,03
				10	590	73,73	2,05
				20	580	56,78	4,10
				30	570	48,31	6,16
				40	560	38,14	8,21
				60	540	32,20	12,31



Şekil 6.11. 13 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.9. 14 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

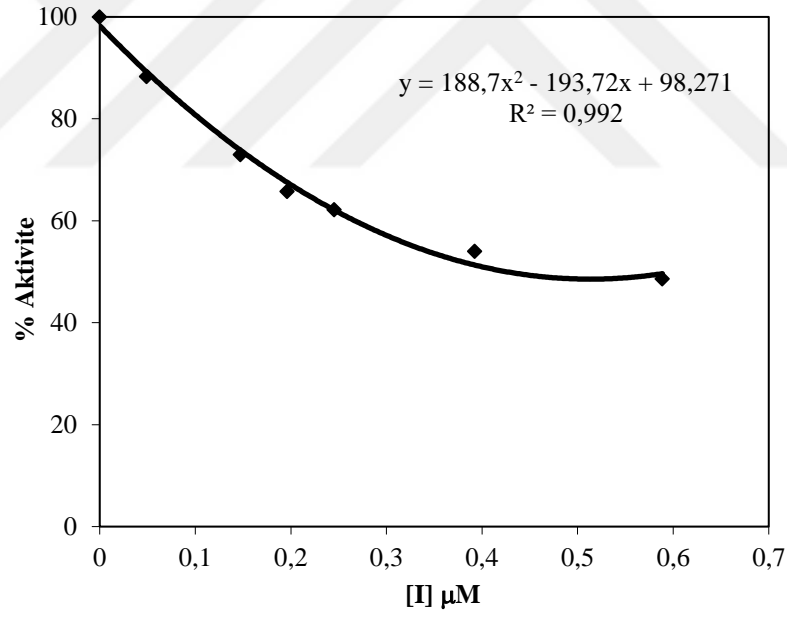
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
14	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	83,00	0,51
				10	590	66,00	1,02
				20	580	48,00	2,03
				30	570	41,00	3,05
				40	560	39,00	4,07
				50	550	36,00	5,09



Şekil 6.12. 14 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.10. 15 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

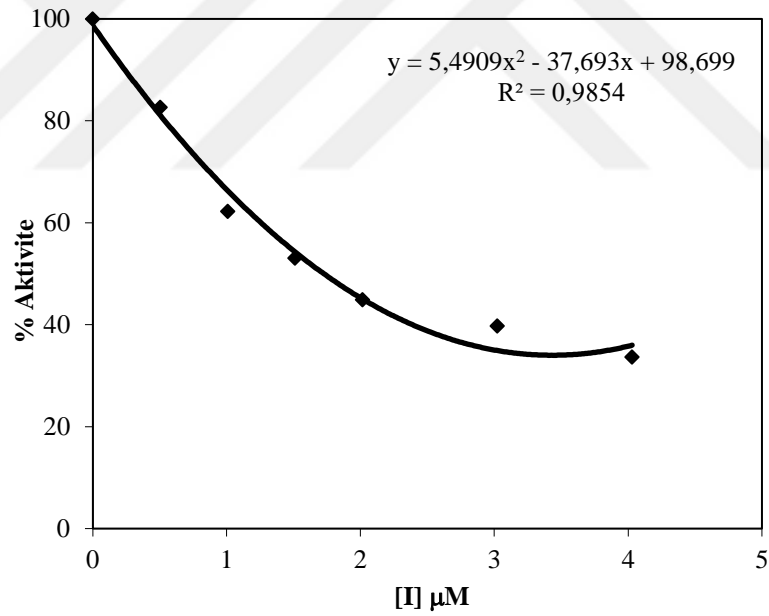
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
15	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	88,29	0,05
				30	570	72,97	0,15
				40	560	65,77	0,20
				50	550	62,16	0,25
				80	520	54,05	0,39
				120	480	48,65	0,59



Şekil 6.13. 15 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.11. 16 bileşiğinin hCA I esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

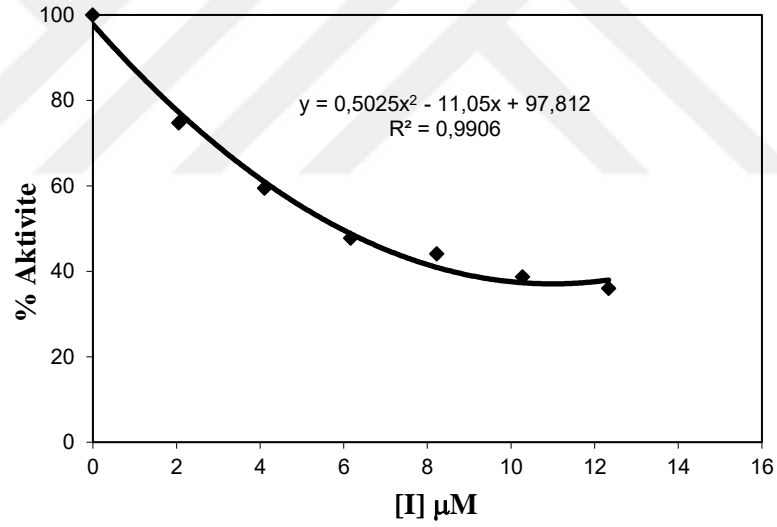
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
16	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	82,65	0,50
				10	590	62,25	1,01
				15	585	53,06	1,51
				20	580	44,90	2,02
				30	570	39,80	3,02
				40	560	33,67	4,03



Şekil 6.14. 16 bileşiğinin ilavesi ile hCA I esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.12. 1 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

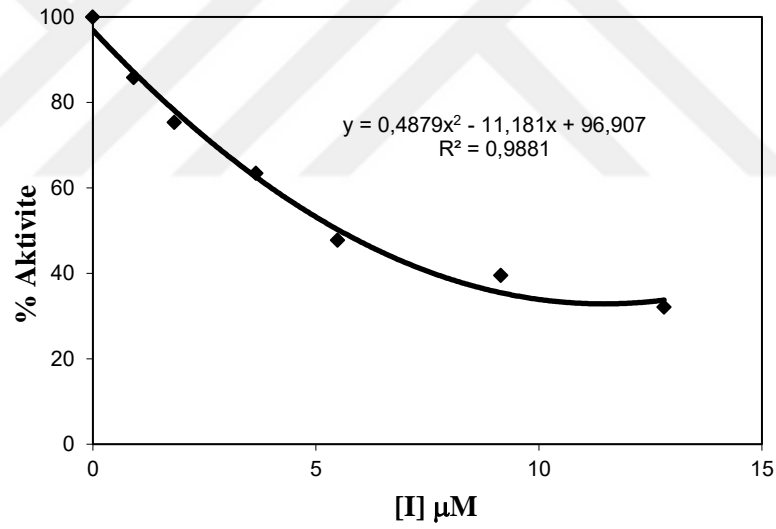
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
1	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	74,78	2,06
				20	580	59,50	4,11
				30	570	47,75	6,17
				40	560	44,14	8,22
				50	550	38,74	10,28
				60	540	36,04	12,33



Şekil 6.15. 1 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.13. 7 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

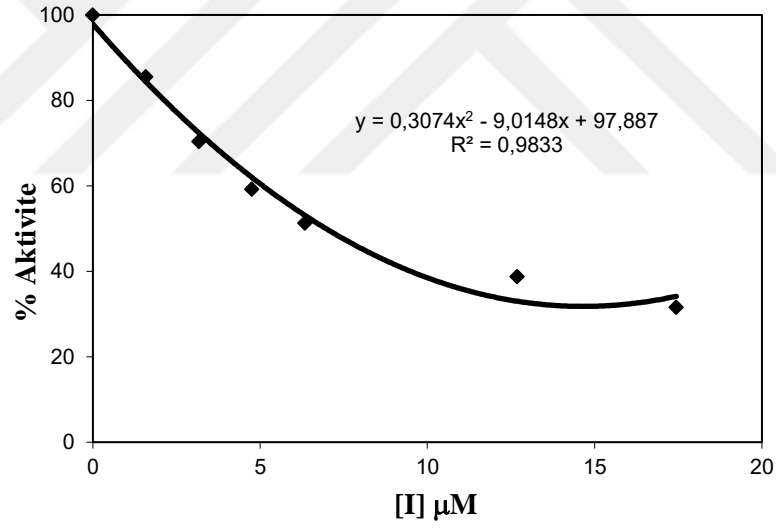
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
7	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	85,82	0,92
				10	590	75,37	1,83
				20	580	63,43	3,66
				30	570	47,76	5,49
				50	550	39,55	9,15
				70	530	32,90	12,81



Şekil 6.16. 7 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.14. 8 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

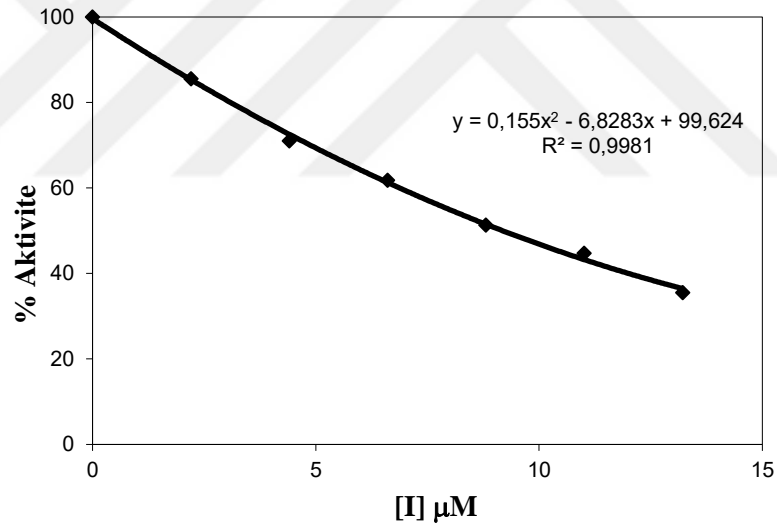
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
8	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	85,53	1,59
				20	580	70,39	3,17
				30	570	59,21	4,76
				40	560	51,32	6,34
				80	520	38,82	12,68
				110	490	31,58	17,44



Şekil 6.17. 8 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.15. 9 bileşiğinin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

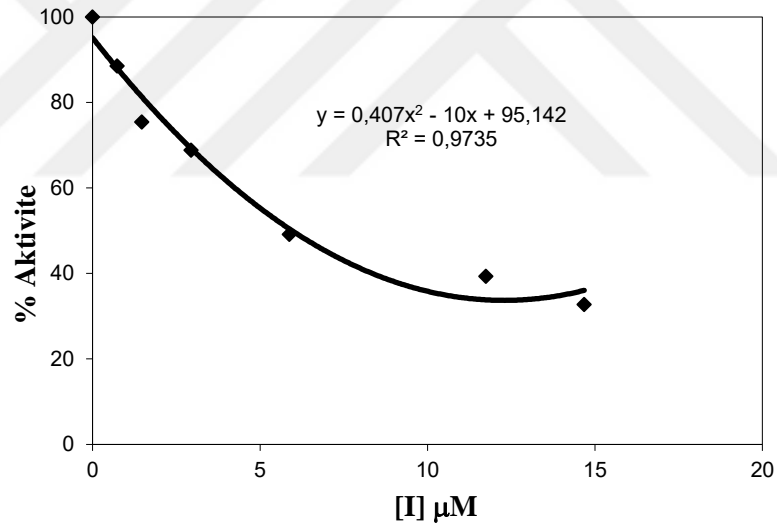
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
9	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	85,53	2,20
				20	580	71,05	4,41
				30	570	61,84	6,61
				40	560	51,32	8,81
				50	550	44,74	11,01
				60	540	35,53	13,21



Şekil 6.18. 9 bileşiğinin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.16. 10 bileşiminin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

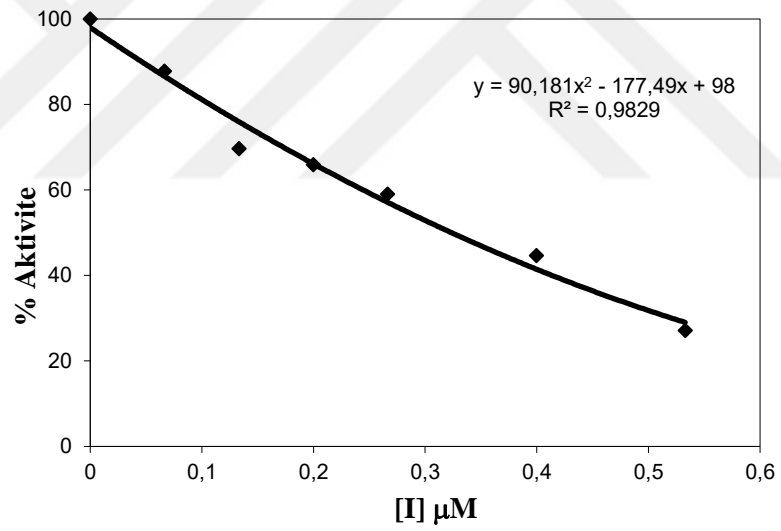
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
10	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	88,52	0,73
				10	590	75,41	1,47
				20	580	68,85	2,94
				40	560	49,18	5,87
				80	520	39,34	11,75
				100	500	32,79	14,68



Şekil 6.19. 10 bileşiminin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.17. 11 bileşiminin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

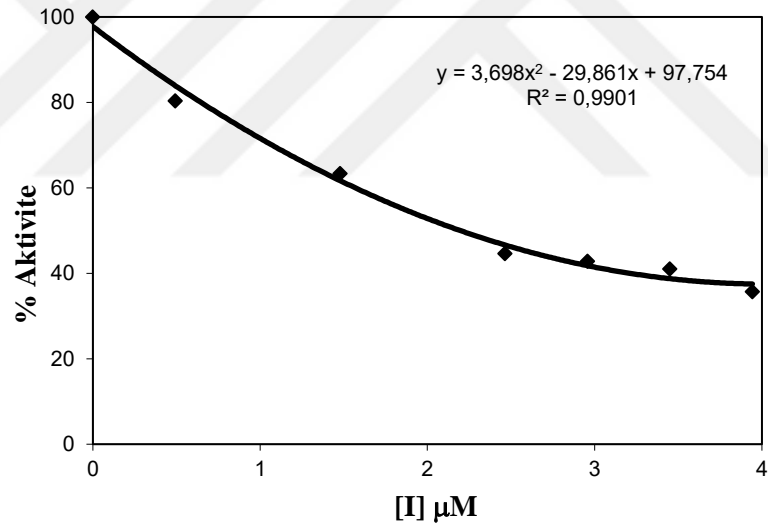
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
11	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	87,77	0,07
				10	590	69,68	0,13
				15	585	65,96	0,20
				20	580	59,04	0,27
				30	570	44,68	0,40
				40	560	27,13	0,53



Şekil 6.20. 11 bileşiminin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.18. 12 bileşiminin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

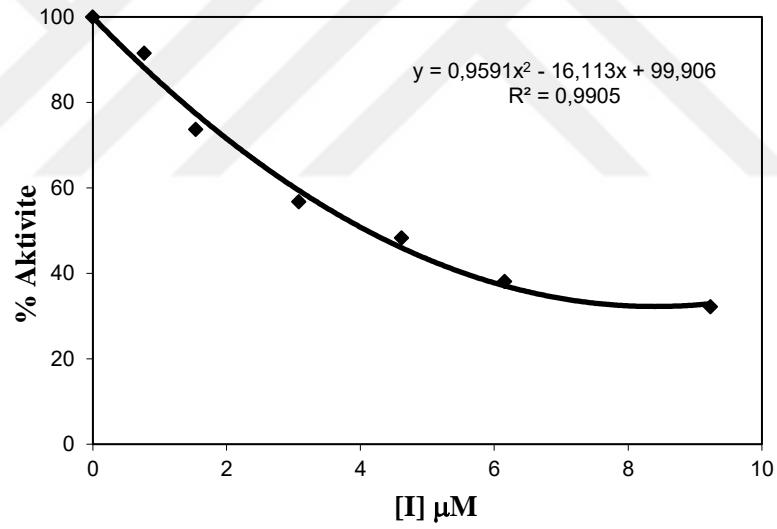
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
12	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	80,36	0,49
				30	570	63,39	1,48
				50	550	44,64	2,46
				60	540	42,86	2,96
				70	530	41,07	3,45
				80	520	35,71	3,94



Şekil 6.21. 12 bileşiminin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.19. 13 bileşiminin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

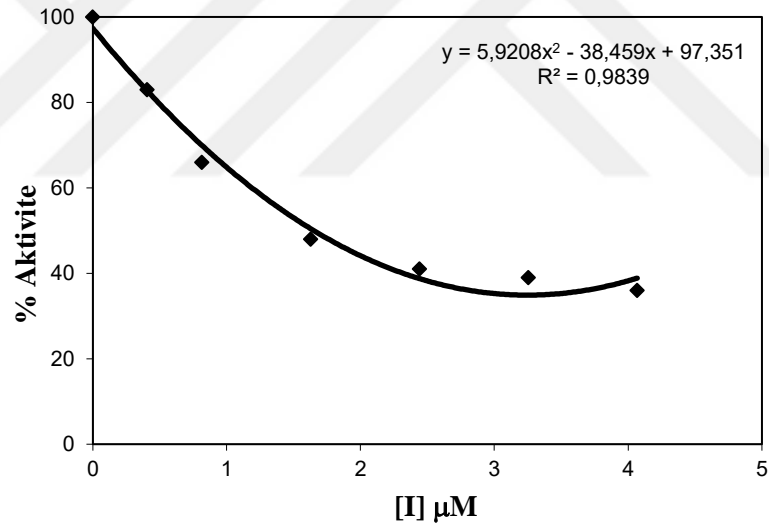
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
13	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	91,53	0,77
				10	590	73,73	1,53
				20	580	56,78	3,08
				30	570	48,31	4,62
				40	560	38,14	6,16
				60	540	32,20	9,23



Şekil 6.22. 13 bileşiminin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.20. 14 bileşiminin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

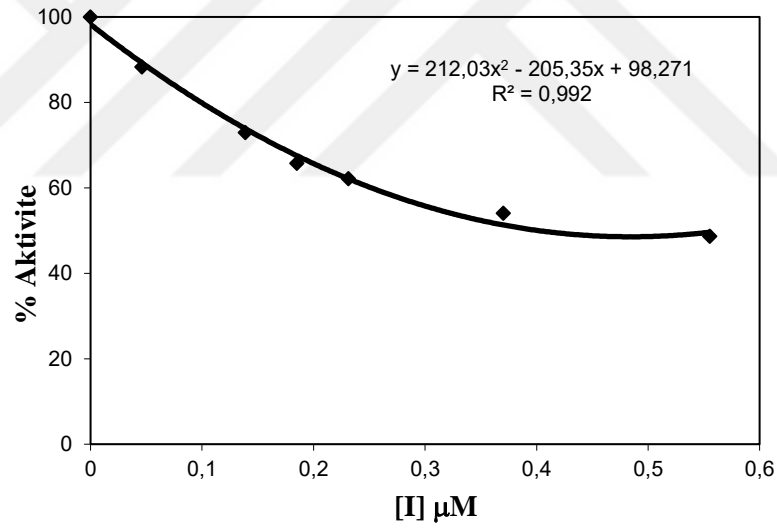
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
14	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	83,00	0,41
				10	590	66,00	0,81
				20	580	48,00	1,63
				30	570	41,00	2,44
				40	560	39,00	3,25
				50	550	36,00	4,07



Şekil 6.23. 14 bileşiminin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.21. 15 bileşiminin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

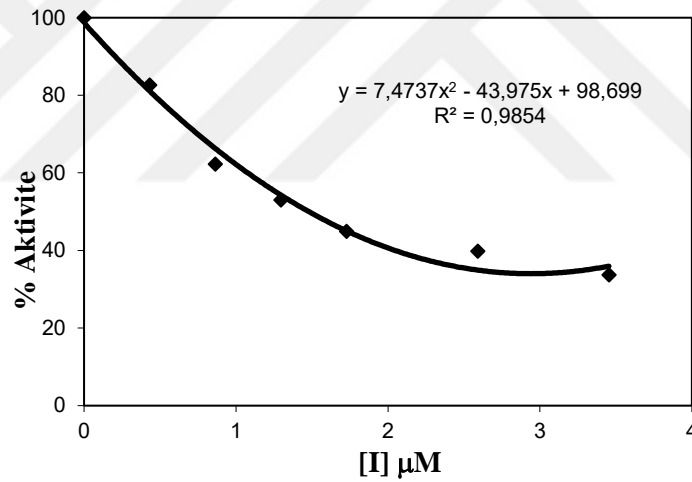
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
15	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				10	590	88,29	0,04
				30	570	72,97	0,14
				40	560	65,77	0,19
				50	550	62,16	0,23
				80	520	54,05	0,37
				120	480	48,65	0,55



Şekil 6.24. 15 bileşiminin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

Çizelge 6.22. 16 bileşimin hCA II esteraz aktivitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar.

Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	% Aktivite	[I] (μM)
16	1000	1300	100	-	600	100,00	0,00
				5	595	82,65	0,43
				10	590	62,25	0,86
				15	585	53,06	1,30
				20	580	44,90	1,73
				30	570	39,80	2,59
				40	560	33,67	3,45



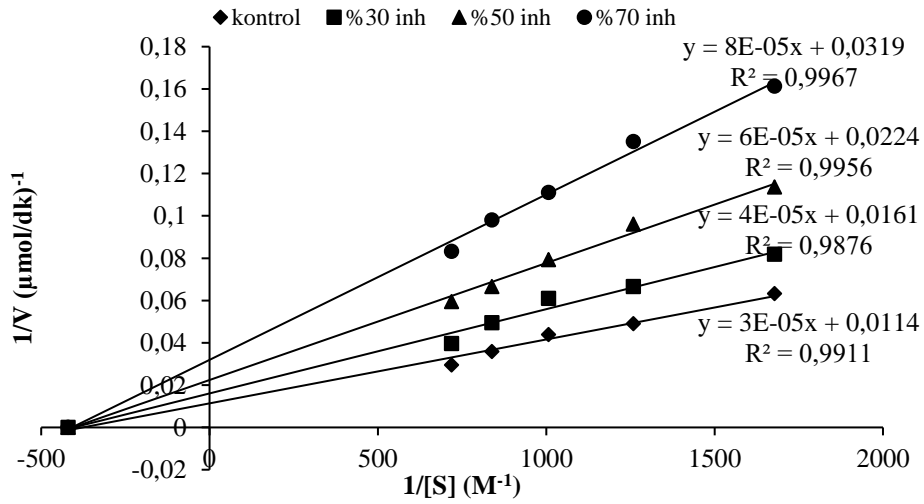
Şekil 6.25. 16 bileşimin ilavesi ile hCA II esteraz aktivitesindeki değişim.

6.3.3. İnhibitör bileşiklerin esteraz K_i sabitlerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Bölüm 4.9.3 de anlatıldığı şekilde inhibitörlü ortamda K_i sabitleri belirlendi. Bu ölçümler için inhibitörler klinikte lokal olarak kullanılan %1 lik konsantrasyonda hazırlandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı. K_i çizelgeleri ve elde edilen grafikler aşağıda belirtilmiştir.

Çizelge 6.23. 1 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

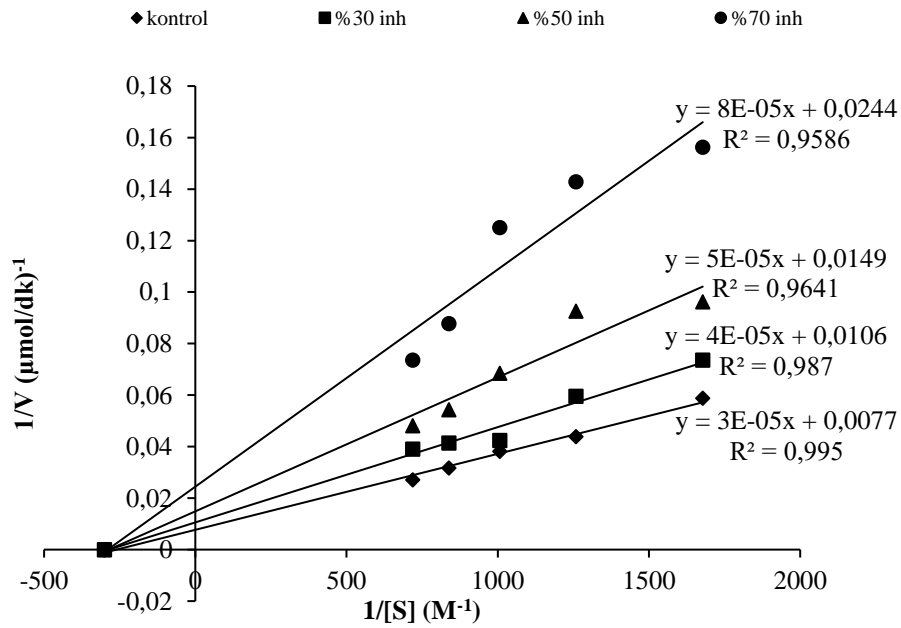
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
1	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,063
				10	990		0,082
				30	970		0,114
				60	940		0,161
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,049
				10	790		0,067
				30	770		0,096
				60	740		0,135
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,044
				10	590		0,061
				30	570		0,079
				60	540		0,111
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,036
				10	390		0,050
				30	370		0,067
				60	340		0,098
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,030
				10	190		0,040
				30	170		0,060
				60	140		0,083



Şekil 6.26. 1 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.24. 7 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

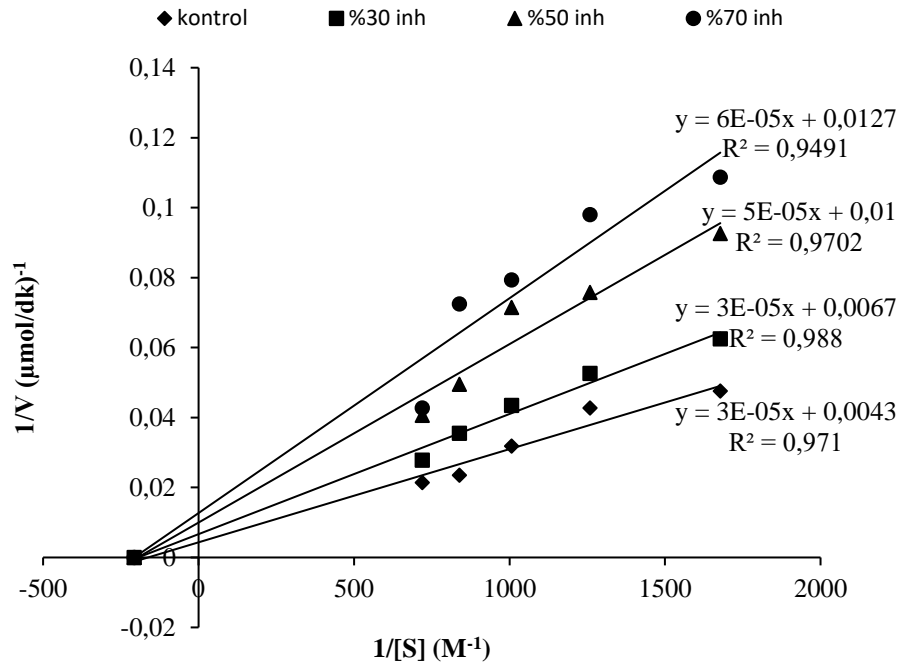
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
7	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,058
				5	995		0,074
				15	985		0,096
				35	965		0,156
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,044
				5	895		0,060
				15	885		0,093
				35	865		0,143
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,038
				5	595		0,042
				15	585		0,068
				35	565		0,125
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,032
				5	395		0,041
				15	385		0,054
				35	365		0,088
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,027
				5	195		0,039
				15	185		0,048
				35	165		0,074



Şekil 6.27. 7 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.25. 8 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

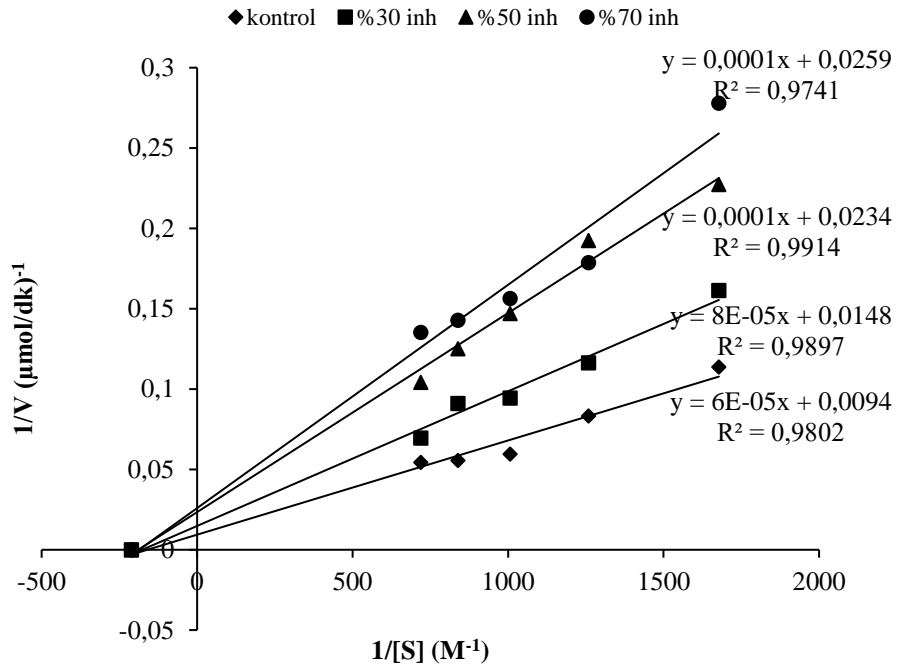
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
8	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,048
				8	992		0,063
				20	980		0,093
				55	945		0,109
	800			-	800	1,26x10 ³	0,043
				8	792		0,053
				20	780		0,076
				55	745		0,098
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,032
				8	592		0,043
				20	580		0,071
				55	545		0,079
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,023
				8	392		0,035
				20	380		0,050
				55	345		0,073
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,021
				8	192		0,028
				20	180		0,041
				55	145		0,043



Şekil 6.28. 8 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.26. 9 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

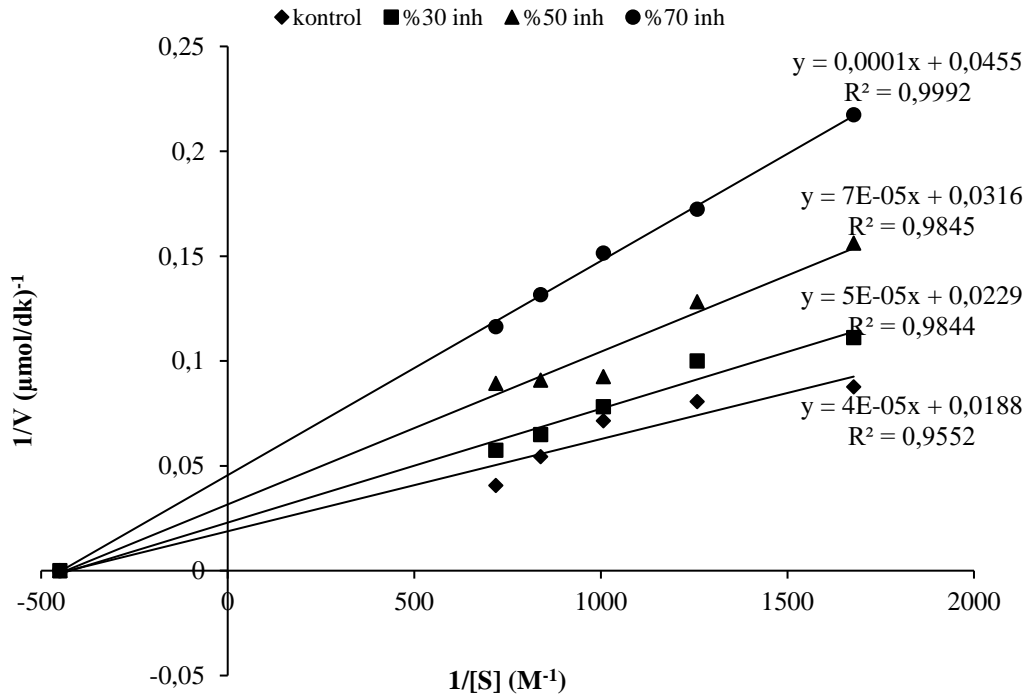
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
9	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,114
				10	990		0,161
				30	970		0,227
				50	950		0,278
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,083
				10	790		0,116
				30	770		0,192
				50	750		0,179
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,060
				10	590		0,094
				30	570		0,147
				50	550		0,156
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,056
				10	390		0,091
				30	370		0,125
				50	350		0,143
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,054
				10	190		0,069
				30	170		0,104
				50	150		0,135



Şekil 6.29. 9 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.27. 10 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

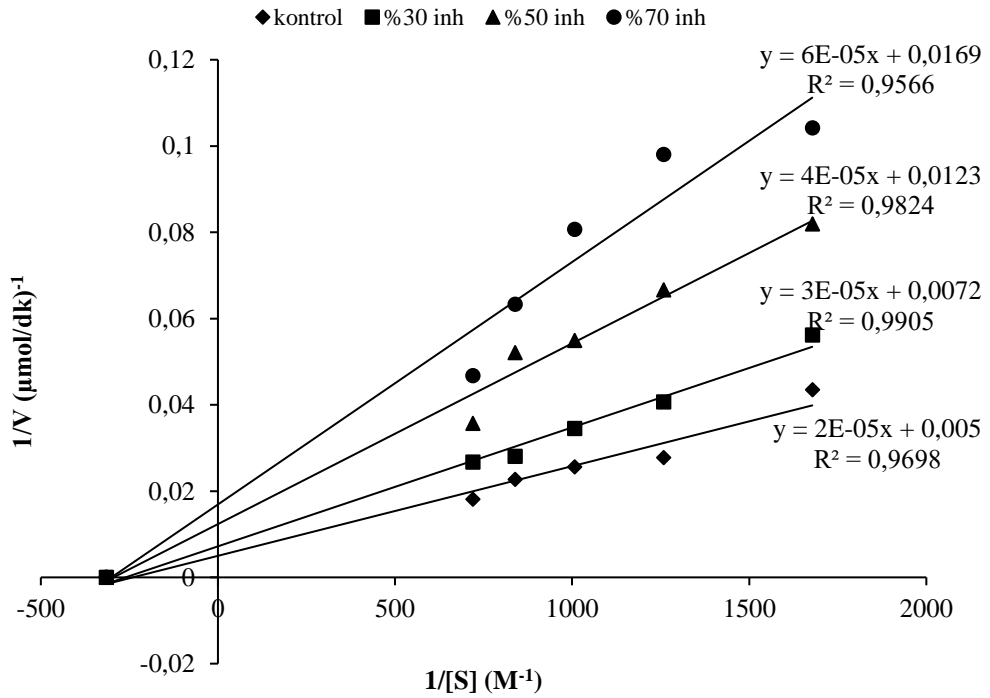
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
10	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,087
				10	990		0,111
				40	960		0,156
				100	900		0,217
	800			-	800	1,26x10 ³	0,081
				10	790		0,100
				40	760		0,128
				100	700		0,172
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,071
				10	590		0,078
				40	560		0,093
				100	500		0,152
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,054
				10	390		0,065
				40	360		0,091
				100	300		0,132
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,041
				10	190		0,057
				40	160		0,089
				100	100		0,116



Şekil 6.30. 10 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.28. 11 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

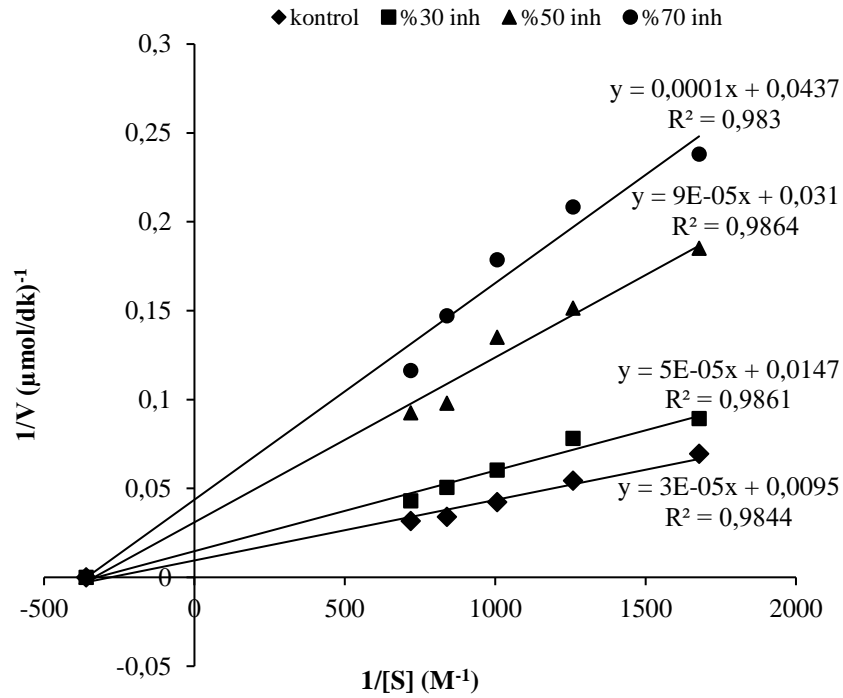
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
11	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,043
				20	980		0,056
				60	940		0,081
				80	920		0,104
	800			-	800	1,26x10 ³	0,028
				20	780		0,041
				60	740		0,067
				80	720		0,098
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,026
				20	580		0,035
				60	540		0,055
				80	520		0,081
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,023
				20	380		0,028
				60	340		0,052
				80	320		0,063
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,018
				20	180		0,027
				60	140		0,036
				80	120		0,047



Şekil 6.31. 11 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.29. 12 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

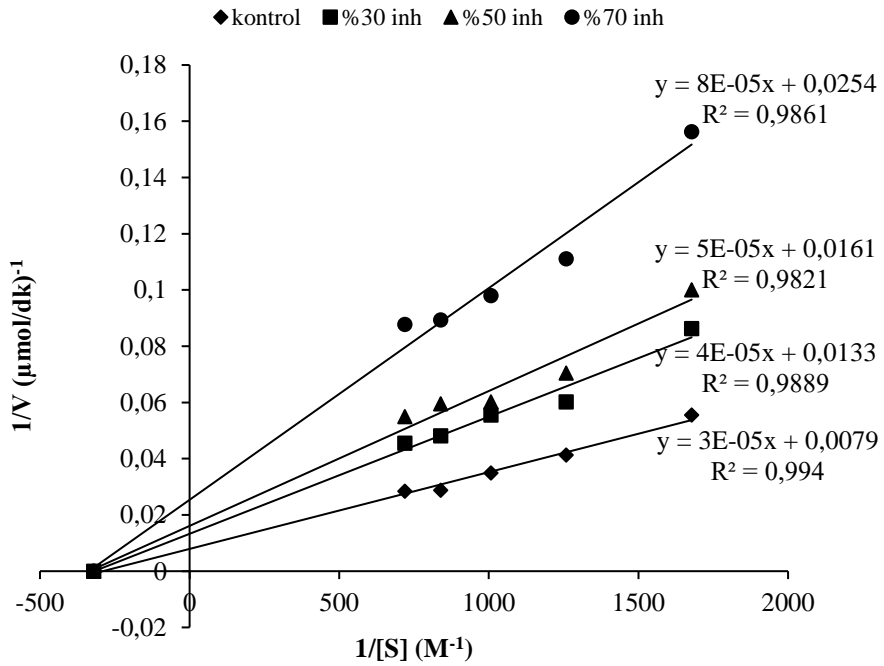
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
12	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,069
				20	980		0,089
				105	895		0,185
				175	825		0,238
	800			-	800	1,26x10 ³	0,054
				20	780		0,078
				105	695		0,152
				175	625		0,208
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,042
				20	580		0,060
				105	495		0,135
				175	425		0,179
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,034
				20	380		0,051
				105	295		0,098
				175	225		0,147
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,032
				20	180		0,043
				105	95		0,093
				175	25		0,116



Şekil 6.32. 12 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.30. 13 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

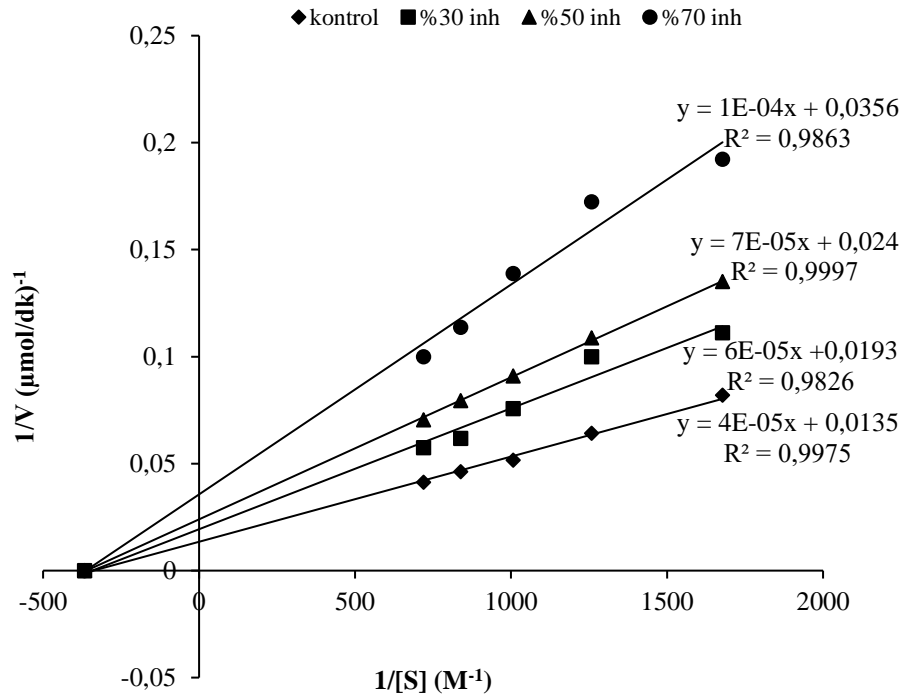
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M^{-1})	1/Hız ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
13	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,055
				10	990		0,086
				20	980		0,100
				60	940		0,156
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,041
				10	790		0,060
				20	780		0,111
				60	740		0,035
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,055
				10	590		0,060
				20	580		0,098
				60	540		0,029
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,028
				10	390		0,048
				20	380		0,060
				60	340		0,089
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,028
				10	190		0,045
				20	180		0,055
				60	140		0,088



Şekil 6.33. 13 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.31. 14 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

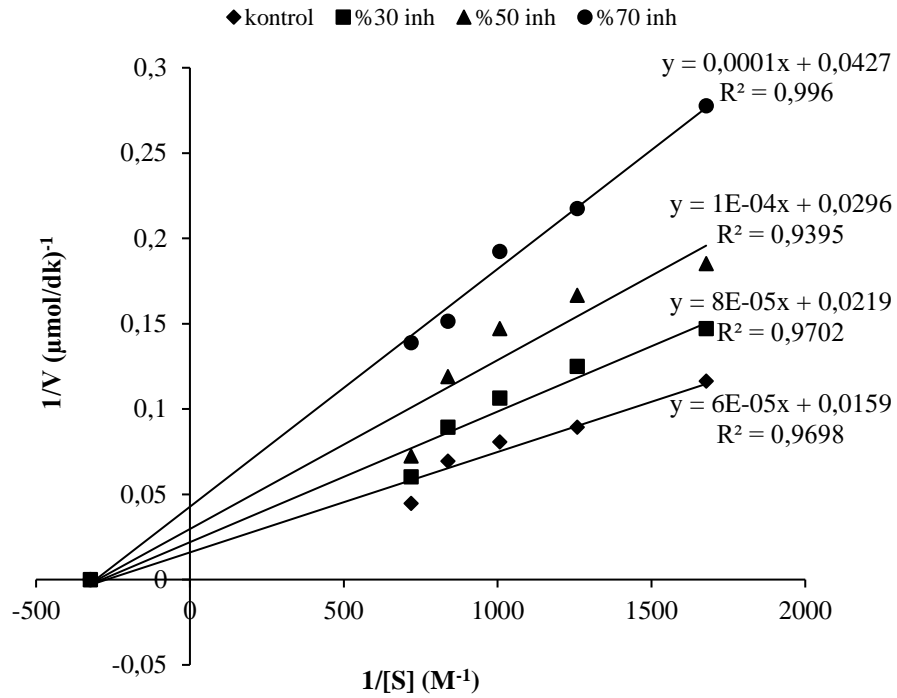
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M^{-1})	1/Hız ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
14	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,082
				10	990		0,111
				40	960		0,135
				50	950		0,192
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,064
				10	790		0,100
				40	760		0,109
				50	750		0,172
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,052
				10	590		0,076
				40	560		0,091
				50	550		0,139
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,046
				10	390		0,062
				40	360		0,079
				50	350		0,114
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,041
				10	190		0,057
				40	160		0,070
				50	150		0,100



Şekil 6.34. 14 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.32. 16 bileşiğinin hCA I esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

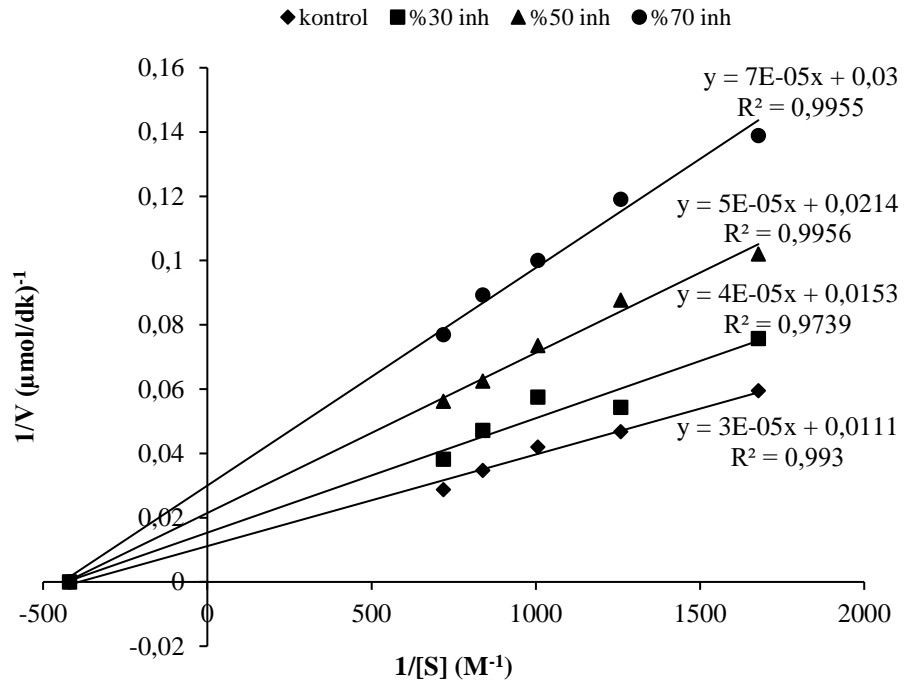
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA I (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
16	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,116
				10	990		0,147
				20	980		0,185
				40	960		0,278
	800			-	800	1,26x10 ³	0,089
				10	790		0,125
				20	780		0,167
				40	760		0,217
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,081
				10	590		0,106
				20	580		0,147
				40	560		0,192
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,069
				10	390		0,089
				20	380		0,119
				40	360		0,152
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,045
				10	190		0,060
				20	180		0,072
				40	160		0,139



Şekil 6.35. 16 bileşiği için hCA I esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.33. 1 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

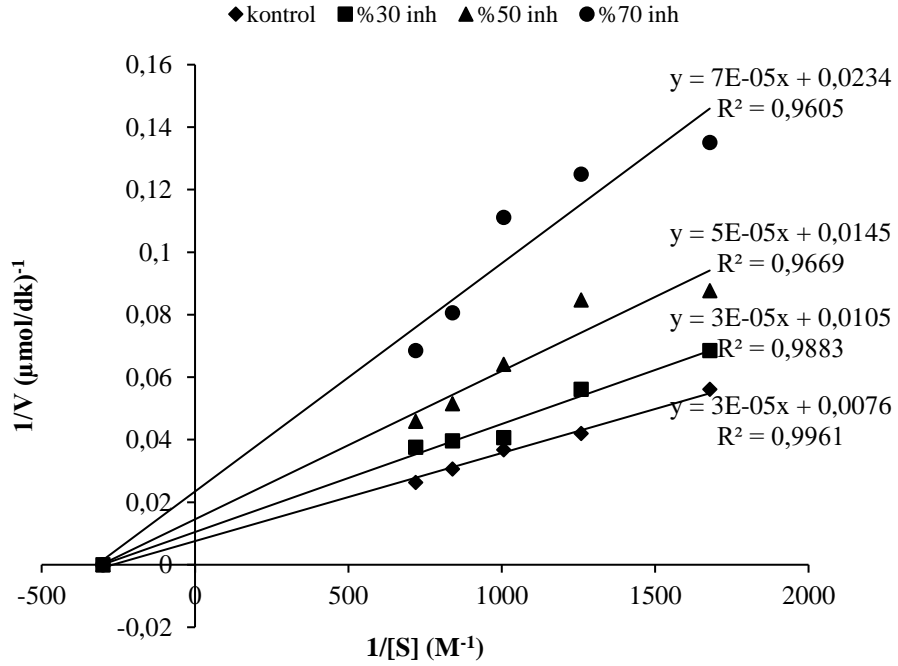
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
1	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,060
				5	995		0,076
				15	985		0,102
				30	970		0,139
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,047
				5	795		0,054
				15	785		0,088
				30	770		0,119
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,042
				5	595		0,057
				15	585		0,074
				30	570		0,100
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,035
				5	395		0,047
				15	385		0,063
				30	370		0,089
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,029
				5	195		0,038
				15	185		0,056
				30	170		0,077



Şekil 6.36. 1 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.34. 7 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

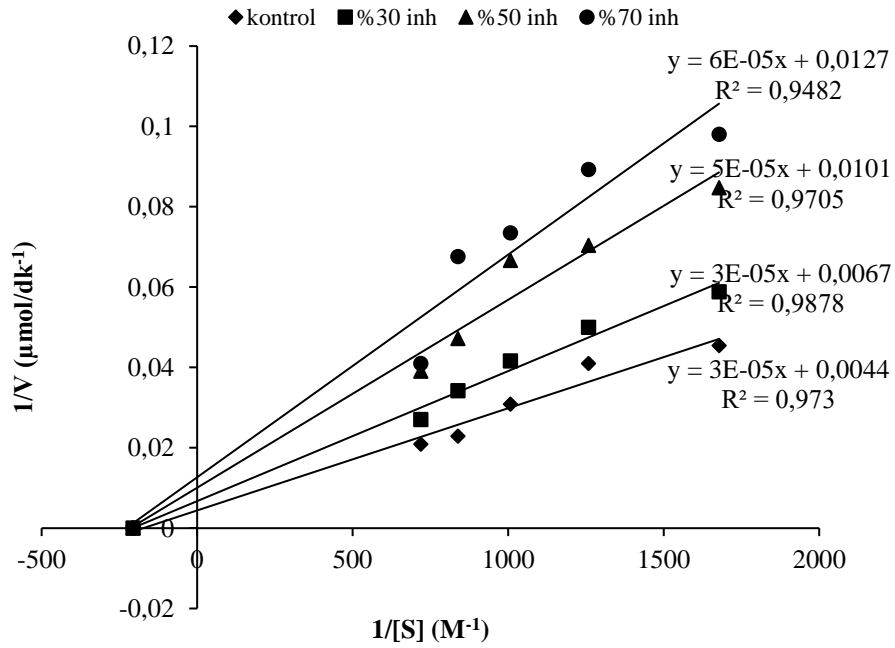
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
7	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,056
				3	997		0,068
				8	992		0,088
				18	982		0,135
	800			-	800	1,26x10 ³	0,042
				3	797		0,056
				8	792		0,084
				18	782		0,125
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,037
				3	597		0,041
				8	592		0,064
				18	582		0,111
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,031
				3	397		0,040
				8	392		0,052
				18	382		0,081
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,026
				3	197		0,038
				8	192		0,046
				18	182		0,068



Şekil 6.37. 7 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.35. 8 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

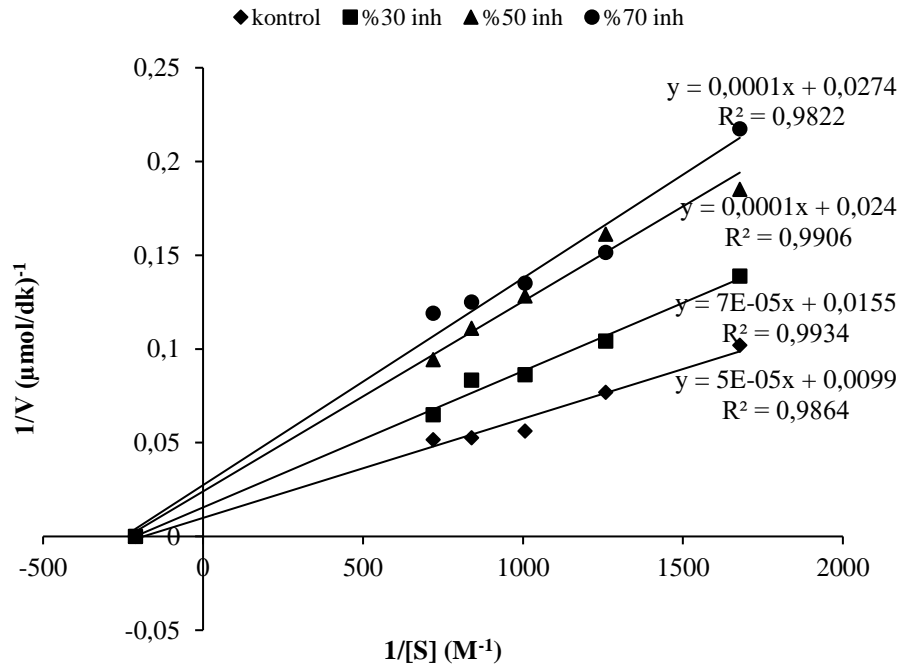
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
8	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,045
				5	995		0,059
				12	988		0,084
				30	970		0,098
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,041
				5	795		0,050
				12	788		0,070
				30	770		0,089
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,031
				5	595		0,042
				12	588		0,067
				30	570		0,074
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,023
				5	395		0,034
				12	388		0,047
				30	370		0,068
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,021
				5	195		0,027
				12	188		0,039
				30	170		0,041



Şekil 6.38. 8 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.36. 9 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

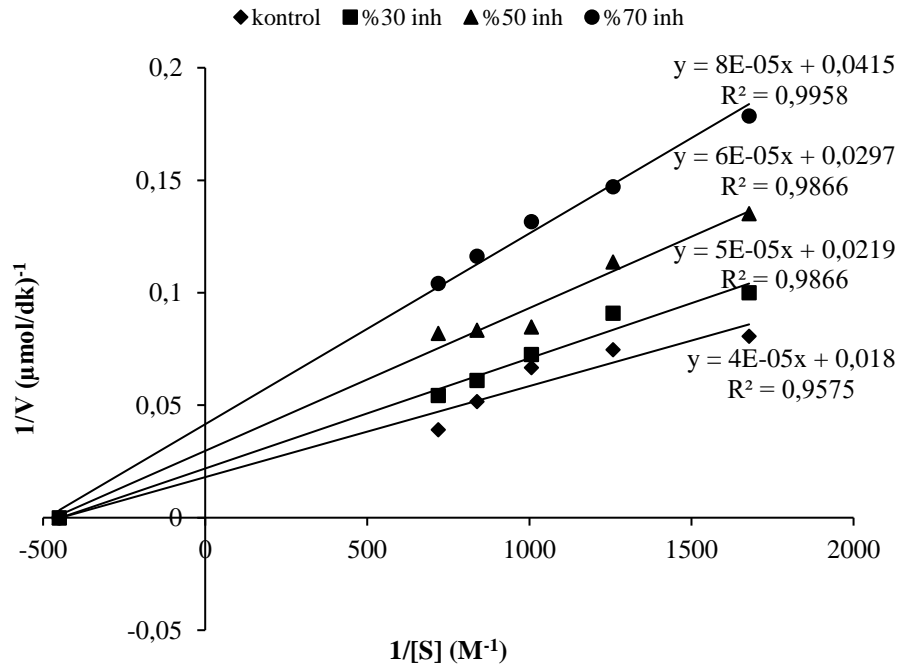
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
9	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,102
				6	994		0,139
				15	985		0,185
				25	975		0,217
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,077
				6	794		0,104
				15	785		0,161
				25	775		0,152
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,056
				6	594		0,086
				15	585		0,128
				25	575		0,135
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,053
				6	394		0,083
				15	385		0,111
				25	375		0,125
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,052
				6	194		0,065
				15	185		0,094
				25	175		0,119



Şekil 6.39. 9 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.37. 10 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

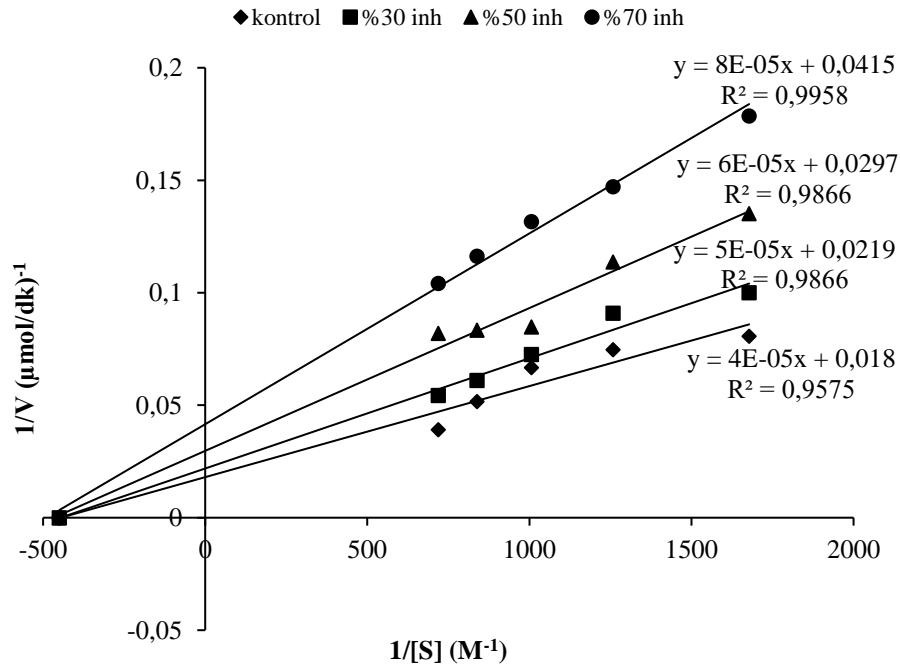
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
10	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,081
				6	994		0,100
				25	975		0,135
				60	940		0,179
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,075
				6	794		0,091
				25	775		0,114
				60	740		0,147
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,067
				6	594		0,072
				25	575		0,085
				60	540		0,132
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,052
				6	394		0,061
				25	375		0,083
				60	340		0,116
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,039
				6	194		0,054
				25	175		0,082
				60	140		0,105



Şekil 6.40. 10 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.38. 11 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

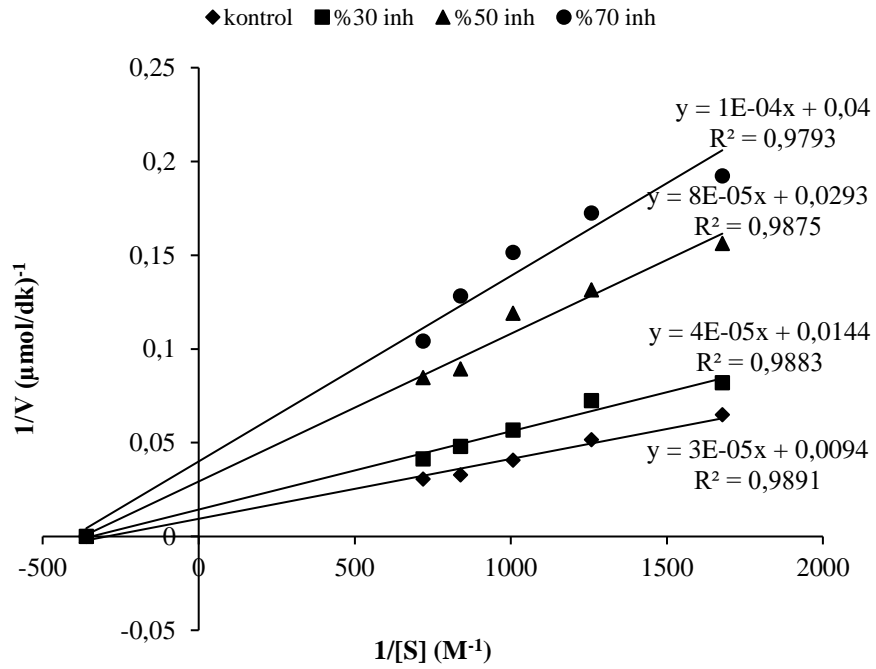
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
11	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,042
				10	990		0,053
				30	970		0,076
				40	960		0,094
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,027
				10	790		0,039
				30	770		0,063
				40	760		0,089
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,025
				10	590		0,033
				30	570		0,052
				40	560		0,075
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,022
				10	390		0,027
				30	370		0,050
				40	360		0,060
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,018
				10	190		0,026
				30	170		0,034
				40	160		0,045



Şekil 6.41. 11 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.39. 12 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

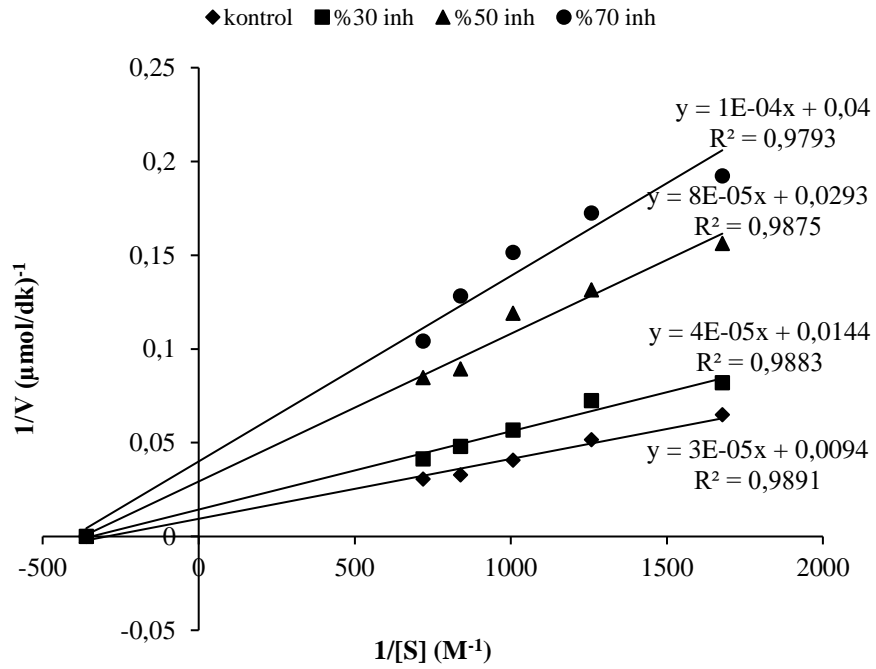
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
12	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,065
				10	990		0,082
				60	940		0,156
				100	900		0,192
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,052
				10	790		0,072
				60	740		0,132
				100	700		0,172
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,041
				10	590		0,057
				60	540		0,119
				100	500		0,152
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,033
				10	390		0,048
				60	340		0,089
				100	300		0,128
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,031
				10	190		0,041
				60	140		0,085
				100	100		0,105



Şekil 6.42. 12 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.40. 13 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

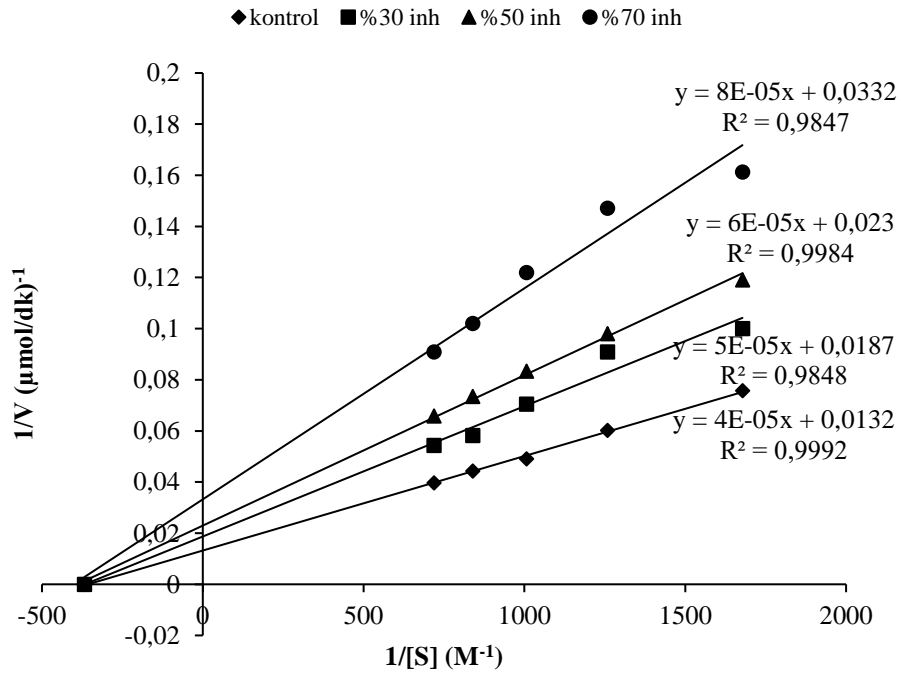
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) ⁻¹
13	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,053
				5	995		0,079
				12	988		0,091
				35	965		0,135
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,040
				5	795		0,057
				12	788		0,066
				35	765		0,100
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,034
				5	595		0,053
				12	588		0,057
				35	565		0,089
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,028
				5	695		0,046
				12	388		0,056
				35	365		0,082
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,028
				5	195		0,043
				12	188		0,052
				35	165		0,081



Şekil 6.43. 13 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.41. 14 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

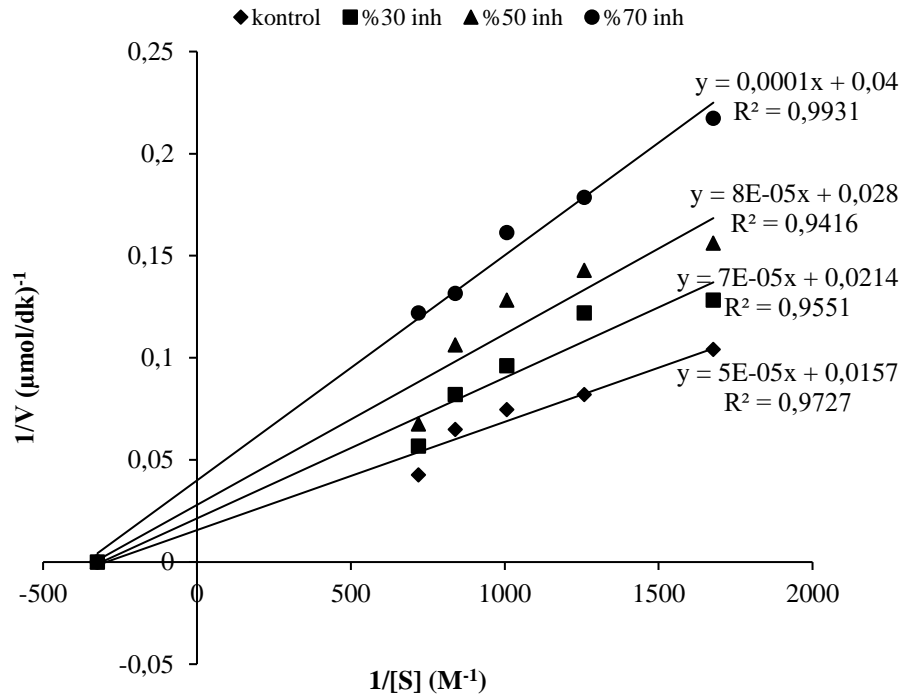
Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	1/[Substrat] (M ⁻¹)	1/Hız (μmol/dk) ⁻¹
14	600	1300	100	-	1000	1,68x10 ³	0,076
				5	995		0,100
				20	980		0,119
				25	975		0,161
	800			-	800	1,26x10 ³	0,060
				5	795		0,091
				20	780		0,098
				25	775		0,147
	1000			-	600	1,01x10 ³	0,049
				5	595		0,070
				20	580		0,083
				25	575		0,122
	1200			-	400	0,84x10 ³	0,044
				5	395		0,058
				20	380		0,074
				25	375		0,102
	1400			-	200	0,72x10 ³	0,040
				5	195		0,054
				20	180		0,066
				25	175		0,091



Şekil 6.44. 14 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.42. 16 bileşiğinin hCA II esteraz K_i sabitinin belirlenmesi amacıyla yapılan ölçümler.

Bileşik No	<i>p</i> -nitrofenil asetat (μL)	Tampon Çözelti (μL)	hCA II (μL)	İnhibitör (μL)	Saf Su (μL)	$1/[\text{Substrat}]$ (M^{-1})	$1/\text{Hız}$ ($\mu\text{mol/dk}$) $^{-1}$
16	600	1300	100	-	1000	$1,68 \times 10^3$	0,104
				8	992		0,128
				12	988		0,156
				25	975		0,217
	800			-	800	$1,26 \times 10^3$	0,082
				8	792		0,122
				12	788		0,143
				25	775		0,179
	1000			-	600	$1,01 \times 10^3$	0,075
				8	592		0,096
				12	588		0,128
				25	575		0,161
	1200			-	400	$0,84 \times 10^3$	0,065
				8	392		0,082
				12	388		0,106
				25	375		0,132
	1400			-	200	$0,72 \times 10^3$	0,043
				8	192		0,057
				12	188		0,068
				25	175		0,122



Şekil 6.45. 16 bileşiği için hCA II esteraz K_i grafiği.

Çizelge 6.43. Esteraz IC₅₀ ve K_i değerleri.

Bileşik	Esteraz IC ₅₀ (µM)		K _i (µM)		İnhb./Aktv.
	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II	
1	7,11	5,92	3,64	2,63	İnhibisyon
2-6	-	-	-	-	-
7	6,91	5,53	3,45	1,89	İnhibisyon
8	8,71	6,97	4,25	2,28	İnhibisyon
9	12,24	9,18	3,62	2,08	İnhibisyon
10	7,15	5,96	4,39	2,50	İnhibisyon
11	0,36	0,32	0,15	0,10	İnhibisyon
12	2,51	2,20	0,74	0,44	İnhibisyon
13	5,46	4,10	2,37	1,42	İnhibisyon
14	2,06	1,65	1,66	0,97	İnhibisyon
15	0,43	0,40	-	-	İnhibisyon
16	1,73	1,48	1,12	0,63	İnhibisyon

Karbonik anhidraz (CA), aktif bölgesinde Zn²⁺ iyonu bulunduran ve metabolik atık olan karbon dioksitin bikarbonata dönüşümü sağlayan bir metaloenzimdir.

Hemen hemen her organizmada bulunan ve pek çok dokuda dağılım gösteren karbonik anhidraz enzimi, HCO₃⁻ ve H⁺ oluşturarak CO₂'nin hidrasyonunu sağlar ve asit-baz dengesinin regülasyonunda görev alır.

Başta glokom olmak üzere, karbonik anhidraz inhibitörleri günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan önemli terapötik ajanlardır. Yüksek göz içi basıncının optik sinir uçlarında büyük hasara yol açmasına ve ilerlemesi halinde kalıcı körlüğe sebep olan glokom hastalığının tedavisinde sistemik ve topikal CA inhibitörleri kullanılmaktadır. Sistemik CA inhibitörlerinden asetazolamid, diklorfenamid ve metazolamid; göz epitelindeki hCA II ve hCA IV izoenzimlerini inhibe ederek HCO₃⁻ oranını azaltmakta ve göz içi sıvısının salgılanmasını yavaşlatmaktadır. Glokom tedavisinde etkin rol oynayan sistemik inhibitörler gözün yanı sıra farklı dokulardaki CA enzimlerini de etkilediğinden dolayı önemli yan etkiler oluşmaktadır. Meydana gelen yan etkileri en aza indirmek amacıyla lokal olarak göze uygulanabilen topikal CA inhibitörleri olan dorzolamid ve brinzolamid sentezlenmiş ve kliniklerde tedavi için kullanılmıştır. Yapılan araştırmalarla topikal CA inhibitörlerinin de lokal yan etkileri tespit edilmiş ve yeni CA inhibitörlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Bu tez çalışmasında 2-aminopiridin türevlerinin ve metal komplekslerinin insan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. Enzim aktivitesi esteraz aktivitesi tayini ile tespit edilmiştir. Esteraz aktivitesi ölçümü karbonik anhidraz enziminin ester bağlarını parçalaması esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole dönüştürmekte ve 348 nm de absorpsiyon göstermektedir. Substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetat bileşiğinin enzimin aktif kısmına yakın konumdaki histidin imidazol halkasına bağlanması, sülfonamit inhibitörlerinin de aktif kısımdaki Zn^{+2} iyonuna bağlı OH grubuna bağlanması sonucunda yarışmasız inhibisyon gerçekleşmektedir.

İnhibitörlerin inhibisyon kuvvetlerinin belirlenmesi için IC_{50} değerleri kullanıldı. Bu bileşiklerin insan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan hCA I ve II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkileri, glokom hastalığının tedavisinde kullanılan topikal inhibitörlerde olduğu gibi %1'lik çözeltileri hazırlanıp enzim üzerine ilave edilerek araştırıldı.

K_i değerlerinin hesaplanması amacıyla beş farklı substrat konsantrasyonunun her biri için üç farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilerek Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik yoluyla K_i sabitleri tespit edildi.

Çizelge 5.43 deki veriler incelendiğinde özellikle 11, 12, 14 ve 16 bileşiklerinin güçlü inhibitör etki gösterdiği gözlenmektedir. Bu bileşiklere bakıldığında ise 11 ve 12 nolu bileşiklerin en güçlü inhibisyona sahip olduğu görülmektedir. 15 nolu bileşiğin ise CAI ve CAII izoziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi olduğu ancak K_i değerlerinin hesaplanamadığı görülmektedir. İnhibitör maddelerin inhibisyon etkileri CAI izoziminden ziyade CAII izozimi üzerine daha etkili olmuştur. Tüm bileşikler hidrataz aktivitesini inhibe etmemişlerdir. Esteraz aktivitesini ise 2-6 bileşikleri inhibe etmemişlerdir. Diğer bileşiklerin ise çok güçlü olmasa da inhibisyon etkileri vardır.

Özetle, yeni sentezlenen inhibitör bileşiklerin inhibisyon potansiyelleri umut vadetmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbate, F., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2003). Carbonic Anhydrase inhibitors: X-ray Crystallographic Structure of the Adduct of Human Isozyme II with the Perfluorobenzoyl Analogue of Methazolamide. Implications for the Drug Design of Fluorinated Inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, (18),303.
- Abbate, F., Winum, J. Y., Potter, B. V., Casini, A., Montero, J. L., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2004). Carbonic Anhydrase Inhibitors: X-ray Crystallographic Structure of the Adduct of Human Isozyme II with EMATE, a Dual Inhibitor of Carbonic Anhydrase and Steroid Sulfatase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (14), 231.
- Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. ve Edsall, J. T., (1966). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, *Journal of Biological Chemistry*, 214, 5137.
- Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., (1997). A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 27, 559.
- Bilgin, S., Kayıkçıoğlu, Ö. R., Başer, E. (2014). Göz İçi Basıncı Yüksek Glokom Hastalarında Başlangıç Tedavisi Olarak Latanoprost ve Dorzolamid/Timolol Fiks Kombinasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5(4), 604-607.
- Bilgin, S., Kayıkçıoğlu, Ö. R., Başer, E. (2014). Göz içi basıncı yüksek glokom hastalarında başlangıç tedavisi olarak latanoprost ve dorzolamid/timolol fiks kombinasyon etkinliğinin değerlendirilmesi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5(4), 604-607.
- Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C. T. (1997). Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *Biochemistry*, (36), 10384.
- Brubaker, R.F. ve Gaasterland, D., (1984), The effect of isoproterenol on aqueous humor formation in humans, *Invest Ophthalmol Vis Science.*, 25, 357-359.
- Bülbül, M., Bekir, N. A. (1992). Glokom Tedavisinde Adrenerjik Reseptör Blokerlerinin Yeri. *Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 114-118.
- Coakes, R.L. ve Brubaker, R.F., 1978, The mechanism of timolol in lowering intraocular pressure: in the normal eye, *Arch Ophthalmol*, 96, 2045-2048.
- Cox, E. H., McLendon, G. L., Morel, F. M., Lane, T. W., Prince, R. C., Pickering, I. J., George, G. N. (2000). The Active Site Structure of *Thalassiosira weissflogii* Carbonic Anhydrase 1. *Biochemistry*, 39(40), 12128.
- Cronk, J. D., Endrizzi, J. A., Cronk, M. R., O'Neill, J. W., Zhang, K. Y. J. (2001). Crystal Structure of *E. Coli* β - Carbonic Anhydrase, an Enzyme with An Usual pH- Dependent Activity. *Protein Science*, 10(5), 911-922.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cuatracases, P., (1970). Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3059.

Dursun, B., Keklikçi, S. U., Dursun, M. E., Yıldırım, M., Erdem, S. (2016). Primer Açık Açılı Glokom Tanı ve Takibinde Bilgisayarlı Görme Alanı ile Optikal Koherens Tomografini Karşılaştırılması. *Dicle Tıp Dergisi*, 43(3), 441-451.

Eisenberg, D.L., Toris, C.B. ve Camras, C. B., (2002), Bimatoprost and travoprost. A review of recent studies of two new glaucoma drugs, *Surv Ophthalmol*, 47(suppl 1), S.105-S115.

Emmerich, K. H. (2000). Comparison of latanoprost monotherapy to dorzolamide combined with timolol in patients with glaucoma and ocular hypertension. A 3-month randomised study. *Graefes Archive for Clinical Experimental Ophthalmology*, 238, 19-23.

García Sanchez J. (2000). Efficacy and Side Effects of Latanoprost Monotherapy Compared to Adding Dorzolamide to Timolol in Patients with Glaucoma and Ocular Hypertension-a Three-Month Randomised Study. Spanish Latanoprost Study Group. *European Journal of Ophthalmology*, 10, 198-204.

Gaul, G. R., Will, N. J. ve Brubaker, R. F., (1989), Comparison of a noncardioselective beta-adreno-ceptor blocker and a cardioselective blocker in reducing aqueous flow in humans, *Arch Ophthalmol*, 107, 1308-1311.

Gürsoy, S. Ş., Gürsoy, O. (2017). Pestisit Analizlerinde Asetilkolinesteraz İnhibisyonuna Dayalı İletken Polimer Esaslı Biyosensörler. *Akademik Gıda*, 15(4), 426-435.

Harris, L., (1971), Dose-response analysis of echothiophate iodide, *Arch Ophthalmol*, 86, 503-505.

Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G. N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J. M., Vihinen, M., Sly, W. S., Parkkila, S. (2005). Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *Biochemical Journal*, (392), 83.

<http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/nevbahar-tamcelik/Glokom.pdf>

<http://www.icoph.org/downloads/ICOGlaucomaGuidelines-Turkish.pdf>

Innocenti, A., Zimmerman, S., Casini, A., Ferry, J. G., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2004). Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of the Zinc and Cobalt Gamma- Class Enzyme From the Archaeon Methanosarcina Thermophila with Anions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,14(12), 3327.

Iverson, T. M., Alber, B. E., Kisker, C., Ferry, J. G., Ress, D. C. (2000). A Closer Look At tge Active Site of Gamma-Class Carbonic Anhydrases: High-Resolution Crystallographic Studies of Carbonic Anhydrase From Methanosarcina Thermophila. *Biochemistry*, 39(31), 9222.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kimber, M. S., Pai, E. F. (2000). The active site architecture of *Pisum sativum* β -carbonic anhydrase is a mirror image of that of α -carbonic anhydrases. *The EMBO Journal*, 19(7), 1407.

Kohn, J. ve Wilchek, M.A., (1978). Colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7, 14.

Laemmli, D.K., (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.

Lane, T., Morel, F. M. (2000). Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (97), 4627.

Larsson, L. I., Mishima, H. K., Takamatsu, M., Orzalessi, N., Rossetti, L (2002), The effect of latanoprost on circadian intraocular pressure in patients with glaucoma or ocular hypertension, *Ophthalmology*, 47(1), 90-96.

Liljas, A., Hakansson, K., Jonsson, B.H., Xue, Y. (1994). Inhibition and Catalysis of Carbonic Anhydrase. Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *European Journal of Biochemistry*, (219), 1

Liljas, A., Kannan, K. K., Bergsten, P. C., Waara, I., Fridborg, K., Strandberg, B., Carlbom, U., Jarup, L., Lovgren, S., Petef, M. (1994). Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *Nature: New Biology*, (235), 131.

Mindel, J. S., (2006), *Cholinergic pharmacology*. In: Tasman W, Jaeger EA, eds. Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology on CD-ROM. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.

Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Mayachi, S., Tsukihara, T. (2000). X-ray Structure of Beta- Carbonic Anhydrase from Red Alga, *Porphyridium Purpureum*, Reveals A Novel Catalytic Site for CO(2) Hydration. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (8), 5521.

Morrison, J. C. ve Pollack, P. I., (2003). *Glaucoma science and practice*. Thieme, New York, 530s.

Netland, P. A., (2008), *Glaucoma medical therapy*, Oxford University Press Inc., 290 s.

Netland, P. A., Landry, T., Sullivan, E. K., Andrew, R., Silver, L., Weiner, A., Mallick, S., Dickerson, J., Bergamini, M. V., Robertson, S. M., Davis, A. A. (2001), Travoprost Study Group. Travoprost compared with latanoprost and timolol in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension, *Am J. Ophthalmol*, 132, 472-484.

Neufeld, A. H., Bartels, S. P. ve Liu, J. H., (1983), Laboratory and clinical studies on the mechanism of action of timolol, *Surv Ophthalmol*, 28(suppl), 286-292.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Orzalesi, N., Rossetti, L., Bottoli, A. ve Fogagnolo P., (2006), Comparison of the effects of latanoprost, travoprost and bimatoprost on circadian intraocular pressure in patients with glaucoma or ocular hypertension, *Ophthalmology*, 113, 239-246.

Phillips, C. I., Howitt, G. ve Rowlands, D. J., (1967), Propanolol as ocular hypotensive agent, *Br J Ophthalmol*, 51, 222-226.

Reiss, G. R. ve Brubaker, R. F., (1983), The mechanism of betaxolol, a new ocular hypotensive agent, *Ophthalmology*, 90, 1369-1372.

Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A., Gibbons, B. H., Edsall, J. T., (1964). Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 1065-1078.

Schlötzer-Schrehardt, U. ve Naumann, G. O. H., (1995), Trabecular meshwork in pseudoexfoliation syndrome with and without open-angle glaucoma: a morphometric, ultrastructural study. *Invest Ophthalmol, Vis Science*, 36, 1750-1764.

Sherwood, M. ve Brandt, J., (2001), Six-month comparison of bimatoprost once-daily and twice daily with timolol twice-daily in patients with elevated intraocular pressure. *Surv Ophthalmol*, 45(suppl 2), s.361-368.

Smith, K. S., Ferry, J. G. (1999). A Plant- type (beta-class) Carbonic Anhydrase in the Thermophilic Methanoarchaeon Methanobacterium Thermoautotrophicum. *J. Bacteriol*, (181), 6247.

Smith, K. S., Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic Carbonic Anhydrases. Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *FEMS Microbiology Reviews*, (24), 335.

Stams, T., Christianson, D. W. (2000). *X-ray Crystallographic Studies of Mammalian Carbonic Anhydrase Isozymes. In the Carbonic Anhydrases- New Horizons*. Birkhäuser Verlag: Basel, 159-174.

Stockdill, P. ve Drance, S. M., (1965), Dose response of human intraocular pressure to various concentrations of echothiophate iodide, *Trans Ophthalmol Soc UK.*, 85, 537543.

Strop, P., Smith, K. S., Iverson, T. M., Ferry, J. G., Ress, D. C. (2001). Crystal Structure of the "Cab"- Type Beta Class Carbonic Anhydrase From the Archaeon Methanobacterium Thermoautotrophicum. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 10299.

Supuran, C. T., Casini, A., Scozzafava, A. (2004). *Development of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors. In Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators*. CRC Press: Boca Raton (FL), USA, 67-148.

Supuran, C. T., Scozzafava, A. (2000). Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, (10), 575.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators. *Medicinal Research Reviews*, (23), 146.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J. (2004). *Carbonic Anhydrase- Its Inhibitors and Activators*. CRC Press: Boca Raton (FL), USA, 1-363.
- Supuran, C. T., Scozzafava, C. (2007). Carbonic Anhydrase As Targets For Medicinal Chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 4336-4350.
- Taşkesen, M., (2002), Glokom tedavisinde kullanılan yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tunca, E., (2012), Yeni akridin türevlerinin antiglokom etkisinin in vitro olarak incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Van der Valk, R., Webers, C.A., Schouten, J. S., Zeegers, M. P., Hendrikse, F., Prins, M. H. (2005), Intraocular pressurelowering effects of all commonly used glaucoma drugs: a meta-analysis of randomized clinical trials, *Ophthalmology*, 112, 1177-1185.
- Wei, C.P., Anderson, J. A. ve Leopold, I., (1978), Ocular absorption and metabolism of topically applied epinephrine and dipivalyl ester of epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 17, 315-321.
- Winum, J. Y., Temperini, C., El Cheikh, K., Innocenti, A., Vullo, D., Ciattini, S., Montero, J., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2006). Carbonic Anhydrase Inhibitors: Clash with Ala65 as a Means for Designing Inhibitors with Low Affinity for the Ubiquitous Isozyme II, Exemplified By the Crystal Structure of the Topiramate Sulfamide Analogue. *Journal Medicinal Chemistry*, (49), 7024.
- Yablonski, M. E., Novack, G. D., Burke, P.J., Cook, D. J., Harmon, G. (1987), The effect of levobunolol on aqueous humor dynamics, *Exp Eye Res.*, 44, 49-54.
- Yöntem, M., Ünal, M., (2011). *Biyokimya* (Birinci Baskı). Türkiye: Aybil Yayınevi, 287
- Zimmerman, S., Innocenti, A., Casini, A., Ferry, J. G., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (2004). Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of the Procariotic Beta and Gamma-Class Enzymes From Archaea With Sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(24), 6001.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : İMDAT Gözde

Doğum tarihi ve yeri : 10.12.1992 Merkez/Bilecik

e-mail : gozdeimdat@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2019
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2014

Yabancı Dil

İngilizce