



T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ SENTEZLENEN SCHİFF BAZI METAL KOMPLEKSLERİNİN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİCO* METOTLARLA
İNCELENMESİ

Samet KARATAŞ

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

FARMASOTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
Şubat 2024
Her Hakkı Saklıdır.

**T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİ SENTEZLENEN SCHİFF BAZI METAL KOMPLEKSLERİNİN
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİCO* METOTLARLA
İNCELENMESİ**

Samet KARATAŞ

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

FARMASOTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

**ERZİNCAN
Şubat 2024
Her Hakkı Saklıdır.**

Kabul ve Onay

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında öğrenci Samet KARATAŞ tarafından Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ danışmanlığında hazırlanan “**Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkilerinin *İn Vitro* ve *İn Silico* Metotlarla İncelenmesi**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 01/02/2024 tarihinde yapılan tez savunma sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvan Adı Soyadı

İmza

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun / / 20.... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Filiz YANGILAR

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etiğe Uygunluk

“Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Karbonik Anhidraz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkilerinin *İn Vitro* ve *İn Silico* Metotlarla İncelenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 01/02/2024

(İmza)

Samet KARATAŞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ SENTEZLENEN SCHIFF BAZI METAL KOMPLEKSLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İN VİTRO VE İN SİLİCO METOTLARLA İNCELENMESİ

Samet KARATAŞ

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

Amaç: Enzimler, büyük çoğunluğu protein yapısında olan kompleks biyomoleküllerdir ve ziraat, tıp, gıda ve endüstri gibi birçok sektörde geniş kullanım alanına sahiptir. Bitki, hayvan ve mikroorganizma kaynaklarından pratik ve ekonomik yollarla yalıtılabilmeleri uygulama alanlarını artırmaktadır. Bu biyomoleküllerin biyolojik sistemlerdeki inhibisyon mekanizmalarının saptanması, hastalıkların tedavisi ve ilaç geliştirme çalışmalarında emsalsiz bir kontrol mekanizması sunmaktadır. Bu doğrultuda, tez kapsamında insan karbonik anhidraz (*hCA*) I ve II izoenzimleri üzerine yeni sentezlenen Schiff bazı metal komplekslerinin inhibisyon etkileri *in vitro* ve *in silico* metotlarla araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Bu amaç çerçevesinde yürütülen tez çalışmamızda insan kan dokusu kullanılarak eritrosit sitozolünde konumlanan *hCA* I ve *hCA* II izoenzimleri Sepharose-4B-L-Tirozin- sülfonamid afinite kolon kromatografisi yardımı ile saflaştırıldı. Saflaştırılan bu enzimlerin her birinde yeni sentezlenen Schiff bazı metal komplekslerinin enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. Referans madde olarak asetazolamid kullanıldı. Her metal kompleksi için hem IC_{50} hem de K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon tipleri belirlendi. Ayrıca bu maddelerin enzim aktivitesi üzerindeki etkileri *in silico* metotlar kullanılarak incelendi.

Bulgular: Sentezlenen Schiff Bazı türevlerinin K_i değerleri *hCA* I için $42,14 \pm 4,47$ nM ile $322,80 \pm 18,98$ nM arasında değişirken, *hCA* II için $33,37 \pm 3,84$ nM ile $161,50 \pm 15,87$ nM arasında olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Çalışmada kullandığımız yeni sentezlenen Schiff Bazı türevi bileşiklerin *hCA* I ve *hCA* II izoenzimlerini önemli seviyelerde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

2024, 51 Sayfa

Anahtar Kelimeler: İnhibisyon, Karbonik Anhidraz, Schiff Bazı.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NEWLY SYNTHESIS SCHIFF METAL COMPLEXES ON CARBONIC ANHYDRASE ENZYME ACTIVITY BY IN VITRO AND IN SILICO METHODS

Samet KARATAŞ

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Health Sciences
Department of Pharmaceutical Sciences

Supervisor: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

Aim: Enzymes are complex biomolecules, the majority of which are in protein structure, and have a wide range of uses in many sectors such as agriculture, medicine, food and industry. Their ability to be isolated from plant, animal and microorganism sources in practical and economical ways increases their application areas. Determining the inhibition mechanisms of these biomolecules in biological systems offers a unique control mechanism in the treatment of diseases and drug development studies. In this direction, within the scope of the thesis, the inhibition effects of newly synthesized Schiff base metal complexes on human carbonic anhydrase (hCA) I and II isoenzymes were investigated by in vitro and in silico methods.

Material and Method: In our thesis study carried out for this purpose, hCA I and hCA II isoenzymes located in the erythrocyte cytosol were purified with the help of Sepharose-4B-L-Tyrosine-sulfonamide affinity column chromatography using human blood tissue. The inhibition effects of newly synthesized Schiff base metal complexes on the enzyme activity of each of these purified enzymes were investigated. Acetazolamide was used as the reference substance. Both IC₅₀ and KI values were calculated for each metal complex and inhibition types were determined. Additionally, the effects of these substances on enzyme activity were examined using in silico methods.

Results: While the KI values of the synthesized Schiff base derivatives ranged between 42.14 ± 4.47 nM and 322.80 ± 18.98 nM for hCA I, they ranged from 33.37 ± 3.84 nM to 161.50 ± 15.87 nM for hCA II.

Result: It has been determined that the newly synthesized Schiff Base derivative compounds we used in the study inhibit hCA I and hCA II isoenzymes at significant levels.

2024, 51 Pages

Keywords: Carbonic Anhydrase, Inhibition, Schiff Base.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince, bilgisi, deneyimi ve yakın ilgisi ile bana her zaman destek olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ'e,

Tez çalışmalarına yapmış oldukları destek ve katkılarından dolayı Ardahan Üniversitesi Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Yeliz DEMİR'e,

Çalışmalarımızda kullanılan molekülleri sentezleyen Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra TUNA YILDIRIM'a,

Yüksek Lisans eğitimime kıymetli katkılarından dolayı Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Köksal PABUÇCU'ya ve Sayın Doç. Dr. Esra DİLEK'e,

Yüksek Lisans Laboratuvar Çalışmalarımı Erzincan Gıda Kontrol Laboratuvarında yürütebilmem konusundaki gerekli izinleri sağlayan Kurum Müdürü Sayın Ömer Faruk SARITAŞ'a,

Deneylerin yürütülmesinde ki yardımları ve desteği için kıymetli dostum Fatih ORHAN'a,

Tez yazımım esnasında üzerimdeki iş yükünü hafifleten kıymetli birim ekip arkadaşlarım, Aycan YILMAZ, Fatma KON ve Ahmet BAŞARAN'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi Yüksek Lisans Öğrenimim esnasında da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli babam Naci KARATAŞ, annem Nejla KARATAŞ ve değerli kardeşlerime,

Her konuda olduğu gibi bu süreçte de sabır ve özveri ile hep yanımda olan, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli eşime, oğluma ve kızlarıma,

İsimlerini burada zikredemediğim ama yardım ve desteklerini esirgememiş herkese;

Gönülden teşekkür ve saygılarımla...

Samet KARATAŞ

Şubat, 2024

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay	i
Bilimsel Etiğe Uygunluk.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Enzimler.....	2
2.2. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması.....	2
2.3. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri.....	3
2.4. Enzim Kinetiği.....	5
2.5. Enzim İnhibisyonu ve Aktivasyonu.....	6
2.5.1. Geri Dönüşümlü (Tersinir) Enzim İnhibisyonu	7
2.5.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması.....	13
2.5.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi	14
2.5.3. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri	15
2.5.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	15
2.5.5. Sülfonamidler	16
3. MATERYAL ve METOT	19
3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Ekipmanlar	19
3.2. Laboratuvar Çalışmaları.....	19
3.2.1. Enzimin Saflaştırılması ve Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler.....	19
3.2.2. Jel Elektrophorezi (SDS-Poliakrilamid SDS-PAGE) için Kullanılan Çözeltiler .	21
3.2.3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin Sentezi	22
3.2.3. Sepharose-4B-L-Tirozin- sülfonamid Afinite Jelinin Hazırlanması.....	24
3.2.4. Deneyde Kullanılan İnsan Kanının Temini ve Hemolizatın Hazırlanması.....	26
3.2.5. Afinite Kolonuna Hemolizatın Tatbiki ve Enzimlerin Elüe Edilmesi İşlemi	26
3.2.6. Diyaliz (Tuzların uzaklaştırılması) İşlemi.....	27
3.2.7. Protein Tayini.....	27

3.2.8. Elde Edilen Enzim Saflığının SDS-PAGE Yöntemi ile Kontrolü	28
4. BULGULAR	31
4.1. Kantitatif Protein Tayini ve hCA I ve II İzoenziminin Saflaştırılması Sonuçları	31
4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	33
4.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Bileşiklerin Etkilerinin İncelenmesinin Sonuçları	33
5.4. Moleküler Kenetlenme Çalışmaları	39
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
ÖZGEÇMİŞ	52



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Holoenzimin Yapısı	5
Şekil 2. 2. Şematize Edilmiş Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu	7
Şekil 2. 3. Şematize Edilmiş Nonkompetitif (Yarışmasız) Enzim İnhibisyonu	8
Şekil 2. 4. Şematize edilmiş unkompetitif (Yarı Yarışmalı) enzim inhibisyonu	8
Şekil 2. 5. Şematize Edilmiş Lineer Karışık Tip Enzim İnhibisyonu	9
Şekil 2. 6. Şematize Edilmiş Geri Dönüşümsüz Enzim İnhibisyonu	9
Şekil 2. 7. Eritrosit Hücre Zarının Klorür-Bikarbonat Transferi.....	13
Şekil 2. 8. CA'nın Katalizlediği CO ₂ -Hidrataz Tepkimesi Mekanizmasının Görseli.....	14
Şekil 2. 9. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Mekanizması	16
Şekil 2. 10. Klinikte Kullanılan Bazı Sülfonamidlerin Kimyasal Formülleri	18
Şekil 3. 1. Ligandın Sentez Mekanizması	22
Şekil 3. 2. Metal Komplekslerinin Sentez Mekanizması	23
Şekil 3. 3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksleri	24
Şekil 3. 4. Sefaroz 4B-L-Tirozin Afinite Jelinin Hazırlanma Adımlarının Şematik Gösterimi	25
Şekil 3.5. Substrat Olarak Kullanılan p-nitrofenilasetat'ın p-nitrofenol'a Hidrolizi Reaksiyonu	29
Şekil 4. 1. Bradford Yöntemi Standart Grafiği	32
Şekil 4. 2. SDS-PAGE Elektroforez Karakterizasyon Görseli (0: Standart 1: <i>hCA</i> I Enzimi, 2: <i>hCA</i> II Enzimi)	33
Şekil 4. 3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan LH Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve <i>K_I</i> Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	34
Şekil 4. 4. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CoL ₂ Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve <i>K_I</i> Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	34
Şekil 4. 5. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CuL ₂ Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve <i>K_I</i> Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	35
Şekil 4. 6. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan NiL ₂ Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve <i>K_I</i> Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	35

Şekil 4. 7. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan ZnL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	36
Şekil 4. 8. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan LH Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	36
Şekil 4. 9. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CoL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	37
Şekil 4. 10. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CuL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	37
Şekil 4. 11. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan NiL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	38
Şekil 4. 12. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan ZnL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	38
Şekil 4. 13. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen $CuL_2 - hCA$ I (PDB ID: 1AZM) Etkileşim Diyagramı.....	41
Şekil 4. 14. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen $CuL_2 - hCA$ II (PDB ID: 3HS4) Etkileşim Diyagramı.....	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. LH Ligandı ve Metal Komplekslerinin Analitik ve Fiziksel Verileri	23
Tablo 3.2. Aktivasyon Küveti İçeriği ve Miktarları.....	30
Tablo 4.1. <i>h</i> CA I ve II İzoenziminin Saflaştırılma Basamakları.....	32
Tablo 4.2. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin IC ₅₀ Değerleri ve <i>K</i> ₁ Sabitleri.....	39



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

<i>L</i>	Litre
<i>g</i>	Gram
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
<i>nM</i>	Nanomolar
μM	Mikromolar
<i>mmol</i>	Milimol
<i>mg</i>	Miligram
<i>M</i>	Molarite
<i>mL</i>	Mililitre
<i>rpm</i>	Dakikadaki devir sayısı
$^{\circ}C$	Santigrat derece
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ζ	Zeta
η	Eta

Kısaltmalar

CA	Karbonik Anhidraz
<i>hCA I</i>	İnsan karbonik Anhidraz-I Enzimi
<i>hCA II</i>	İnsan karbonik Anhidraz-II Enzimi

EI	Enzim-inhibitör kompleksi
CAA	Karbonik anhidraz aktivatörü
ES	Enzim-Substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
HCO_3^-	Bikarbonat İyonu
CO_2	Karbondioksit
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
kDa	Kilodalton
K_m	Maksimum hızın yarısına erişildiği andaki substrat konsantrasyonu
EU	Enzim Ünitesi
$V_{\max}$	Maksimum reaksiyon hızı
IC_{50}	Enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu
K_i	İnhibisyon denge sabiti
DMSO	Dimetilsülfoksit
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerde canlılığın devamı ve regülasyonu için ana unsur olan ve normalde yavaş cereyan eden kimyasal tepkimeleri hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Ayrıca bu biyomoleküller canlı organizma dışında da aktivasyonlarını koruyabilmeleri, kolay ve ekonomik saflaştırılabilme özellikleri nedeniyle gıda, tıp, tarım, endüstri gibi birçok alanda yaygın bir kullanıma sahiptir. Hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimler çoğu sektöre hizmet verirken, bu olağanüstü biyomoleküllerin biyolojik sistemlerdeki inhibisyon mekanizmalarının saptanması, hastalıkların tedavisi ve ilaç geliştirme çalışmalarında emsalsiz bir kontrol mekanizması sunmaktadır.

Biyokimya çalışmalarının büyük kısmı enzimler üzerinedir. Enzim alanında yapılan çalışmalar, enzimlerin yapı, fonksiyon, aktivasyon, inhibisyon gibi özelliklerinin belirlenmesi gelişen teknolojiyle daha ileri boyutlara taşınacak ve yaşam konforunu daha da artıracak alanlarda kullanılacaktır.

Tezimizde enzimler ve genel özellikleri hakkında bilgiler verilirken, aynı zamanda İnsan eritrositlerinden izole edilen karbonik anhidraz (*hCA*) I ve II izoenzimlerinin temel yapılarından, aktivitelerinden ve inhibisyon özelliklerinden söz edilmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler canlı sistemlerdeki tepkimeleri herhangi bir yan ürün oluşturmaksızın %100 ürün verimliliğiyle katalizleyen, katalitik olarak aktif bazı RNA moleküllerinin küçük bir sınıfı hariç tutulmak kaydıyla, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Bu biyomoleküllerin en önemli özellikleri katalitik güçleri ve seçicilikleridir (Granger Lehninger, 1982; Keha, 2009).

Birçok enzim katalitik aktivitelerini sadece protein yapılarıyla gerçekleştirebilirken, bazıları da protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen yardımcı gruplara ihtiyaç duyarlar. Kofaktörler bir metal iyonu olabileceği gibi koenzim adı verilen kompleks bir bileşik de olabilir. Bazen katalitik aktivitenin gerçekleşmesi için her ikisine de ihtiyaç duyulabilirler (Bingöl, 1983; Keha, 2009) Enzimler, en çok üzerinde durulmaya değer ve çok kompleks özellikleri olan proteinlerdir. Enzimler inorganik yapıdaki katalizörlerden çok daha fazla katalitik aktiviteye sahiptir. Substratlarına karşı yüksek afinite ve spesifiklik gösterirler. Biyokimyasal reaksiyonları çok yüksek derecede hızlandırır ve optimum şartlar altındaki sulu çözeltilerde işlev görürler (Montgomery ve ark., 2000). Bu biyomoleküllerin katalitik yönden aktiviteleri, doğal protein geometrisinin sağlamlılığıyla yakından ilişkilidir. Eğer enzim alt birimlerine parçalanmış ya da denatürasyona uğramış olursa katalitik bakımdan aktivitesini kaybetmiş olur. Bu yüzden protein yapısındaki enzimlerin aktivitesi için esas olan birincil, ikincil, üçüncül ya da dördüncül yapılarını koruyor olmasıdır. Enzimlerin gösterdikleri aktivitenin hızı turnover sayısı ile ifade edilir. Birim zamandaki bir mol enzimin ürüne çevirdiği substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Katalaz enzimi $40.000.000\text{ s}^{-1}$ turnover sayısı ile en yüksek çevirme sayısına sahip olan enzim olarak bilinmektedir.

2.2. Enzimlerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

Enzimlerin adlandırılması ve sınıflandırılması yapılırken enzim ve etki ettiği substrat isimlerine göre ya da aktivitelerini tamamlayan enzim veya kelimelerin sonuna -az- eki

eklenerek adlandırılır. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu enzimleri sınıflandırırken, enzimleri katalizledikleri reaksiyon şekillerine göre altı ana grupta sınıflandırmışlardır. (Lehninger ve ark., 2005). Bu altı ana grup sınıflandırılması şöyledir:

Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme ve İndirgenme tepkimelerini kataliz eden enzimlerdir. Oksidazlar, redüktazlar, dehidrogenazlar, oksijenazlar ve proksidazlar ile koenzim olarak da NADPH, FADH₂, NADH örnek olarak kullanılabilir.

Transferazlar: Hidrojen molekülü hariç diğer grupların transferini substratlar arasında sağlayarak katalizleyen enzim gruplarıdır. Fosfat, aldehitler, ve ketonlar transferazlar ailesine örnek gösterilebilir.

Hidrolazlar: Eter, ester, glikozid, peptid ve anhidrid gibi kompleks bağların yanı sıra P-N, C-X gibi bağlara da su bileşiminin katılmasıyla parçalanmayı katalizleyen enzimlerdir. Esteraz, lipaz, glikozidaz, fosfataz, proteinaz ve tüm nükleaz enzimler bu grupta yer alırlar.

Liyazlar: Oksidasyon ya da hidroliz yolunu kullanmadan farklı bir mekanizma ile karbonlardan grupların uzaklaştırılmasıyla ikili bağ meydana getiren ya da ikili bağa dahil olma tepkimelerini katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını da katalizlerler.

İzomerazlar: Yapısal, optik ya da geometrik izomerlerin birbirine çevrilmelerini katalize eden enzimlerdir. Epimeraz, rasemeraz, ve mutazlar bu grupta yer alır.

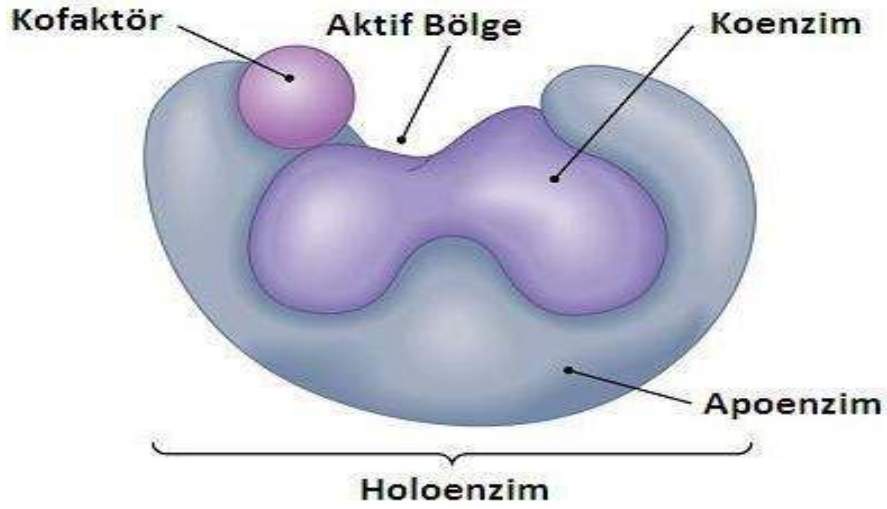
Ligazlar: Yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının koparılmasıyla açığa çıkan enerjinin kullanılarak C-O, C-C, C-S, C-N, bağlarının vücut bulmasını katalize eden enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

2.3. Enzimlerin Yapısı ve Genel Özellikleri

Enzimler canlı organizmaların hücreleri tarafından sentez edilen ve metabolizmada cereyan eden kimyasal tepkimeleri herhangi bir yan ürün meydana gelmeden %100 verimle çalışan ve hızlandırıcı etkisi olan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin genel özellikleri hakkında şu maddeler söylenebilir.

1. Katalitik aktiviteye sahip bazı nükleik asitler haricinde enzimlerin %90 kadarı protein yapısındadır.
2. Aynı tür tepkimeler Enzimler tarafından defalarca katalizlenebilir.
3. Bir enzim her zaman bir çeşit ya da aynı türden benzer tepkimeleri katalizler.
4. Katalizledikleri tepkimelerin aktivasyon enerjisini düşürerek, reaksiyonun daha kısa zamanda dengeye ulaşmasına imkan sağlarlar.
5. Optimum şartlar sağlandığında canlı ve cansız ortamlarda da karalı şekilde aktivite gösterirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

Biyolojik sistemlerde yaşamın sürmesini sağlayan tüm organ ve organeller, eşzamanlı bir şekilde çalışabilmektedir. Bu kusursuz koordinasyon şüphesiz milyonlarca reaksiyonla mümkün olmaktadır. Canlılığın her aşamasında gerçekleşen bu eşzamanlı reaksiyonların gerçekleşmesi ancak spesifik katalizörler sayesinde mümkündür. Katalitik etki bakımından aktif olan küçük bir nükleik asit grubu haricinde enzimlerin tamamı protein yapısındadır. Çoğu enzim, katalitik işlevlerini yerine getirebilmek için protein yapısında olmayan koenzimlere veya kofaktörlere ihtiyaç duymaktadır (Nelson ve Cox, 2018). Enzimin, reaksiyonu tamamlamak üzere birleşerek kompleks oluşturduğu yapı substrat olarak isimlendirilir. Enzimler, substratın kataliz tepkimesini meydana getiren en temel biyokatalizörler olarak görev üstlenmektedirler. Diğer proteinlerle ortak olarak uzun düzlemsel bir aminoasit zincirine, yüksek molekül ağırlıklarına ve yapılarına bağlı yüksek seçici özelliklere sahip küresel proteinlerdir. Yapısal yönden üç boyutlu bir kompleks polipeptit zincirinden oluşmuşlardır. Şu ana kadar birçok sayıda spesifik enzim keşfedilmiştir. Bunların bir kısmı tamamıyla protein yapısındayken, bir bölümünün ise yapısında çeşitli metal iyonları, lipidler yada şekerler vardır (Ashok ve ark., 2021). Enzim yapısına bağlanan gruplar ‘prostetik grup’ olarak isimlendirilmiştir. Bu prostetik gruplardan, metal iyonu olanlara kofaktör, organik yapıda olanlara ise koenzim adı verilir. Enzim kofaktörü ile birlikte kompleks halde ve katalitik yönden aktif durumda ise holoenzim olarak isimlendirilir. Holoenzimi oluşturan iki farklı kısımdan biri protein diğeri ise kofaktör olan kısımdır. Holoenzimin protein olan bölümü çoğunlukla apoenzim olarak adlandırılmaktadır. Diğer bir terim olarak apoprotein isimi de kullanılmaktadır (Murray ve ark., 1993).



Şekil 2. 1. Holoenzimin Yapısı

Enzimlerin bazıları kofaktör olarak; Fe^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{+2} , Mn^{2+} gibi birden fazla sayıda veya tek anorganik iyon bulundururlar. Koenzim yapısı farklı bazı enzimlere özgü organik ya da metalorganik kompleks oluşumlu bir moleküldür (Supuran ve De Simone, 2015).

2.4. Enzim Kinetiği

Enzim etkisi ile katalizlenen tepkimelerin incelenmesi enzim kinetiği olarak isimlendirilir. Enzim kinetiği, meydana gelen kataliz tepkimelerinin hızlarının hesaplanmasını ve değişen şartların reaksiyon ortamına etkisini araştırır. Bu araştırmalar, enzimin katalitik mekanizmasını, enzimin aktivasyon durumunu ve enzim inhibisyonunun nasıl ne derecede meydana gelebileceğini inceleyerek ortaya koymamızı sağlar. Enzim aktivitesi üzerine etkisi olan faktörler çok önemlidir. Bu faktörleri; ısı, pH, substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, iyonik konsantrasyon, zaman, ışık, çevre faktörleri, reaksiyon ürünleri, kullanılan inhibitör madde, kofaktör yapısı, ve aktivatör maddelerin derişimleri olarak sıralanabiliriz (Cook ve Cleland, 2007; Marangoni, 2003).

Canlılığın devamı için bu kadar özgül spesifikliğe sahip olan enzimler, aynı zamanda emsalsiz bir kontrol mekanizması yolunu bizlere sunmaktadır. Özellikle kalıtsal olarak aktarılan ve bir takım gen defektleri ile seyreden genetik hastalıklar; bazı enzimlerin çok az miktarda ya da hiç eksprese edilememesi durumunda ortaya çıkar. Bazı hastalık gruplarında ise hastalığa enzimin normal düzeyden fazla aktivite göstermesi neden olabilir. Bu enzim

aktivitelerinin ya da enzim aktivitesi sonucu oluşan ürün miktarının vücut sıvılarında ya da doku örneklerinde tayin edilmesi bazı hastalıklara tanı koyma aşamasında oldukça önemli bir biyobelirteç olabilmektedir. Çoğu ilacın etki mekanizması da enzimlerle etkileşmesi suretiyle ortaya çıkar. Bu etkileşim enzimi aktive ya da inhibe etmesi yolu ile olur (Nelson ve Cox, 2016). Birçok ilaç ve toksik madde canlı sistemlerdeki enzimlerin aktivite durumlarında farklılık oluşturarak etkisini gösterir. Bu nedenle ilaç denemeleri için enzimlerin kinetik hesaplamalarının bilinmesi ve aydınlatılması gerekir. Enzimlerin süreye karşı aktiviteleri, turnover sayısı, Km sabiti gibi çeşitli kinetik parametrelerin anlamlı bir ifadeye dönüştürülüp, ortaya konulabilmesi için aşağıdaki Michaelis-Menten formülünden faydalanılır.

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Yukarda bahsettiğimiz Michaelis-Menten eşitliğinden ulaşılan veriler ordinatta substrat konsantrasyonu, hız, analitik düzlem olacak şekilde grafiğe aktarıldığında hiperbol bir eğri elde edilir. Teorikte kullanıma uygun olsa da laboratuvar uygulamaları sonucu bu grafikten olumlu sonuçlara ulaşılamayabilir. Bu sebeple grafiğin düzlemsel bir doğru grafiğine çevrilmesi gereklidir. Yukarıda gösterilen eşitliğin farklılaştırılmış hali olan aşağıdaki Lineweaver-Burk formülü ve bu formülden ulaştığımız doğrusal grafik çok daha kullanışlıdır. Bu sayede Km ile Vmax değerleri daha anlamlı ve doğru olarak saptanabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2007; Lehninger ve ark., 2005).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

2.5. Enzim İnhibisyonu ve Aktivasyonu

Bir enzimin aktivitesi aslında o enzimin katalizlediği tepkimenin hızıdır. Uluslararası Biyokimya Birliği enzim komisyonunu açıkladığı aktivite birimi enzim ünitesi (EU)'dir. Standart koşullar altında dakikada bir mikromol (μmol) substratı dönüşüme uğratan enzim miktarıdır. Diğer aktivite birimleri; spesifik aktivite, katalitik merkez aktivitesi, moleküler aktivite (turnover sayısı) dir. Enzim aktivite tayininde ya substratın zamana bağlı azalışı ya da zamana bağlı olarak ürün oluşumu ölçülür. Enzimatik reaksiyonların hızı yani aktivitesi

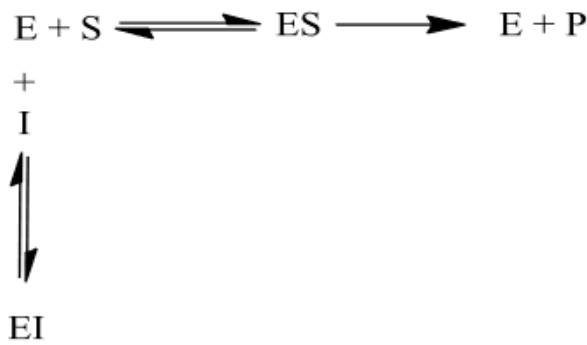
sıcaklık, pH, enzim ve substrat konsantrasyonu, iyonik şiddet, aktive edici ajanların ve inhibitörlerin varlığı gibi pek çok durumdan etkilenmektedir (Önal, 2010). Enzimatik yolla meydana gelen bir reaksiyonun, enzim inhibitörü olarak isimlendirilen madde veya maddeler tarafından hızlarının azaltılması yahut tamamen durdurulması durumudur. Geri dönüşümlü (tersinir) yada geri dönüşümsüz (tersinmez) enzim inhibisyonu olarak iki şekilde meydana gelebilirler (Marangoni, 2003; Ouertani ve ark., 2019).

2.5.1. Geri Dönüşümlü (Tersinir) Enzim İnhibisyonu

Geri dönüşümlü olarak gerçekleşen enzim inhibisyonunda inhibitör enzime kovalent olmayan bağlar ile bağlanır. Enzim ve inhibitör kompleksi bu güçsüz bağlar sayesinde ortam şartlarında değişiklikler yapılarak ayrılabilirler. Dönüşümlü inhibisyon dört farklı şekilde meydana gelmektedir (Ouertani ve ark., 2019).

Kompetitif (Yarışmalı) enzim inhibisyonu

Yarışmalı inhibisyonunda, inhibitör, enzimin yapısında bulunan aktif bölge ile bağ kurmak için substrat ile yarış halindedir. Enzimin aktif bölgesi ile inhibitör bağ kurmayı başardığı zaman reaksiyon gerçekleşmez ve ürün oluşmaz. Bu enzim inhibisyonu çeşidinde inhibitör, enzimin substratına olan ilgisini azaltır (Tunca, 2012).

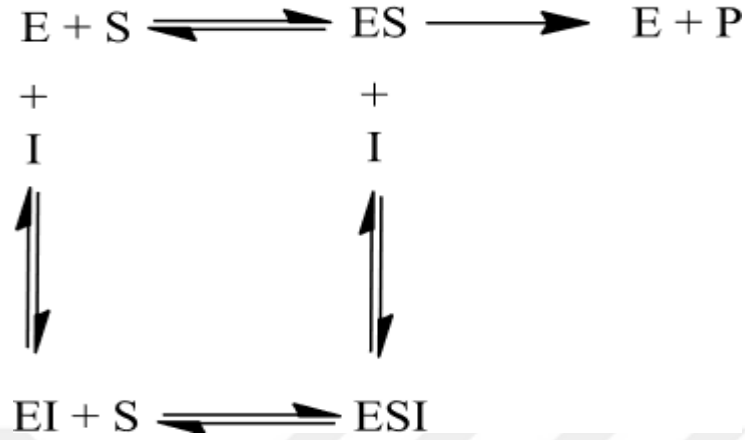


Şekil 2. 2. Şematize Edilmiş Kompetitif (Yarışmalı) Enzim İnhibisyonu

Nonkompetitif (Yarışmasız) enzim inhibisyonu

Bu tür inhibisyonunda, inhibitör ve substrat enzime birlikte bağlanabilir. Yani burada inhibitör enzimin aktif bölgesine değil başka bir kısmına bağlanır, aktif bölgeye özel olan substratın bağlanmasına engel oluşturmadığı için bir yarış durumu söz konusu değildir. Substrat

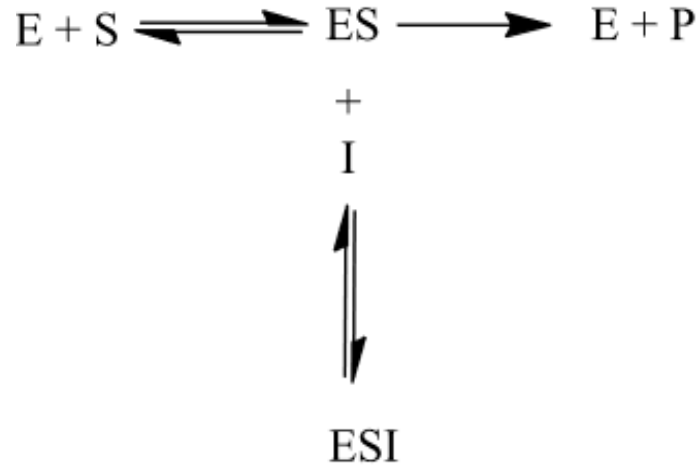
derişimi yükseltilerek inhibisyon etkisi sonlandırılmaz. Bu katalitik reaksiyonda enzimin V_{max} değeri azalırken, K_m değeri sabittir (Tunca, 2012)



Şekil 2. 3. Şematize Edilmiş Nonkompetitif (Yarışmasız) Enzim İnhibisyonu

Unkompetitif (Yarı Yarışmalı) enzim inhibisyonu

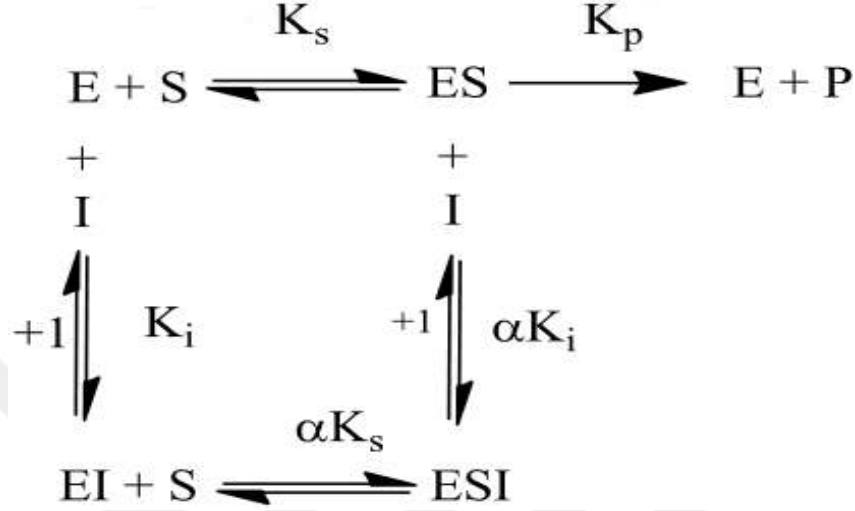
Unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon çeşidinde; inhibitör madde enzim-substrat kompleksinin meydana geldiği andan itibaren, substratın bağlandığı aktif noktadan farklı bir bölgeye tersinir olarak bağlanarak enzimin yapısında değişikliğe sebep olarak aktivasyondan yoksun hale getirir (Tunca, 2012).



Şekil 2. 4. Şematize edilmiş unkompetitif (Yarı Yarışmalı) enzim inhibisyonu

Lineer-Karışık tip inhibisyon

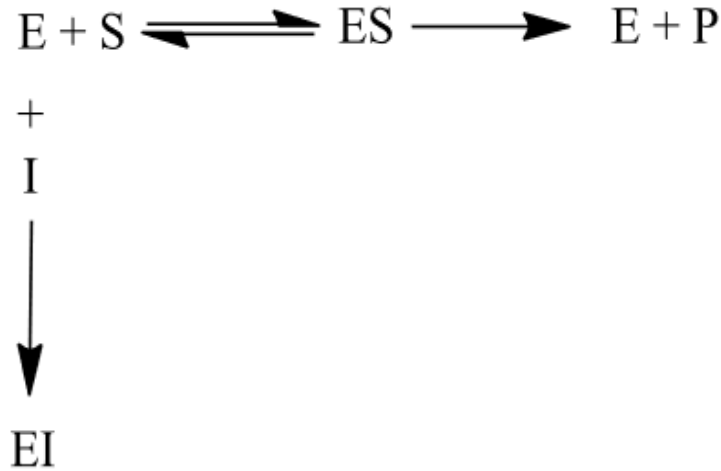
Bu tip inhibisyonda, ya substrat enzim-inhibitör kompleksine bağlanır ya da inhibitör enzim-substrat kompleksine bağlanır ve inhibisyon gerçekleşir. Bu durumda enzim-substrat-inhibitör kompleksi oluşur ancak bu kompleks inaktive haldedir (Tunca, 2012).



Şekil 2. 5. Şematize Edilmiş Lineer Karışık Tip Enzim İnhibisyonu

2.5.2. Geri Dönüşümsüz (Tersinmez) Enzim İnhibisyonları

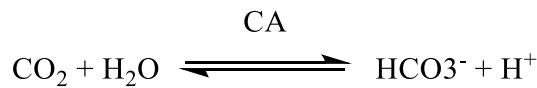
Burada inhibitör, enzimin aktivite özelliğini sağlayan ve enzim yapısı üzerinde bulunan fonksiyonel grubu yıkıma uğratması ile veya bu nokta ile geri dönüşümsüz olarak birleşmesi ile inhibisyona neden olur. Bu inhibisyon türünde inhibitör enzimi kalıcı olarak inhibe eder (Tunca, 2012).



Şekil 2. 6. Şematize Edilmiş Geri Dönüşümsüz Enzim İnhibisyonu

2.6. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidraz (CA; E.C. 4.2.1.1.), karbondioksit (CO_2) ve bikarboat (HCO_3^-)'ın birbirlerine dönüştürülmesi tepkimelerini karbonik asitin meydana gelmesine izin vermeden farklı bir yol izleyerek katalize eder. Bu enzim HCO_3^- ve H^+ oluşturarak hem CO_2 'in uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli bir görev üstlenmektedir. CA, metalo enzim grubunda yer almaktadır ve aktif bölgesine bağlanmış bir Zn^{+2} iyonu bulundurmaktadır. Uygun şartlar altında aktivitesini uzun süre koruyabilmesi ve çözelti ortamındaki karalılığı avantajlı özelliklerindendir. Enzimin doğada farklı organizmalarda pek çok formu vardır. Bulundukları organizmaya bağlı olarak beş temel sınıfa (α -CA, β -CA, γ -CA, δ -CA ve ζ -CA) ayrılmıştır. CA, ilk olarak memeli eritrositlerinden yalıtılmıştır, sonrasında insan eritrositleri, sığır lökositleri, balık eritrositleri, sıçan tükrüğü, sıçan eritrositleri, sığır iskeleti, bitki kaynakları ve bir çok mikroorganizmalardan saflaştırılmış karakterize edilmiş ve molekül kütlesi 29 kDa civarında olduğu belirlenmiştir (Arslan, 2001; Supuran ve Scozzafava, 2001). Katalitik aktiviteye sahip çok sayıda CA izoenzimi tanımlanmıştır. CA izoenzimlerinin tamamının ortak noktası, aktif merkezlerinde bir Zn^{2+} iyonu taşıyarak bu metal bağlanma bölgesinde histidin aminoasidi ile ligant oluşturmalarıdır. Zn^{2+} iyonları, direkt substrat molekülleriyle etkileşimde bulunarak enzimin etkisini meydana getirir (Hilvo ve ark., 2005; Mohanty ve ark., 1998). Yukarıda bahsettiğimiz beş temel gruptan α -Karbonik anhidraz memelilerde bulunmaktadır ve temel fonksiyonu olarak kanda ve doku kılcalında;



reaksiyonunu dönüşümlü olarak katalizlemektir. Bu basit görünen reaksiyonun fizyolojik yönden vücutta çok önemli fonksiyonları vardır. Bu reaksiyon; metabolize edici dokular ile akciğer arasında karbondioksit/bikarbonat taşınımı, dokulardaki asit-baz oranının dengede tutulması, çoğu organın elektrolit dengesinin ayarlanması, kireçleme, kemik erimesi, biyosentetik tepkimeler ve tümörlerin oluşması gibi fizyolojik durumlarla direkt olarak bağlantılıdır (Supuran, 2009).

2.6.1 Karbonik Anhidraz İzozimlerinin Fizyolojik ve Biyolojik Fonksiyonları

Metallo enzim olan CA, karbondioksitin hidrasyonunu döngüsel olarak katalize eden bir gruptur. Dokusal yayılımlarıyla hücre içi konumlanmaları yönünden kinetik nitelikleri birbirinden bambaşka 16 adet CA izozimi memelilerde karakterize edilmiştir. Canlı organizmalarda CA, pH regülasyonu, CO₂ transferi, elektrolit oluşması, sentez tepkimeleri vb. olaylarda görev alır (Wang, 2009).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin ortaya çıkışı insan *hCA* izoenzimleri üzerindeki araştırmalarla olmuştur. Eritrositlerde *hCA* I ve *hCA* II izoenzimi bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli işlevi ise doku kılcal damarlarında, metabolizma sonucu açığa çıkan CO₂'i H₂CO₃'e, akciğer dokusunda ise H₂CO₃'i CO₂'e çevirmesi reaksiyonunu kataliz ederek solunum olayında yer almasıdır. *hCA* I eksikliği görülmüş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptom ile ilişkilendirilememiştir (Sly ve Hu, 1995; Supuran ve ark., 2003).

En yoğun çalışma *hCA* II izoenzimi üzerinde yapılmaktadır. Bu izoenzimin turnover sayısı 25⁰ C'de 10⁶ s⁻¹ olarak belirlenmiştir. CA II'nin yayılım gösterdiği dokusal dağılım geniştir, çoğu doku ve hücre tipinde bulunur. Renal tübüler asidoz, osteoporoz, ve serebral kalsifikasyonla bağlantılı olması bu izoenzimin böbrekte, kemikte, ve beyindeki önemine işaret eder (Lindskog, 1997).

hCA II ve *hCA* IV izoenzimleri, kornea, göz lensi ve silyer epitelyumda yoğun olarak bulunmaktadır. Yapılan bazı araştırmalarla Glokom hastalığı tedavisinde gözdeki *hCA* II izoenziminin önemi ortaya çıkarılmıştır. Yüksek göz içi basıncından kaynaklanan glokom hastalığı, (intraocular pressure, IOP) ve geri dönüşümü olmayan körlüğe yol açmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Karbonik anhidraz enziminin humor aközün salgılanmasının uyarılmasında etkilidir. Bu enzimin inhibisyonu ile silyer epitelinin salgı aktivitesi %25–30 oranında azaltılabilmektedir (Renzi ve ark., 2000).

Düşük aktiviteli bir enzim olan *hCA* III' ün turnover sayısı 8x10³ s⁻¹'dir. Diğer *hCA* izoenzimleri ile kıyaslandığında, sülfonamidlerin inhibisyonundan daha az etkilenirler. Doku kılcalındaki CO₂'in difüzyonu kolaylaştırmada görev aldığı düşünülmektedir. Miktarca en fazla kasılma hızı yavaş olan kırmızı kas liflerinde bulunmaktadır. Yağ hücrelerinde de bu izoenzime fazlaca rastlanmaktadır. *hCA* I ve *hCA* II gibi *hCA* III'te *p*-

nitrofenil asetat hidrolizi aktivitesine sahiptir. Ayrıca, *hCA* III'ün fosfataz aktivitesi gösterildiği bildirilmiştir (Sly ve Hu, 1995).

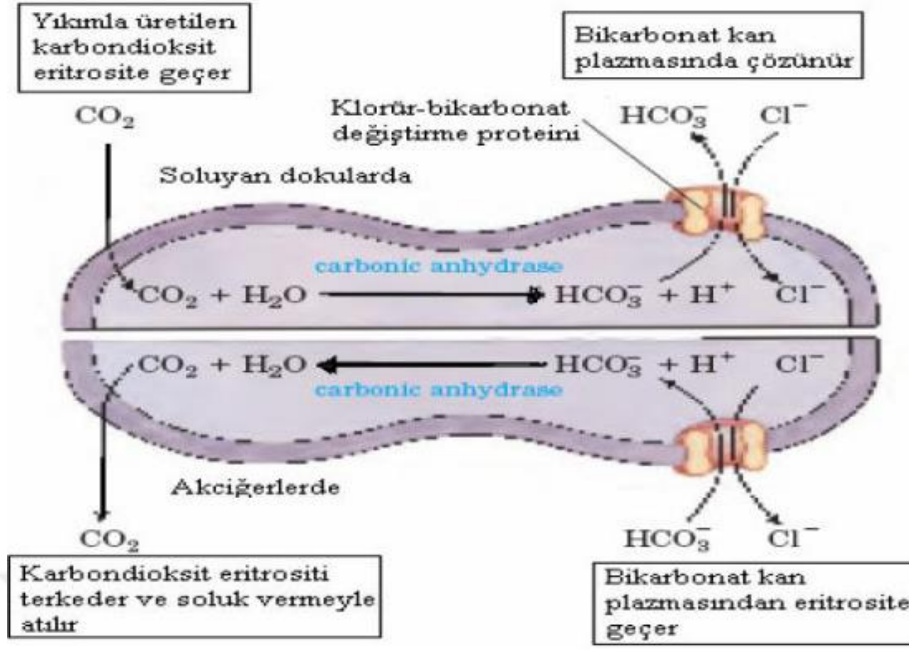
hCA izozimleri yönünden merkezi sinir sistemi de oldukça zengin bir dokudur. Merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerine yerleşmiş birçok hücrede *CA* izoenzimleri ekspres edilmektedir. *hCA* II koroid pleksus, oligodendrositlerde, miyelinlenmiş liflerde ve astrositlerde sentezlenmektedir. Ayrıca *hCA* III, IV, VA, VB, VII, VIII ve XIV izoenzimleri de beyin farklı bölgelerinde ekspres edilmektedir. Bu izoenzimler beyinde pH regülasyonu, sıvı ve iyon homeostasisi, beyin omurilik sıvısının sentezi, GABAerjik sinyalleşmenin düzenlenmesi gibi çeşitli fonksiyonların yerine getirilmesinde rol alırlar (Wang, 2009).

CA izoenzimlerinden *hCA* IV ve *hCA* VI sinyallerin hedef doku ve organlara iletimini sağlar. *hCA* IV membrana bağlıdır. Akciğerdeki ve diğer bazı organlardaki kılcal damarların endotel hücrelerinin plazma yüzeyinde ve ayrıca böbrek membranına bağlı bulunduğu gibi bazı epitel hücrelerinin membranına bağlı olarak bulunur (Hazen ve ark., 1996).

hCA V, bazı dokuların mitokondri boşluklarında bulunur. *hCA* V'in karbamoil fosfat sentetaz-I'e ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağlayarak ürogenez ve glukoneogenez de görev aldığı ileri sürülmüştür. Bu enzimin lipogenez ile ilgili de bir görev üstlendiği düşünülmektedir (Lakkis ve ark., 1996).

hCA VI izoenzimi tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir ve insan tükürüğünden izole edilmiştir. Tükürüğün pH düzenlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. *hCA* VII izoenzimi ise tükürükteki bikarbonatın salgılanmasında rol oynayabilir (Kisker ve ark., 1996).

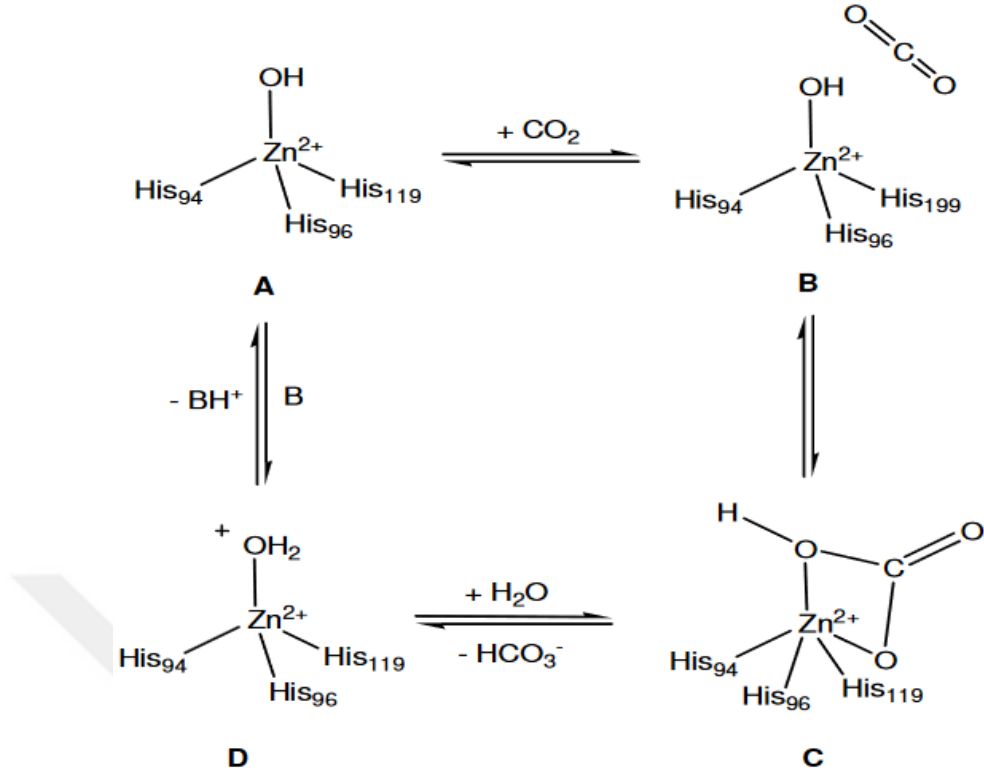
Biyolojik sistemlerde CO_2 ve HCO_3^- 'in birbirlerine tersinir olarak dönüşmeleri metabolizma için hayati önem taşır (Armstrong ve ark., 1966). Hücre zarından geçişi kolay olan CO_2 'in tersine HCO_3^- yağ moleküllerinde tam olarak çözünmediğinden hücre zarından geçemez. Bu sebeple gerekli durumlarda HCO_3^- 'in hücre içine geçişi ve CO_2 'nin de burada kalabilmesi için bu tepkime vuku bulmaktadır (Şekil 2.2) (Armstrong ve ark., 1966). Tepkimenin fizyolojik pH'da enzim olmadan vuku bulması uzun zaman alacakken *hCA*'nın katalizör etkisiyle reaksiyon çok daha kısa zamanda meydana gelmiştir (Armstrong ve ark., 1966).



Şekil 2. 7. Eritrosit Hücre Zarının Klorür-Bikarbonat Transferi

2.5.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Elli yıldan uzun süredir yürütülen çalışmalar bu konuyu aydınlatmaya çalışmıştır. Yürütülen bu çalışmalara göre CA enziminin metabolizma açısından hayati önem taşıdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca *in vitro* ortamda kararlı olması ve uygun koşullar altında aktivitesini koruyarak muhafaza edilebilmesi gibi üstün avantajları vardır (Pocker ve Janjic, 1989). Bu enzimin aktif bölgesinde bulundurduğu Zn (II) iyonu tepkime katalizinde vazgeçilmez öneme sahiptir. Yapılan X-ray kristallografisi deneyleri metal iyonun, aktif bölgede 15 Å⁰ derinliğindeki taban kısmında konumlandığını göstermiştir. Katalitik yönden aktif enzim; hidroksitin çinkoya bağlanmış halde bulunduğu genel formdur. Bikarbonat iyonunun oluşması için bu kuvvetli nükleofil CO₂ molekülüyle etkileşir. Oluşan bu bikarbonat iyonu sonraki adımda su molekülü ile karşılıklı yer değiştirmek suretiyle çözeltiye geçer. Böylelikle su molekülü Zn⁺² iyonu ile bağ kurar. Enzimin asit formuna bu şekilde yol açılır. Bu form katalitik aktivite bakımından inaktiftir. Yeniden katalitik aktif temel formunu meydana getirmek için aktif olan bölgeden etrafına proton geçişi olur (Stams ve ark., 1998).



Şekil 2. 8. CA'nın Katalizlediği CO₂-Hidratasyon Tepkimesi Mekanizmasının Görseli.

2.5.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

Karbonik anhidraz izozimlerinin görevlerinden olan bikarbonatın dehidratasyonu ile esterlerin hidrolizi yanı sıra CO₂'nin hidratasyonunu da belirler. Bu reaksiyonlar çerçevesinde ya Karbondioksit gazı harcanır ya da oluşur. Reaksiyon aşağıda gösterilmiştir.



Bu tepkimelerle meydana gelen ya da harcanan CO₂ gazının, manometrik metotlarla tanısı yapılabilir. Ancak manometrik yöntemin, tepkime pH'sının değişkenlik göstermesi, CO₂'in suda çözünümlünün zayıf olması gibi dezavantajları vardır. Bunun yanı sıra ortam H⁺ oranı düşmekte veya çoğalmaktadır (Karthikeyan ve ark., 2006). Alternatif olarak, tepkime ortamının H⁺ oranının değişmesi için geçen zaman potansiyometrik olarak inhibitörle tespit edilebilir. Fakat metodun uygulamasının kısa zamanlı olması avantaj olsa da, pH'nın değişken olması, suda CO₂'in zayıf çözünmesi ve indikatörün inhibisyon kabiliyeti olumsuzluklara yol açabilmektedir. Bu olumsuz durumları en az seviyeye düşürmek için spektrofotometrik metotlar kullanılarak katalitik aktivite ölçümü yapılmaktadır

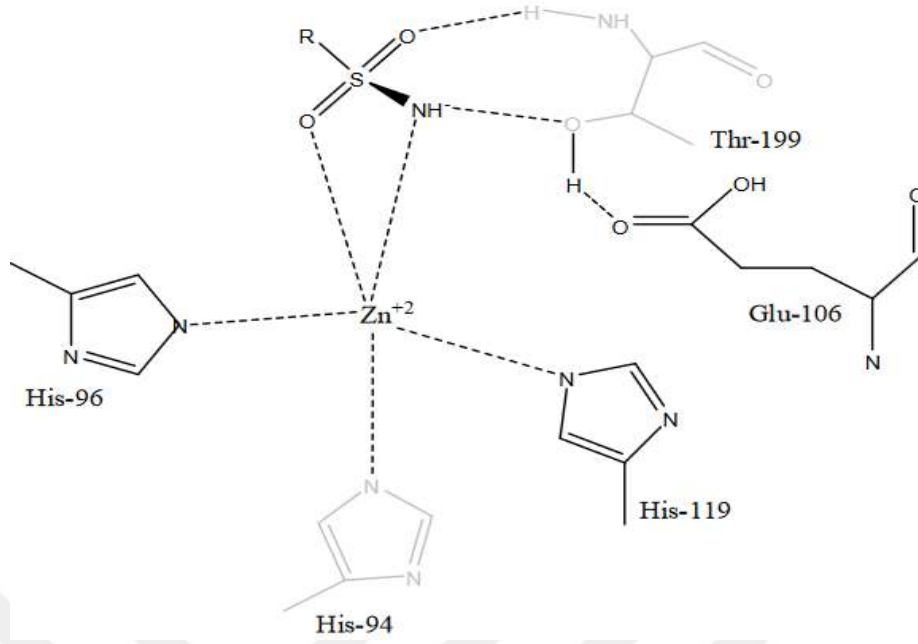
(Karthikeyan ve ark., 2006). Aktivite ölçümü için genel olarak Wilbur – Anderson yöntemi kullanılmaktadır. Bu metotta genel prensip olarak CO₂ gazının hidratasyonu sırasında pH'nın 8.2 den 6.3'e gelmesi için geçen zaman tespit edilmektedir (Karthikeyan ve ark., 2006).

2.5.3. Karbonik Anhidraz Aktivatörleri

Literatürde CA inhibitörleri üzerinde yapılmış olan birçok çalışma vardır, fakat CA aktivatörleri (CAA) ile ilgili yapılan çalışmalar nispeten daha az sayıdadır. Son yıllarda yürütülen çalışmalarla beraber kinetik ölçümler, X-ışını kristalografisi ve elektronik spektroskopi yardımıyla, aktivatörlerin, CA aktif bölge boşluğu içinde, inhibitör ya da substrat bağlanma bölgelerinden farklı bir yerde bağlandığı ortaya çıkarılmıştır (Alterio ve ark., 2012; Briganti ve ark., 1997; Supuran, 2008; Temperini ve ark., 2006). Biyojenik aminlerden serotonin, histamin, katekolaminler gibi amino asitler, oligopeptidler veya çoğu küçük proteinler, insan CA izoenzimlerinin birçoğunda aktivatör etki gösterirler (Briganti ve ark., 1997; Parkkila ve ark., 2006; Supuran ve Scozzafava, 1999; Temperini ve ark., 2006).

2.5.4. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA enzim grubunun izoformları, birçok farmasotik ajan için doğrudan hedeftir. Mesela diüretikler, antiglokoma ilaçlar, antitümör ilaçlar, antikonvülzanlar, obezite ilaçları gibi birçok ilaç bu izoenzimleri hedef alırlar. Bu amaç doğrultusunda *hCA I* inhibitörleri retina ve beyin ödeminin tedavisinde; *hCA II*, *hCA IV*, *hCA XII* ve *hCA XIV* inhibitörleri antiglokoma, diüretik ve antiepileptik hastalık belirtilerinde kullanılır (El-Azab ve ark., 2019; Lolak ve ark., 2018). *hCA VII* inhibitörü ise epilepsi karşıtı olarak kullanılır (El-Azab ve ark., 2019). *hCA IX* ve *hCA XII*, tümörle ilişkili enzimlerdir. Bunlara ek olarak son yapılan çalışmalar *hCA IV*, *hCA IX* ve *hCA XII* inhibitörlerinin iltahaplı romatizmaya karşı da kullanılabilirliğini göstermiştir (El-Azab ve ark., 2019).



Şekil 2. 9. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Mekanizması

2.5.5. Sülfonamidler

CA'nın en kuvvetli organik inhibitörleri aromatik veya heteroaromatik sülfonamidlerdir. Kimyasal yapısı $R-SO_2NH_2$ şeklindedir. Bu formüldeki R grubu, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemidir. Aromatik ve heteroaromatik sülfonamid grubu ve bunların biyoizosterleri (sülfamatlar ve sülfamidler), CA izoenzimlerinin birçoğuna karşı gösterdikleri yüksek ilgi sebebiyle CAI olarak uzun zamandan beri kullanılmaktadır (Lolak ve ark., 2018). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda CA'nın en güçlü inhibitörünün bu bileşikler olduğu gösterilmiştir (Akbaş, 2018). Klinik araştırmalarda veya doğrudan klinikte kullanılan sülfonamid ya da sülfamat grubundan birçok ilaç bulunmaktadır. Dorzolamid (DZA), Asetazolamid (AAZ), Brinzolamid (BRZ), Diklorofenamid (DCP) ve Ethoksozolamid (EZA) inhibitörleri diüretik yönden, glokom tedavisinde, ağrı kesici olarak, kanser karşıtı, epilepsi tedavisinde, obezite tedavisinde ve antibakteriyel olarak kullanılmaktadır (Supuran, 2010).

Primer sülfonamid türevi olan sülfanilamid, AAZ, EZA, metazolamid ve DCP klinikte yaklaşık 70 yıldır glokom tedavisinde kullanılmaktadır ve birinci jenerasyon CA inhibitörleri olarak tanınırlar (Lolak ve ark., 2018). Bu ilaçlar *h*CA II ve *h*CA IV enzimlerini inhibe ederek HCO_3^- oranını düşürür. Böylece aköz hümör salgısı %25-30 oranında azalır ve yükselmiş olan göz içi basıncı düşer. Fakat bu enzimlerin inhibisyonu gözden daha çok

diğer dokulardaki *hCA* enzimlerini etkilediğinden, yan etkileri de fazladır. AAZ ve DCP, gözdeki *hCA* izozimlerinden daha çok diğer organlardaki *hCA* izozimlerini inhibe ettiğinden, göze haricen uygulanmalıdır. Fakat suda çözünürlük probleminden dolayı etkili konsantrasyonları sağlanamamış ve damla haline getirilememiştir (Akbaş, 2018).

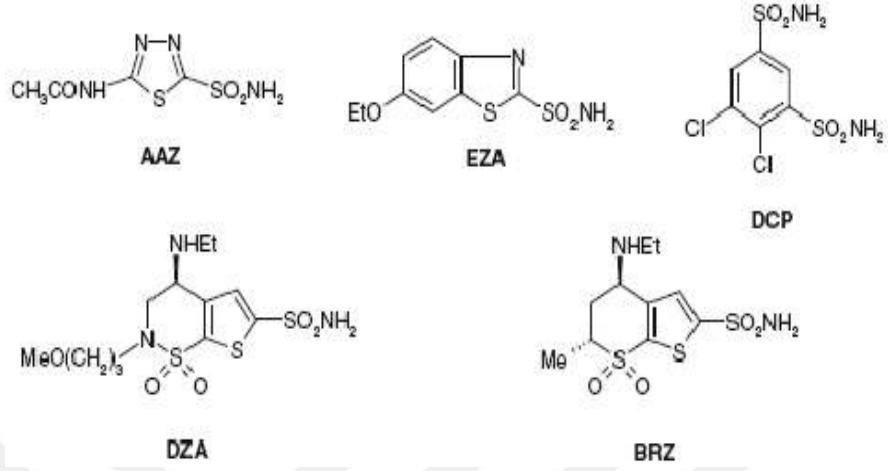
CA izoenzimlerini inhibe etmeden yüksek göz basıncını düşüren ilaçlara ihtiyaç duyulmuş ve lokal olarak uygulanılabilecek formda DZA sentezlenmiş ve 1995 yılında klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Sonrasında ise DZA ilacının analogu olan BRZ sentezlenmiştir klinikte kullanımı ise 1999 yılında olmuştur (Akbaş, 2018). Bölgesel uygulanabilme özellikleri sebebiyle yan etki oluşturma durumu bakımından ilk kuşak sülfonamidlere göre daha iyi olan DZA ve BRZ, ikinci nesil *hCA* inhibitörü antiglokoma ilaçlar olarak literatüre geçmiştir (Nocentini ve ark., 2016).

hCA izozimleri yönünden merkezi sinir sistemi de oldukça zengin bir dokudur. Merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerine yerleşmiş birçok hücrede *hCA* izoenzimleri ekspres edilmektedir. *hCA* II koroid pleksus, oligodendrositlerde, miyelinlenmiş liflerde ve astrositlerde sentezlenmektedir. Ayrıca *hCA* III, IV, VA, VB, VII, VIII ve XIV izoenzimleri de beynin farklı bölgelerinde ekspres edilmektedir.

Bu izoenzimler beyinde pH düzenlenmesi, sıvı ve iyon oranının dengede olması, BOS sentezlenmesi, GABA'nerjik iletimin regüle edilmesi gibi birçok işlevin hedefe ulaşmasında rol alırlar. Bahsedilen roller dikkate alındığında *hCA* inhibitörleri antiiepileptik ilaçlar olarak sunulmaktadır. Bu amaçla AAZ 1953 yılında ilk olarak kullanıma başlanmıştır. Ayrıca AAZ ve methazolamid birbirinden ayrı olarak veya kombine edilmiş halde epilepsi karşıtı ilaçlar olarak da kullanılmışlardır. Bunlara ek olarak sulthiame, zonsamid ve topiramamat vb. epilepsi karşıtı ilaçlar *hCA*'yı inhibe etmektedir (Wang, 2009).

Birinci ve ikinci grup jenerasyondaki sülfonamidlerin en önemli dezavantajı, hedef izozimlere karşı bir ayırım yapamadan ilacın, organizmadaki tüm *hCA* enzimi izoformlarında inhibisyon oluşturmaya buna bağlı olarak da istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkmasıdır. Bu olumsuz durumun ortadan kaldırılması için araştırmacılar yan etkilerin en aza indirilmesi amacı ile izoenzimlerin yapısal farklılıklarını değerlendirerek ilgili izozimi seçerek inhibe edecek yeni CA inhibitörleri için ar-ge çalışmalarına yoğunlaşmıştır (Lolak ve ark., 2018). Kullanıma ilk başlanan CA inhibitörü sülfonamidlerden sonra çeşitli farmakolojik grupları

bulunduran CA inhibitörleri geliştirilmiştir ancak çinkoyu bağlayan sülfonamid farmakoforu bulunduran bileşikler, hala en kuvvetli inhibitörlerdir (Carta ve ark., 2014).



Şekil 2. 10. Klinikte Kullanılan Bazı Sülfonamidlerin Kimyasal Formülleri

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Ekipmanlar

Çalışmalarımız Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı ve Erzincan Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş olup aşağıda marka ve model bilgileri belirtilen alet ve cihazlar kullanılmıştır. Kullanılan cihazların kalibrasyon ve kontrol takipleri sürekli olarak yapılmaktadır. Ayrıca çalışmalarımız öncesi cihazlarda güven aralığı kontrolleri yapılarak oluşabilecek hatalar en aza indirilmeye çalışılmıştır.

Peristaltik Pompa	Ismatec
Soğutmalı Santrifüj	Hermle Z 323 K
Manyetik Karıştırıcı	Velp Sicientifica
Elektroforez Sistemi	Bio-Rad
Buzdolabı (+4 °C)	Siemens Derin Dondurucu
Dondurucu (-20°C)	Sanyo Medical Freezer, Uğur
UV Spektrofotometre	Hach&Lange DR 5000
Vorteks	Elektro Mag M16
pH Metre	Hanna İnturment HI2211
Otomatik Pipetler	Brand & Socorex
Hassas Terazî	Sartorius CP2245
Manyetik Karıştırıcı	Velp Sicientifica

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Enzimin Saflaştırılması ve Aktivite Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltiler

1. Afinite Tamponu (Sephrose-4B için kullanılan): 0,1 M tampon (sodyum bikarbonat) çözeltisi 8.4 gram sodyum bikarbonat hassasiyetle tartıldı 475 mL saf su içerisinde çözündürülerek pH 8.8 e ayarlanarak son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

2. Dengeleme Tamponu (Anfinite jelini dengelemek için kullanılan tampon): Tris-HCl (0.025 M) + Na₂SO₄ (0.1M) Tampon çözeltisi hazırlamak için Tris (3.0275 g) ve Na₂SO₄ (14.2 g) hassasiyetle tartıldı üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözüldü, ardından 1 N HCl kullanılarak pH 8.7 ayarlandı ve son hacim 1 L'e tamamlandı.

3. Yıkama Tamponu (Anfinite jelini yıkamak için kullanılan tampon): Hazırlanmasında Tris (3.0275 g, 25mmol) ve Na₂SO₄ (3.24g, 22 mmol)'katı kimyasalları hassasiyetle tartıldı üzerine 950 mL saf su eklendi ve çözündürme sonrası manyetik karıştırıcı üzerinde kuvvetli şekilde karıştırılarak 1 N hidroklorik asit yardımıyla pH seviyesi 8.7 ayarlandı ve hacim bir litreye tamamlandı.

4. Elüsyon tamponu-I (Afinite Kolonundan *h*CA I 'i elüe etmek için kullandığımız tampon: Na₂HPO₄ (2.2 g), NaCl (14.625 g) hassasiyetle tartılarak bir miktar saf suda çözüldü ardından Potansiyel Hidrojen (pH) 6,3 ayarlanarak toplam hacim distile suyla 250 mL ye ayarlandı.

5. Elüsyon tamponu-II (Afinite Kolonundan *h*CA II'yi almak için kullandığımız tampon: (CH₃COONa (0.1 M) - NaClO₄ (0.5 M)): Hassasiyetle tartımları yapılan Sodyum perklorattan (NaClO₄) 9.817g, ve Sodyum asetat (CH₃COONa.3H₂O) (2.04 g, ve 0.015 mol) üzerine 0.12 litre saf su eklenerek çözündürüldü ve akabinde pH 5.6 ya çekilerek son hacim 0.15 litreye ayarlandı.

6. Esteraz tamponu (Esteraz Aktivitesi için hazırlanan tampon (0.05 M Tris-SO₄): 6.055 g tartımı yapılan Tris üzerine 0.95 L saf su da cözündürüldü ve hemen akabinde 1 N Sülfürik Asit (H₂SO₄) çözeltisiyle pH ayarlaması 7.4 olarak yapılır son olarak saf su ile 1 litreye getirilir.

7.Substrat (3 mM p-nitrofenilasetat çözeltisi): 27.2 mg p-nitrofenilasetat hassasiyetle tartılarak 1ml aseton yardımı ile çözülür, bu karışım manyetik karıştırıcı üzerinde kuvvetle karıştırılan 49 ml saf suya yavaş olacak şekilde damla damla ilave edilir çözelti günlük olarak taze hazırlanmalıdır.

8. Stok İnhibitör çözeltileri; Deneylerde kullanılacak her maddeden 3 mg hassasiyetle tartılarak, üzerine 3 mL Dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilip vorteks yardımı ile çözündürmek suretiyle hazırlandı.

8. Protein tayini için hazırlanan çözelti: 0.1 g Brilliant Blue G 0.05L %90'lık Ethanoll'de çözündürülerek, %95'lik Fosforik asit (H_3PO_4) ilave edilip total hacim su ile 1000 mL ye getirildi.

3.2.2. Jel Elektroforezi (SDS-Poliakrilamid SDS-PAGE) için Kullanılan Çözeltiler

1. SDS-PAGE çözeltisi: 10 mL hacimli balon joje içerisine 0.55 mL 1 M Tris-HCl, 1 mL % 0.1'lik brom-timol mavisi, 1000 μ L pure gliserin ve 0.001 L %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) karışım haline getirilip, 10 mL'ye saf suyla tamamlanmak suretiyle hazırlandı. Son olarak hazırlanan tampona 50 μ L β -merkaptoetanol ilave edildi.

2. SDS-PAGE için yürütme tampon çözeltisi: Saf gliserolden 7.2 mL alınıp sonrasında 0.150 gram Tris 50 mL saf su içerisinde çözündürüldü, hemen ardından 0.005 L 0.01'lik SDS-PAGE ilave edilerek hazırlanan çözelti distile edilmiş saf su ile total hacim olan 0.5 L tamamlandı.

3. Elüsyon çözeltisi (Boyama İçin): 0.1 g olacak şekilde hassasiyetle tartımı yapılan Coomassie Brilliant Blue R-250, %10 (Asetik) CH_3COOH , %50 metanol ardından %40 saf destile su (H_2O) ilave edilerek uygun miktarda hazır hale getirildi.

4. Akrilamid--bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: 30 mg akrilamid ile 8 mg bis-akrilamid 100 mL saf suyla çözündürülerek hazır hale getirildi.

5. SDS (%10'luk) hazırlama aşamaları: 10 μ g SDS, 990 μ L destile edilmiş saf suda çözülerek hazırlandı.

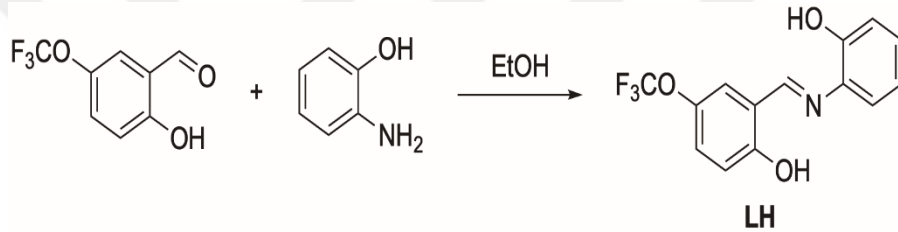
6. pH 8.8'lik 3 M'lık Tris-HCl çözeltisi: 3630 mg Tris, 0.048 L bir 1 Molarlık hidroklorik Asit (HCl) ile çözülerek son hacim 100 mililitreye getirildi.

7. Yıkama Çözeltisi (Jel yıkama için kullanılan): Toplam hacim 100 mililitre olacak şekilde %10 asetik asit (CH_3COOH), %40 distile su, %50 Metanol çözelti haline getirilir.

3.2.3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin Sentezi

Ligand sentezlenmesi

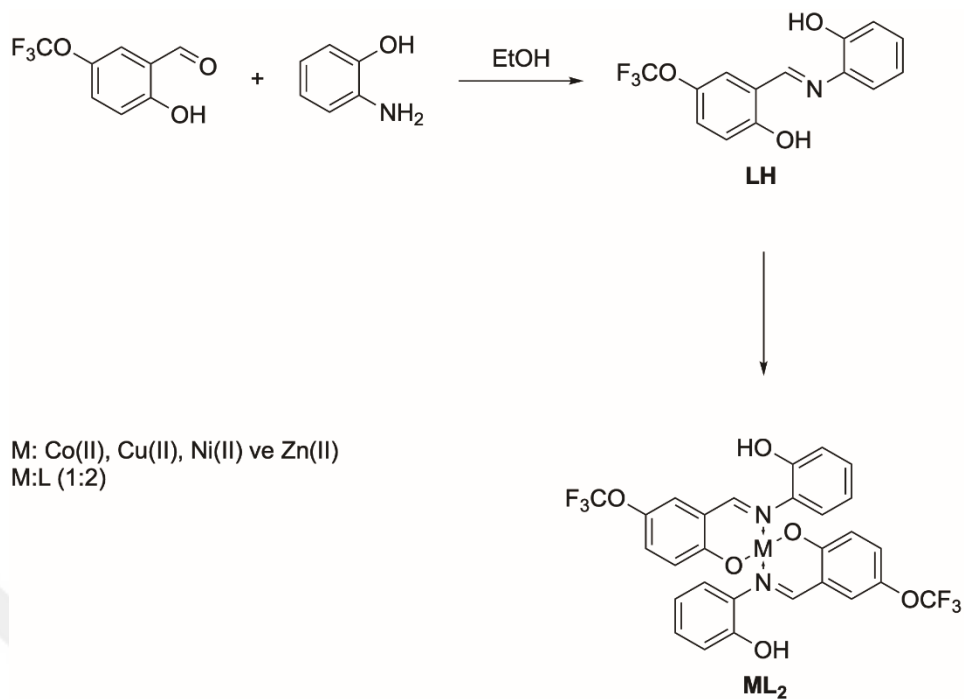
5-Trifluorometoksisalisilaldehit (2.06 g, 10 mmol), 20 millilitre etanoş de çözündürülerek sentezleme cihazınının 100 mL'lik balonuna aktarıldı ardından 20 mL etanolde çözündürülmüş vaziyette olan *o*-aminofenol (1.09 g, 10 mmol) ve (0.01 g) *p*-toluen sülfonik asit damla damla yavaş şekilde bu çözeltiye ilave edildi. Tepkimeye 60 derece sıcaklıkta 4 saat süreyle devam edildi. FT-IR spektrometresinde karbonil piki takip edilerek tepkimenin tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi. Sentezleme işlemi tamamlanan ürün bir süre dinlenmeye bırakıldıktan sonra, sıcak distile su, etanol ve dietil eter kullanılarak yıkandı, kuruması için vakum uygulaması yapıldı (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).



Şekil 3. 1. Ligandın Sentez Mekanizması

Metal komplekslerinin sentezi

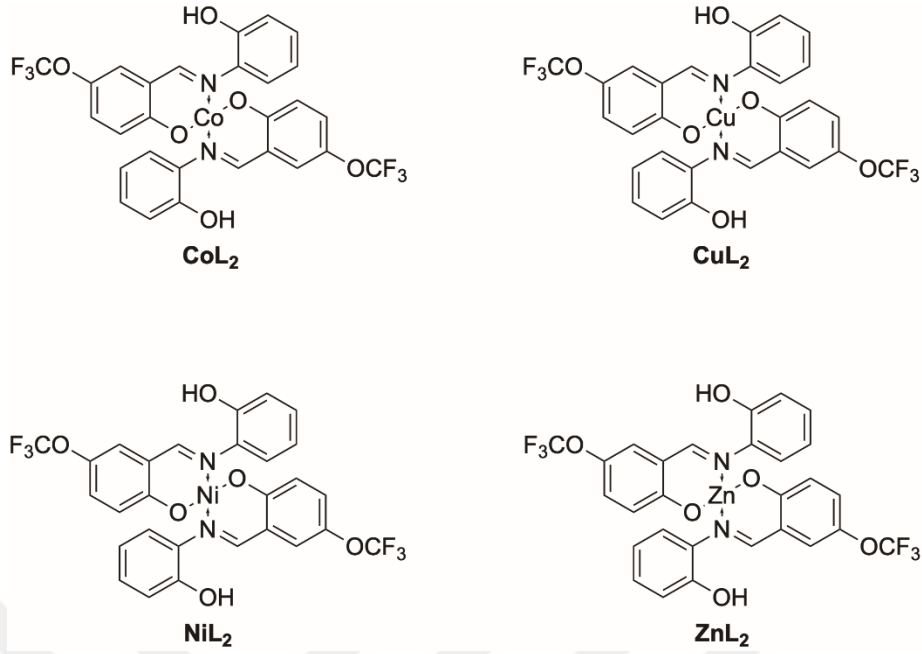
Sentezlenen LH ligandı (0.594 g, 1.00 mmol), 10 mililitre mutlak etanolde çözündürülerek sentez cihazındaki 50 mL'lik cambalona eklendi sonrasında bu çözeltiye 10 mL mutlak etanol içerisinde metal asetatları [kobalt (II) asetat tetrahidrat (0.125 g, 0.50 mmol), nikel (II) asetat tetrahidrat (0.124 g, 0.50 mmol), bakır (II) asetat monohidrat (0.10 g, 0.50 mmol), çinko (II) asetat dihidrat (0.110 g, 0.50 mmol), kadmiyum (II) asetat dihidrat (0.133 g, 0.50 mmol), uranil asetat dihidrat (0.212 g, 0.50 mmol)] damlatma hunisiyle damla damla karıştırıldı. Reaksiyon 50-60 °C'de 2-4 saatte gerçekleştirildi. Sentezlenen ürünler dinlendirildikten sonra sıcak saf su, etil alkol ve dietil eter ile yıkandı, vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).



Şekil 3. 2. Metal Komplekslerinin Sentez Mekanizması

Tablo 3.1. LH Ligandı ve Metal Komplekslerinin Analitik ve Fiziksel Verileri

Bileşik	Formül	M.A. (g/mol)	Renk	Erime Noktası (°C)	μ_{eff}	Verim (%)
LH	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{NO}_3\text{F}_3$	297.232	Koyu Sarı	106-108	-	72.00
CoL ₂	$\text{CoC}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_6$	651.381	Kahverengi	> 300	4.26	56.00
CuL ₂	$\text{CuC}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_6$	655.994	Koyu Yeşil	> 300	1.82	61.00
NiL ₂	$\text{NiC}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_6$	651.141	Açık Yeşil	> 300	2.53	49.00
ZnL ₂	$\text{ZnC}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{F}_6$	657.838	Açık Sarı	> 300	Dia.	64.00



Şekil 3. 3. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksleri

3.2.3. Sepharose-4B-L-Tirozin- sülfonamid Afinite Jelinin Hazırlanması

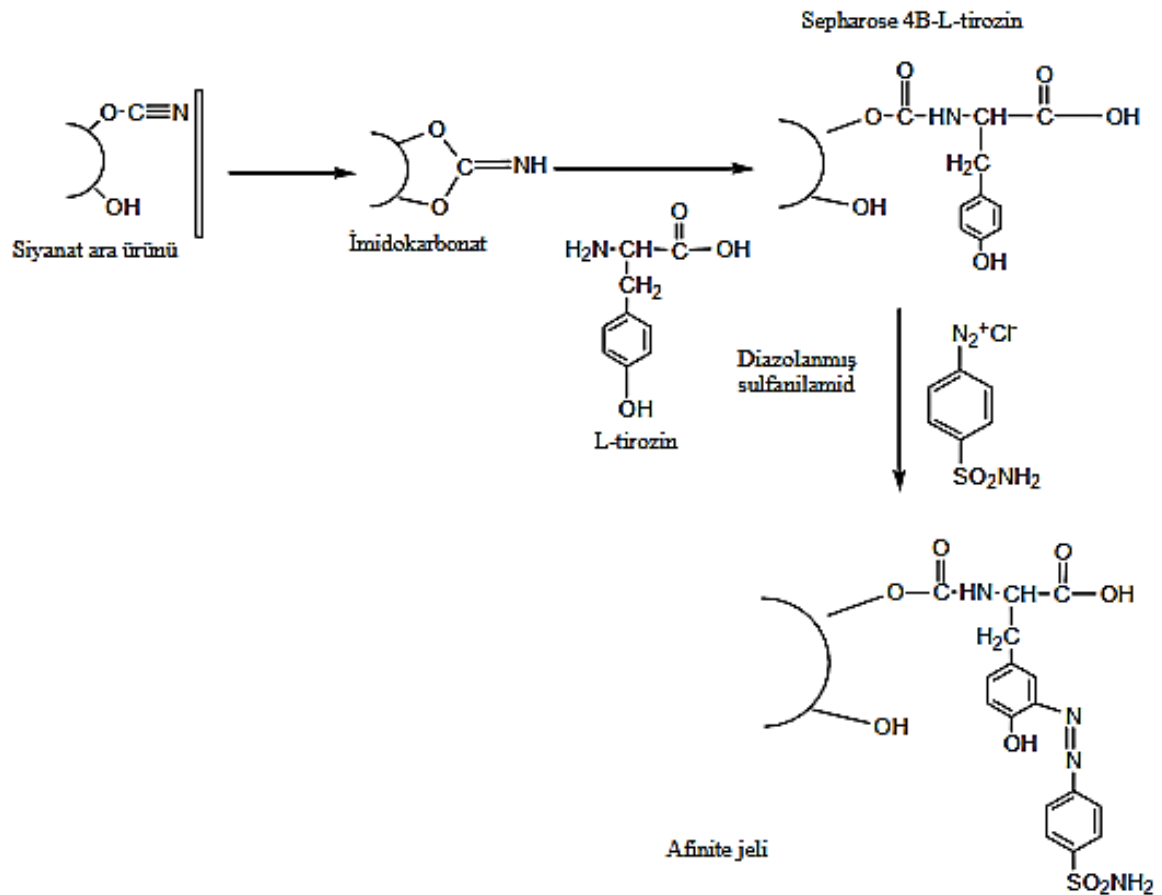
Kullandığımız afinite jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B bileşiğine kovalent olarak tirozin'in bağlanması ve sonrasında tirozine sülfanilamid diazonyum tuzunun kenetlendirilmesiyle oluşturuldu (Kohn ve Wilchek, 1978).

Aktive Edilmiş sepharose-4B üzerine tirozin bağlanması

Aktive edilme işlemi için 7.5 g CNBr kullanılan Sepharose-4B, pH'sı 10'a ayarlanmış ve içerisinde 80 miligram tirozin bulunan NaHCO_3 tamponuna ilave edildi. Bir manyetik karıştırıcı yardımıyla yarım saat süreyle $+4^\circ\text{C}$ de sürekli olarak karıştırıldı. Ardından yine aynı tampon çözeltisi ile 250 mililitre olacak şekilde seyreltildi, karıştırmaya 120 dakika boyunca devam edildi. Karıştırma süresi sonunda 16 saat boyunca $+4^\circ\text{C}$ dinlendirildi. Daha sonra yıkama işlemine geçildi, yıkama suyunda yapılan 280 nm dalga boyundaki spektrofotometrik ölçümde herhangi bir absorbans vermeyinceye kadar yıkamaya devam edildi ve bir kez de pH 8.8 olan 100 mL 0.2 Mol NaHCO_3 tampon çözeltisi kullanılarak yıkandı. Hemen arkasından tirozin bulunan jel, tampon çözeltinin 40 mL'lik kısmına taşındı (Ozensoy ve ark., 2004)

Sülfanilamid kenetlendirilmesi

Donma noktasındaki sıcaklıkta olan 10 mL 1 M HCl ile 25 mg sülfanilamid eklenerek çözündürüldü. Başka bir kaptaki 0°C de 5 mL su içerisine 75 mg NaNO₂ bileşiği ilave edilerek sıcaklık 5 dereceyi geçmeyecek şekilde çözündürüldü ardından ilk olarak hazırlanan sülfanilamid çözeltisine yavaş yavaş olacak şekilde damla damla eklenir, bir önceki işlem aşamalarına göre hazırlamış olduğumuz 40 mL hacmindeki Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna diazolanmış olan sülfanilamid eklenerek potansiyel hidrojen 9.5 seviyesine ayarlandı. pH ayarı sonrası oda şartlarında yavaş ayarda 3 saat karıştırma işlemine tabi tutuldu. Karıştırma işlemi akabinde 1000 mL saf su ile yıkama yapılarak tampon içerisinde bekletildi (Cuatrecasas, 1970).



Şekil 3. 4. Sefaroz 4B-L-Tirozin Afinite Jelinin Hazırlanma Adımlarının Şematik Gösterimi

Afinite kolonunun paketlenmesi

Yukarıda anlatılan şekilde hassasiyetle kullanıma hazır hale getirilen afinite jeli, dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH=7.8) içerisine alınarak süspanse olması sağlanır. Havasını almak için su trombundan faydalanılır hafif düzeydeki vakum ile bulunan hava kabarcıkları giderilir. Sonrasında jel, 10x150 mm'lik kapalı sistem kolona doldurulmak suretiyle paketlenme işlemi tamamlanır. Kolon içerisine doldurulan jelin çökmesi gerçekleştikten sonra peristaltik pompa bağlanarak dengeleme çözeltisi ile yıkama yapılır. Bu işlem dengeleme işlemi olarak adlandırılır dengeleme işleminde başarının takibi tampon çözelti ve elüat arasındaki pH farklarının eşitlenmesi ayrıca 280 nm'de absorbanlarının eşitlenmesinin gözlenmesi ile yapılır.

3.2.4. Deneyde Kullanılan İnsan Kanının Temini ve Hemolizatın Hazırlanması

İnsan kan örneği Erzincan Özel Neon Hastanesi laboratuvarından temin edilerek +4 °C de muhafaza edildi, muhafaza süresi 48 saati geçmeyecek şekilde kullanılmak üzere zamanlama planlandı. Kan örnekleri santrifüj tüplerine aktararak 2500 rpm ile 15 dakika santrifüj işlemine tabii tutuldu. İşlem sonrası tüplerin üst kısmındaki plazma pastör pipeti yardımı ile uzaklaştırıldı. Tüplerde Çökelti olarak kalan eritrosit kısmına %0.9'luk NaCl (serum fizyolojik) çözeltisi ilave edilerek aynı devir ve süre de santrifüjlemeye devam edildi. Bu işlem birkaç kez tekrarlanarak santrifüj sonrası üst kısım dikkatlice uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi sonrası kalan eritrosit çökeltisinin üzerine toplam hacminin yaklaşık 5 katı olacak şekilde buzlu saf su ilave edildi ve 15-20 dakika hemoliz işlemine karıştırmak suretiyle devam edildi. Hemolizasyon işlemi sonrası hemolizat içerisindeki hücre zarları ve diğer hücre bileşenlerini uzaklaştırmak için soğutmalı santrifüj kullanılarak +4 sıcaklık ayarlı ve 20.000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde süpernatant kısım dikkatlice alınarak azar azar katı tris ekleyerek potansiyel hidrojen değeri 8.7 ye ayarlandı. Bu işlemler sonucunda elde etmiş olduğumuz hemolizat afinite kolonuna tatbik edilmeye hazır hale getirilmiş oldu (Rickli ve ark., 1964).

3.2.5. Afinite Kolonuna Hemolizatın Tatbiki ve Enzimlerin Elüe Edilmesi İşlemi

Hassasiyetle takip edilen prosedür ile hazırlanan afinite jelinin paketlenmesi 1.5cm 2x50cm boyutundaki kolona doldurmak suretiyle yapıldı. Kolon dengeleme işlemi için dengeleme

tamponu olarak adlandırdığımız pH 8.7 olan 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na₂SO₄ çözeltisi kullanıldı. İnsan kanı kullanarak daha önceden elde ettiğimiz hemolizat dengelenme işlemi yapılmış kolona yüklendi. Peristaltik pompa çalıştırılarak süre ve geçiş miktarı ayarlandı. Hemolizatın kolondan geçmesinin ardından yıkama tamponu kullanılarak jel yıkandı. Bu işlem kolondan geçen yıkama tamponundaki absorbans değerini 0.05 okuyana kadar devam etti. Yıkama aşamasından sonra kolonda tutulmuş halde bulunan ve çalışmamızda kullandığımız hCA I ve hCA II izozimlerini kolondan almak için elüsyon işlemine geçildi. Elüsyon işleminde kolona sırası ile önce pH 6.3 25 mM Na₂HPO₄ / 1 M NaCl çözeltisi uygulanarak hCA I ve ardından pH değeri 5.6 olan 0.1 M CH₃COONa/0.5 M NaClO₄ çözeltisi uygulanarak hCA II ayrı ayrı 3 mL tüplere toplandı (Rickli ve ark., 1964).

3.2.6. Diyaliz (Tuzların uzaklaştırılması) İşlemi

Elüsyon işlemi sonrası ayrı ayrı tüplerde toplanan enzimler, çözelti ortamında bulunan tuzlardan ve diğer çözünebilir safsızlıklardan arındırmak için diyaliz işlemine tabii tutuldu. Bu işlemde elde ettiğimiz hCA I ve hCA II izozimlerini özel diyaliz torbalarına doldurarak +4°C de 24 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılır vaziyetteki tampon çözelti içerisinde bekletildi. Diyaliz tamponu 4 saatte bir yenisi ile değiştirilerek işlem yapılmıştır. Elde ettiğimiz enzim çözeltilerinden karakterizasyon ve spesifik aktivite deneyleri için örnekleme yapılmış kalan enzimler *in vitro* aktivasyon ve inhibisyon deneylerinde kullanılmak üzere 3 mL olacak şekilde isimlendirilmiş tüplere taksim edilerek -20°C de muhafazaya alınmıştır.

3.2.7. Protein Tayini

Kalitatif protein tayini

Kalitatif total proteinin belirlenmesi, prensip olarak proteinlerin yapısını teşekkül eden aromatik aminoasitlerden tirozin ile triptofan'ın 280 nanometrede en yüksek Abs değeri vermesini temel alır. Çalışmamızda afinite kolonu sonrası Warburg metodu olarak adlandırılan bu metot kullanılarak protein tayini gerçekleştirildi (Segel, 1975). İşlem adımları olarak, afinite kromatografisinden elüsyon sonrası ayrı tüplerde toplanan aynı hacimdeki numunelerde kuvars küvetler kullanılarak 280 nm de köre karşı okuma yapıldı. İşlemde kör olarak elüsyon tamponu kullanıldı.

Bradford yöntemi ile protein tayini

İnsan eritrositlerinden elde edilen hemolizatin, Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisinden geçirilerek yalıtılan enzim çözeltilerindeki protein miktarını bu yöntemi kullanarak saptadık. Uyguladığımız bu metot için Coomassie brilliant blue G-250 boyası kullanılır. Prensip olarak negatif yüklü olan bu boya pozitif yüklü olan protein ile bağ kurar ve proteinle bağlanan bu boya kırmızıdan maviye doğru bir renk değişimi gösterir. Kırmızı formdayken maksimum Abs 465 nm olan boyanın mavi renkteki maksimum Abs 595 nm olarak gözlenmektedir. Bu yöntemin kısa zamanda uygulanabilirliği, her çalışmada ayrı standart eğri çizimine gerek olmaması, hassasiyetinin 1 ile 100 mikrogram arasında olması boya ve proteinin oluşturduğu kompleksin çözeltide uzun süre korunması kantitatif diğer metotlara göre avantajlarındandır (Bradford, 1976).

Spektrofotometrik olarak yürüttüğümüz analiz metodunun uygulanması şu şekilde yapıldı, her bir mililitresinde 1mg protein içeren standart protein olarak sığır albümin standardı kullanıldı. Standart hazırlanması için 11 adet deney tüpüne 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl standart albümin alındı. Tüm tüpler distile su kullanılarak 100 mikrolitreye tamamlandı. Ardından her tüpe 5 mililitre *Coomassie Brilliant Blue* G-250 reaktif boya eklendi. Tüpler vortekslenerek karışımı sağlandı. Vorteks kullanılarak tüpler içerisindeki çözeltilerin karışması sağlandı ve protein-boya kompleksinin tam olarak sağlanabilmesi için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Eşit hacimli kuvars küvetler kullanılarak 595 nm de köre karşı okumalar alındı. Köre hazırlamada 100 mikrolitre saf su ve deneylerde kullanılan aynı miktarda boyama reaktifi karıştırıldı. Standart eğride Abs değerleri karşılığı olan µg protein değerleri hesap edildi.

3.2.8. Elde Edilen Enzim Saflığının SDS-PAGE Yöntemi ile Kontrolü

Çalışmamızda denemeye alacağımız enzimlerin karakterizasyonu ve saflığını belirlemek üzere Poliakrilamid jel elektroforezinden yararlanıldı. İşlemde kullanılacak yığma ve ayırma jeli hazırlandı. Ayırma jeli hazırlama adımları; Potansiyel hidrojen değeri 8.8 1.0 M yoğunluğunda, 3.75 mililitre TRIS-HCl tamponu ile 3.15 millilitre saf su, 100 µL %10'luk amonyum persülfat, %10'luk SDS den 100 µL, %40' lık akrilamidten 3.0 mL ile 6 µL TEMED bileşiği uygun ölçekli bir kaptaki karışım haline getirilerek hazırlandı. Elde ettiğimiz karışım şeffaf cam plakalara hava kabarcığı ya da boşluk oluşturmada dikkatli şekilde

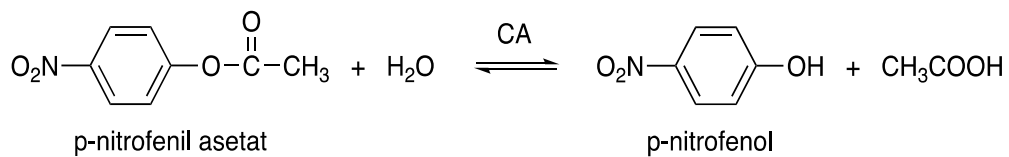
dolduruldu üzerine 1.0 mililitre 2-propanol ilave edildi. Oluşan jelin katı hale gelmesinden sonra propanol akıtılarak işlem sonlandırıldı. Yığma jeli hazırlanmasında; 6.8 pH değerindeki 1.0 M TRIS-HCl tamponundan 375 µL, distile sudan 2.33 mL %10 luk amonyum persülfattan 30 µL %10 luk SDS'den 30 µL, %40 lık akrilamidten 281 µL ve 5 µL TEMED'ten bir kapta karıştırılarak meydana getirildi. Elde edilen bu karışım hassasiyetle ilk olarak doldurduğumuz ayırma jelinin üzerine ilave edildi. Sonrasında SDS-PAGE targaı dikkatlice yerleştirilip sabitlemesi yapıldı. Yığma jelinde katılaşması tamamlandıktan sonra tarak hassasiyetle jele zarar vermeden çıkarıldı. Oluşan yükleme kuyucuklarına her numuneden 30 µL kuyucuklara aktarıldı. Yükleme öncesi protein yani enzim numuneleri denatüre edildi. 12.000 rpm de 15 sn süreyle santrifüjlendi. Yürütme işlemine 120 dakika boyunca devam edildi. Ardından jel boyama çözeltisine alındı 120 dakika çalkalama işlemi uygulandı. Jel şeffaf görünümüne ulaşana kadar yıkamaya tabi tutuldu son adım olarak oluşan bantlar gözlemlendi (Laemmli, 1970).

3.2.9. Karbonik Anhidraz Enzimi Aktivitesi Tayini

Karbonik andiraz izozimlerinin aktivitesi, in vitro şartlarda kararlı bir şekilde iki farklı metot kullanılarak tespit edilebilir. Bu metotlarda CA izozimlerinin CO₂ hidratasyonu özelliğinden ve esteraz özelliğinden faydalanılmaktadır. Tez çalışmalarımız kapsamında *hCA I* ve *hCA II* izozimlerinin aktivasyon durumunun tespitinde esteraz aktivitesinden faydalanılmıştır.

Esteraz aktivitesi tayini

Çalışmalarımızda da kullandığımız bu yöntem, karbonik anhidraz enziminin esteraz reaksiyonunu katalizleme özelliğine sahip olması esasını temel almaktadır. Esteraz aktivitesinin tayin edilmesi metodunun prensibi kısaca şu şekildedir; substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatın karbonik anhidraz enzimi kataliziyle *p*-nitrofenolat ya da *p*-nitrofenol'a hidroliz edilmesi ve bu reaksiyonun 348 nm'de absorbans vermesi durumunun tespitidir. Katalizlenen reaksiyonun mekanizması aşağıdaki gibidir:



Şekil 3. 5. Substrat Olarak Kullanılan *p*-nitrofenilasetat'ın *p*-nitrofenol'a Hidrolizi Reaksiyonu

Absorbans değeri olarak 348 nm’de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat’ın ikisi de aynı değere sahiptir. Dolayısı ile fenol grubundaki H⁺ iyonunun açığa çıkması ya da çıkmaması ölçüm değerlerini etkilememektedir (Armstrong ve ark, 1966; Verpoorte ve ark., 1967). Çalışmamızın yürütüldüğü dalga boyunda p-nitrofenilasetatın absorbans değeri çok düşük olduğu için, ölçümlerde kör olarak kullanılmaktadır. Deneylerimizde 1 ml’lik kuvarz küvetler kullanılmış, reaksiyon ortamına katılan maddeler ve miktarları sırası ile aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir.

Tablo 3.2. Aktivasyon Küveti İçeriği ve Miktarları

Stok Aktivite Çözeltileri	Kontrol Küveti Hacim (µl)	Numune Küveti Hacim (µl)
Tris-SO ₄ tamponu	400	400
p-Nitrofenilasetat	360	360
Distile Su	225	Değişken
Enzim çözeltisi	15	15
İnhibitör	0	Değişken

Yukarda gösterilen maddeler belirtilen miktarlarda ve sırada reaksiyon küvetinde karıştırılarak dalga boyu 348 nm ayarlı spektrofotometre de 25°C de 15 saniyede bir absorbans miktarı okunmuş ve 3 dakika sonundaki absorbans farkı alınarak hesaplamalar yapılmıştır.

$$EU/ml = \frac{\Delta OD}{\epsilon} \times \frac{V_T}{V_E} \times f$$

EU/ml : 1 ml’deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

ε : p-nitrofenol’ün molar ekstinksiyon katsayısı (5x10⁻³ M⁻¹cm⁻¹)

V_T : Toplam küvet hacmi (ml)

V_E : Enzim numunesinin hacmi (ml)

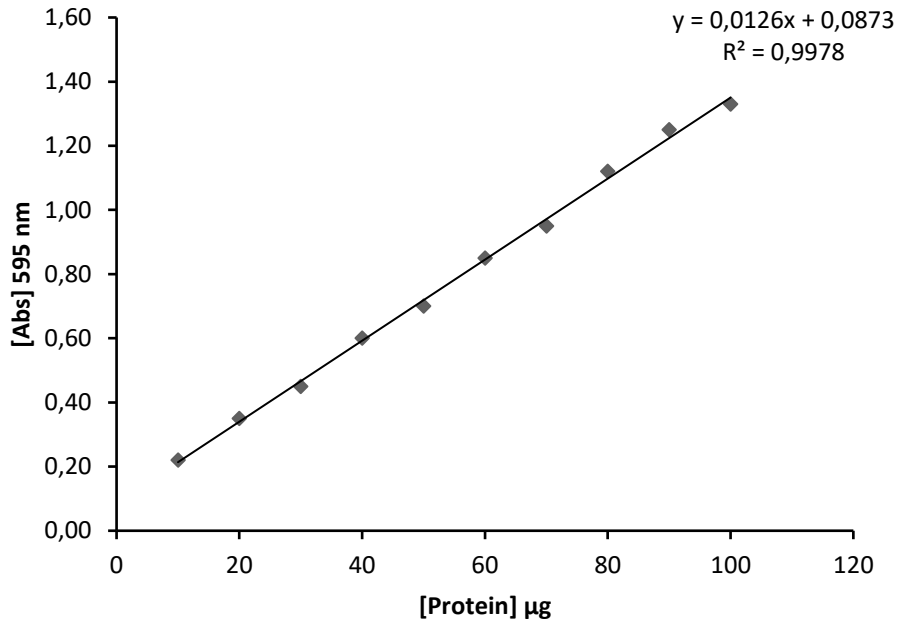
f : Seyreltme faktörü

4. BULGULAR

4.1. Kantitatif Protein Tayini ve hCA I ve II İzoenziminin Saflaştırılması Sonuçları

İnsan eritrositlerinden elde edilen hemolizatin, Sepharose 4B-L-tirozin sülfanilamid afinite kromatografisinden geçirilerek yalıtılan enzim çözeltilerindeki protein miktarını bu yöntem kullanılarak saptadık. Uyguladığımız bu metot için *Coomassie Brilliant Blue G-250* boyası kullanılır. Prensip olarak negatif yüklü olan bu boya pozitif yüklü olan protein ile bağ kurar ve proteinle bağlanan bu boya kırmızıdan maviye doğru bir renk değişimi gösterir. Kırmızı formdayken maksimum Abs 465 nm olan boyanın mavi renkteki maksimum Abs 595 nm olarak gözlenmektedir. Bu yöntemin kısa zamanda uygulanabilirliği, her çalışmada ayrı standart eğri çizimine gerek olmaması, hassasiyetinin 1 ile 100 mikrogram arasında olması boya ve proteinin oluşturduğu kompleksin çözeltide uzun süre korunması kantitatif diğer metotlara göre avantajlarındandır (Bradford, 1976).

Spektrofotometrik olarak yürüttüğümüz analiz metodunun uygulanması şu şekilde yapıldı, her bir mililitresinde 1mg protein içeren standart protein olarak sığır albümin standardı kullanıldı. Standart hazırlanması için 11 adet deney tüpüne 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl standart albümin alındı. Tüm tüpler distile su kullanılarak 100 mikrolitreye tamamlandı. Ardından her tüpe 5 millilitre Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktif boya eklendi. Tüpler vortekslenerek karışımı sağlandı. Vortex kullanılarak tüpler içerisindeki çözeltilerin karışması sağlandı ve protein-boya kompleksinin tam olarak sağlanabilmesi için oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Eşit hacimli kuvars küvetler kullanılarak 595 nm de köre karşı okumalar alındı. Kör hazırlamada 100 mikrolitre saf su ve deneylerde kullanılan aynı miktarda boyama reaktifi karıştırıldı. Standart eğride Abs değerleri karşılığı olan µg protein değerleri hesap edildi.



Şekil 4. 1. Bradford Yöntemi Standart Grafiği

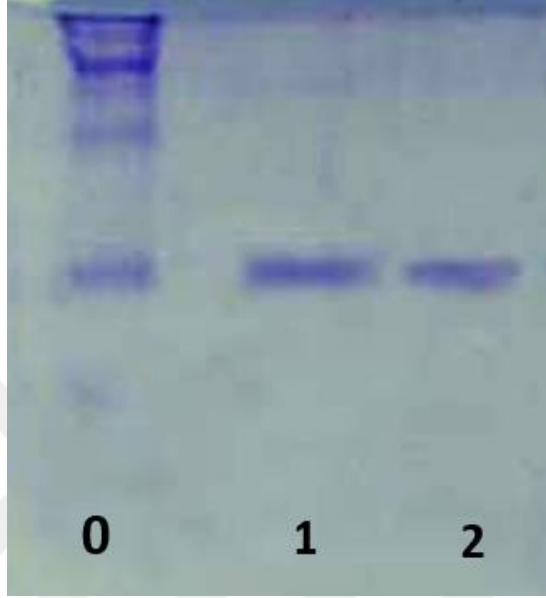
Daha sonra hemolizatin Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulanması sonucunda aktivite tayini yapılarak spesifik aktiviteler hesaplandı, saflaştırma oranları tespit edildi.

Tablo 4.1. *hCA* I ve II İzoenziminin Saflaştırılma Basamakları

Saflaştırma Basamakları	Aktivite (EU/ml)	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	133.3	100	5.58	558.3	13333.3	23.9	100.0	1.0
<i>hCA</i> I	406.7	15	4.01	60.2	6100.0	101.4	45.8	4.2
<i>hCA</i> II	666.7	8	4.01	32.1	5333.3	166.2	40.0	7.0

4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi Sonuçları

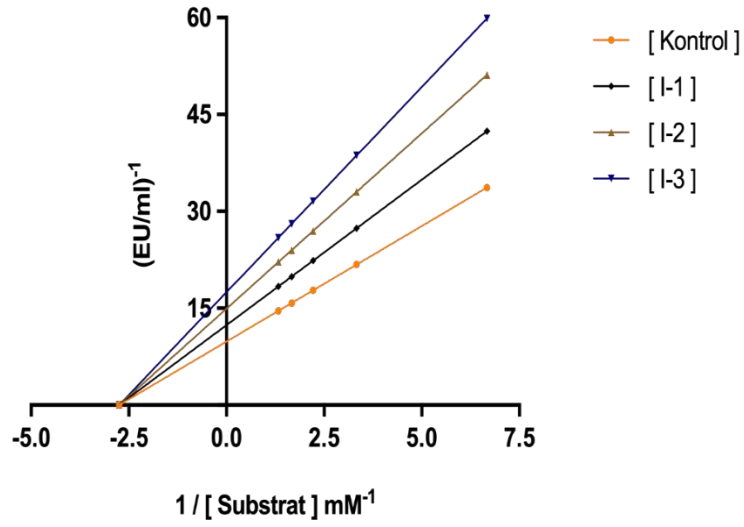
*h*CA izoenzimlerinin saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra (Laemmli, 1970) metoduna göre %3-8 kesikli SDS-PAGE yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi.



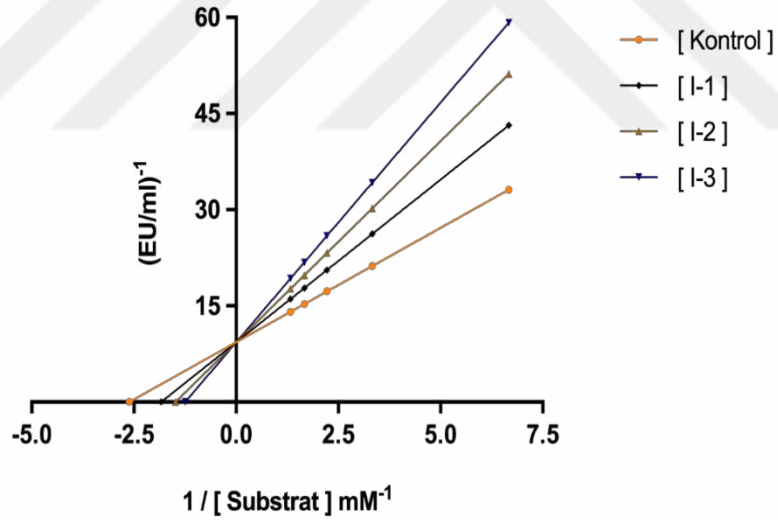
şekil 4. 2. SDS-PAGE Elektrofözezi Karakterizasyon Görseli (0: Standart 1: *h*CA I Enzimi, 2: *h*CA II Enzimi)

4.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Bazı Kimyasal Bileşiklerin Etkilerinin İncelenmesinin Sonuçları

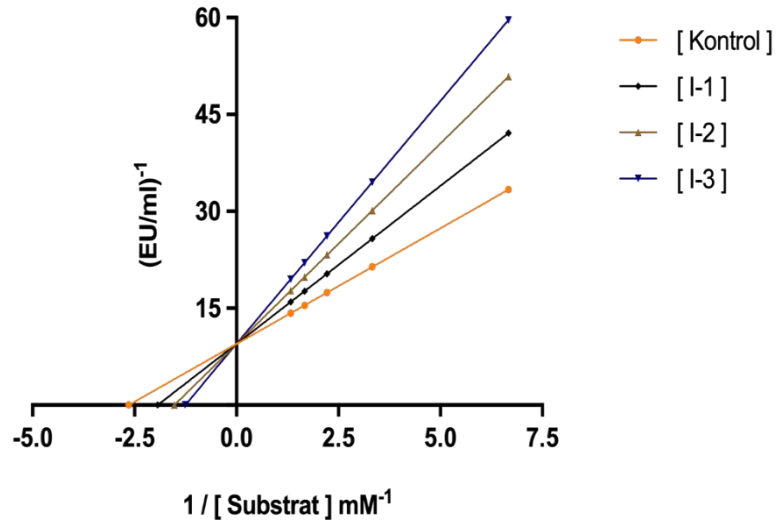
Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine yeni sentezlenen Schiff Bazı türevlerinin etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. İnhibisyon sabitlerini (K_I) tespit etmek amacıyla sabit üç uygun bileşik konsantrasyonu ve beş substrat konsantrasyonu belirlenerek aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen değerler yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_I sabitleri hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).



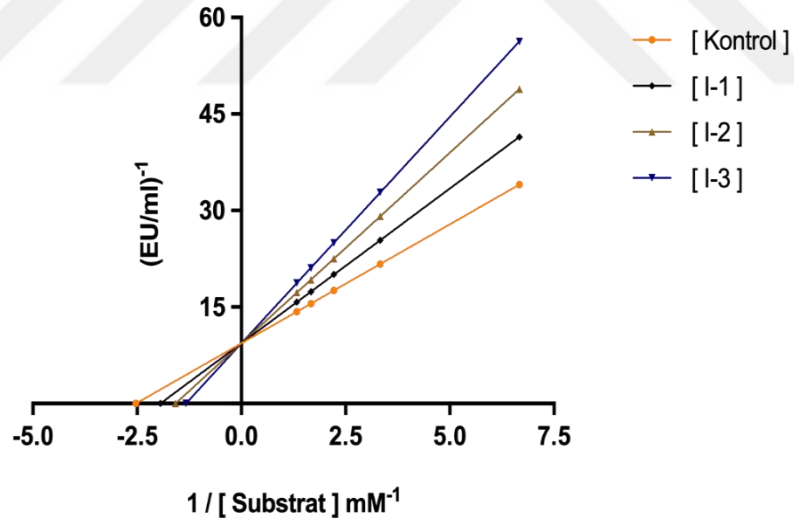
Şekil 4. 3.Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan LH Bileşiğinin *hCA I* İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



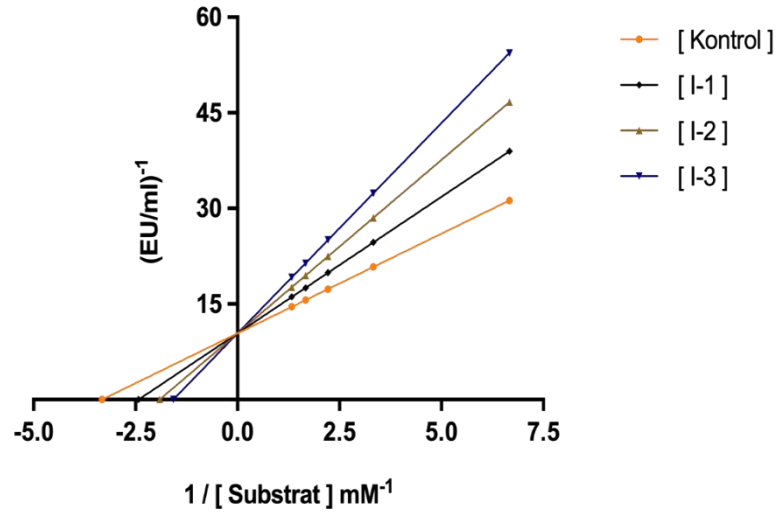
Şekil 4. 4.Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CoL₂ Bileşiğinin *hCA I* İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



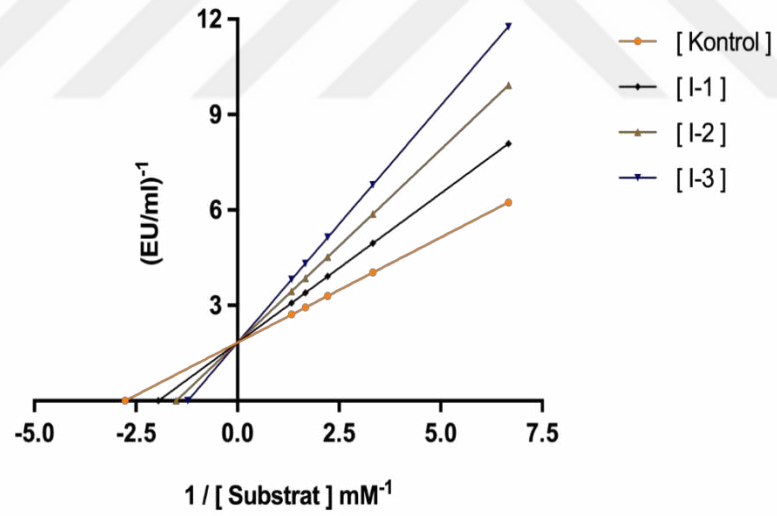
Şekil 4. 5. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CuL_2 Bileşiğinin $h\text{CA I}$ İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



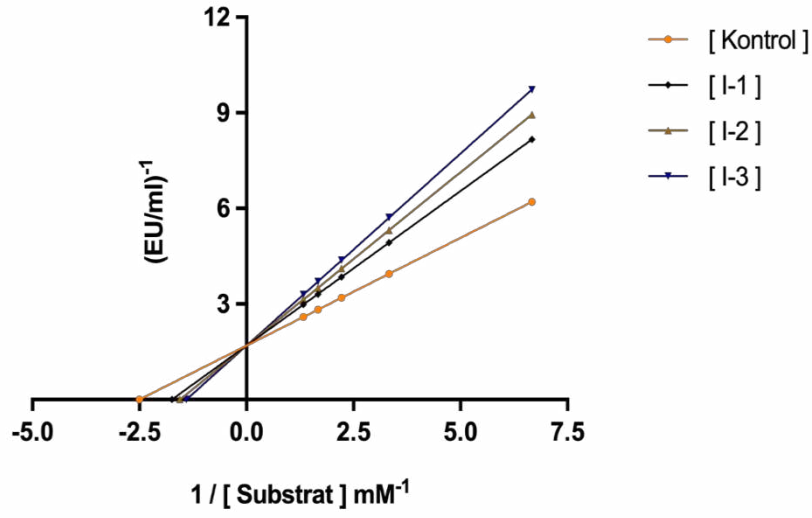
Şekil 4. 6. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan NiL_2 Bileşiğinin $h\text{CA I}$ İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



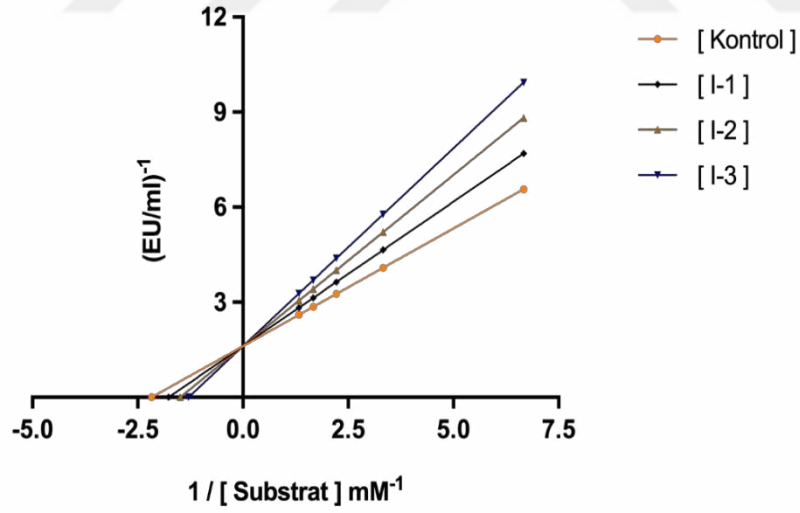
Şekil 4. 7.Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan ZnL_2 Bileşiğinin *hCA* I İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



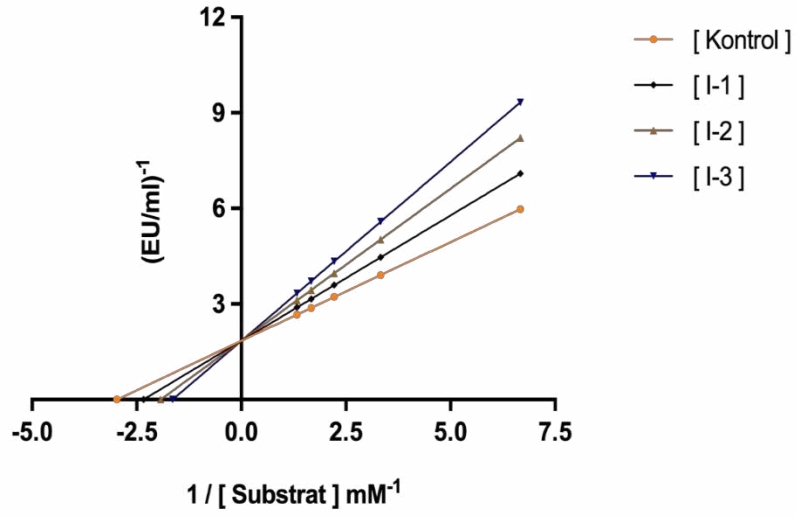
Şekil 4. 8.Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan LH Bileşiğinin *hCA* II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



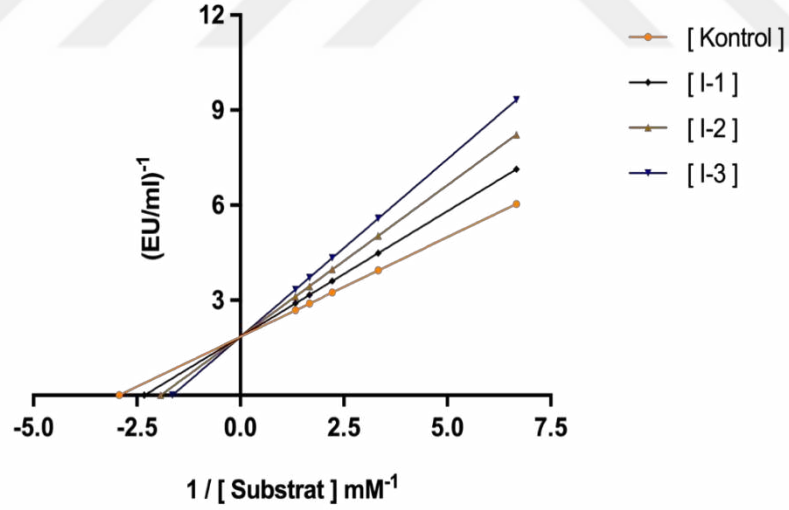
Şekil 4. 9. Yeni sentezlenen Schiff Bazı türevi olan CoL₂ bileşiğinin *h*CA II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve *K_I* Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4. 10. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan CuL₂ Bileşiğinin *h*CA II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve *K_I* Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4. 11 Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan NiL_2 Bileşiğinin *hCA* II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği



Şekil 4. 12. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevi Olan ZnL_2 Bileşiğinin *hCA* II İzoenzimi Aktivitesi Üzerine Etkisini Gösteren ve K_I Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği

Tablo 3.2. Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Türevlerinin IC₅₀ Değerleri ve K_I Sabitleri

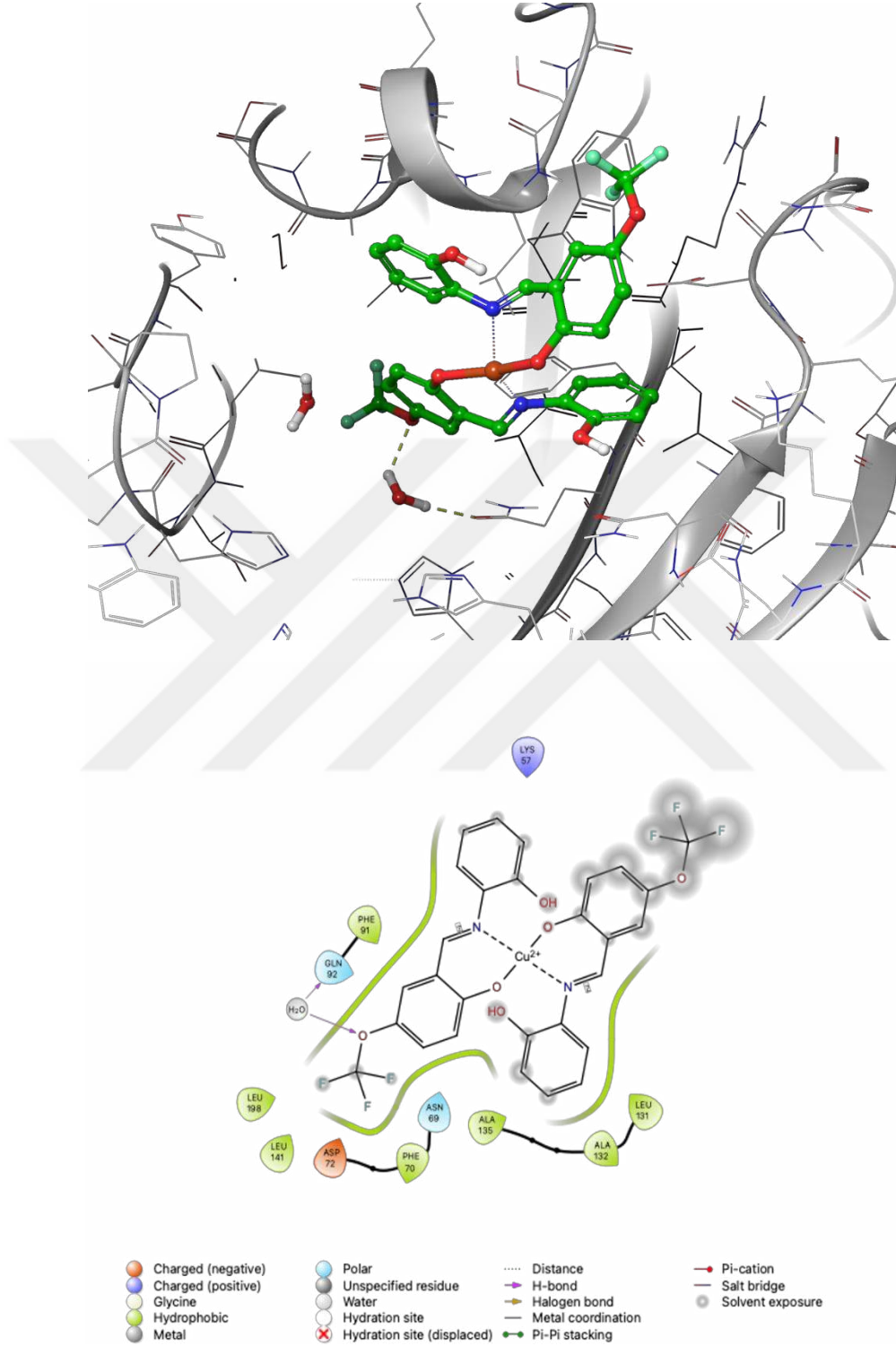
Molekül ID	hCA I					hCA II				
	IC ₅₀ (nM)	R ²	K _I (nM)	R ²	İnhibisyon tipi	IC ₅₀ (nM)	R ²	K _I (nM)	R ²	İnhibisyon tipi
LH	184.80 ± 3.28	0.9968	322.80 ± 18.98	0.9856	Yarışmasız	153.40 ± 2.221	0.9977	161.50 ± 15.87	0.9868	Yarışmalı
CoL ₂	61.54 ± 1.90	0.9905	90.29 ± 9.08	0.9870	Yarışmalı	51.45 ± 0.45	0.9987	88.52 ± 10.44	0.9851	Yarışmalı
CuL ₂	30.21 ± 0.52	0.9975	42.14 ± 4.47	0.9862	Yarışmalı	14.12 ± 1.15	0.9461	33.37 ± 3.84	0.9867	Yarışmalı
NiL ₂	65.63 ± 0.94	0.9980	101.70 ± 10.42	0.9881	Yarışmalı	48.29 ± 0.63	0.9984	85.33 ± 9.41	0.9875	Yarışmalı
ZnL ₂	43.11 ± 1.40	0.9919	61.68 ± 6.27	0.9873	Yarışmalı	29.33 ± 1.33	0.9848	58.80 ± 6.72	0.9870	Yarışmalı
AAZ ^a	223.90 ± 3.91	0.9988	461.60 ± 33.04	0.9871	Yarışmasız	139.70 ± 2.77	0.9950	229.00 ± 16.08	0.9875	Yarışmasız

^a Asetazolamid

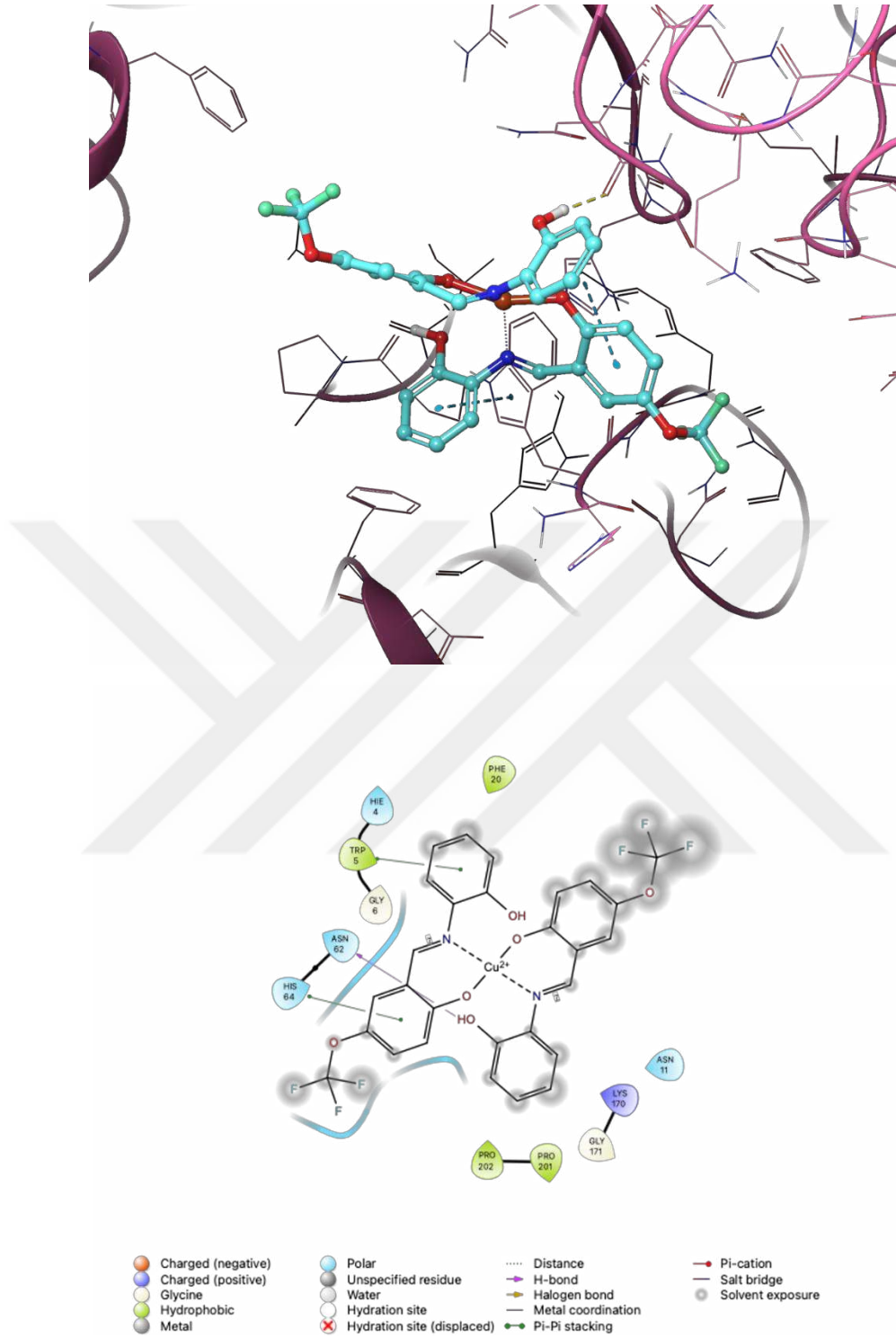
5.4. Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Moleküler yerleştirme çalışmalarının yardımıyla stabil bir kompleks oluşturmak için proteinlerin ve ligandların bağlanma bölgelerini tespit etmek mümkündür. Ayrıca, bu çalışmalar, potansiyel yapı-aktivite ilişkilerinin yanı sıra ligandların proteinlere bağlanırken benimsediği konformasyon ve yönelimlerin tahmin edilmesine izin vermektedir. Bu tez kapsamında, inhibitör özellikleri *in vitro* olarak incelenen moleküllerin hCA I ve II izoenzimlerine karşı etkileşimlerini aydınlatmak için moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmıştır. Moleküler yerleştirme simülasyonlarında (PDB ID: 1AZM ve 3HS4) kullanılan hCA izoenzimlerinin üç boyutlu yapıları, “RCSB Protein Data Bank” web sitesinden (<https://www.rcsb.org>) elde edilen “Small-Molecule Drug Discovery Suite 2023-4 (Schrödinger, LLC, NY, USA)” yazılımının “Protein Hazırlama Sihirbazı” modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Protein hazırlama aşaması sırasında, yalnızca enzimin aktif bölgesindeki su molekülleri tutuldu ve liganddan 5 Å'den daha uzakta olan su molekülleri, “OPLS4” kuvvet alanı kullanılarak yeniden optimize edildi. Bu proteinlerin yapısında birlikte kristalize olan asetazolamid molekülü bağlanma bölgelerinde tutulmuştur. Aynı yazılımın “Prime” modülü eksik hidrojen atomlarını tamamlamak için kullanılırken, amino asit kalıntılarının iyonizasyon ve tautomerik durumlarını belirlemek için “Epik” modülü kullanılmıştır. LigPrep” modülü yardımıyla pH 7.0 ± 2.0'deki olası iyonizasyon durumları,

totomerleri ve enantiyomerleri belirlenmiştir. Ligandların minimizasyonu için “OPLS4” kuvvet alanı parametreleri kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin iki boyutlu yapıları “ChemDraw 21 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA)” yazılımı kullanılarak çizildi. Kenetlenme öncesi “Receptor Grid Generation” modülü ile bağlanma bölgesinin haritası oluşturulmuş ve aynı yazılımın “Glide XP” algoritması kullanılarak ilk önce asetazolamidin daha sonra diğer ligandlar proteine kenetlenmiştir. *In vitro* koşullarda inhibisyon etkinliği en güçlü olan CuL₂ bileşiğinin moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirildi. CuL₂ bileşiği ile hCA I (Gln92) arasında 2.14 Å mesafede su molekülü aracılığıyla bir hidrojen bağı meydana gelirken, hCA II’nin Asn62 amino asit kalıntısı ile 1.99 Å mesafede bir hidrojen bağı ve ayrıca Trp5 ve His64 amino asit kalıntıları ile π etkileşimleri tespit edilmiştir (Şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4. 13. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen CuL₂ – hCA I (PDB ID: 1AZM) Etkileşim Diyagramı



Şekil 4. 14. Moleküler Kenetlenme Sonucunda Elde Edilen CuL₂ – hCA II (PDB ID: 3HS4) Etkileşim Diyagramı

5. TARTIŞMA

Karbonik anhidraz üzerinde inhibisyon ve aktivasyon etkisi olabilecek yeni sentezlenmiş maddeler ile yapılan çalışmalar hızla artış göstererek günümüzde popüleritesini korumaktadır. Bu sebeple çok sayıda enzim inhibitörü sentezlenmiş klinikte başta glokom, antitümör, antibiyotik, epilepsi, analjezik ajan, nörolojik hastalıklar ve anti-ülser tedavileri olmak üzere, CA inhibitörleri ilaç olarak doğrudan hizmet vermektedir (Supuran, 2010).

Yürüttüğümüz bu çalışmada *hCA I* ve *hCA II* izoenzimleri, Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzen sülfonamid afinite kromatografisi kullanılarak insan eritrositlerinden izole edilmiştir. İlk aşama olarak saflaştırılan enzimlerde kantitatif protein tayini, SDS-PAGE analizi ile karakterizasyon işlemleri yapılmıştır. Çalışmalarımızın ikinci kısmında ise yeni sentezlenen Schiff Bazı türevi maddelerin esteraz kabiliyeti olan *hCA I* ve *hCA II* izoenzimleri üzerindeki etkileri *in vitro* şartlarda incelenmiştir. Referans inhibitör olarak asetozolamid kullanılmıştır. Son aşamada ise sentezlenmiş bileşiklerin etki mekanizmaları hakkında fikir edinmek amacıyla *in silico* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Moleküler özelliklerin hesaplanmasında bilgisayar destekli bir moleküler modelleme programı olan Schrödinger Suite 2023-4 yazılımı kullanılmıştır. Bu hesaplamalar, potansiyel ilaç moleküllerinin kenetlenmesinin gerçekleşeceği aktif bölgeyi tanımlamakta ve aday moleküllerin hedef reseptör bölgesi ile etkileşimleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu analiz sayesinde, en yüksek puana sahip kompleksin, etkileşim diyagramları detaylıca incelenmiştir.

Tablo 4.2’de görüldüğü üzere yeni sentezlenen Schiff Bazı türevi olan LH, CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂ bileşiklerinin *hCA I* izoenzimi için *K_i* değerleri 42.14 ± 4.47 nM ile 322.80 ± 18.98 nM arasında iken *hCA II* için 33.37 ± 3.84 nM ile 161.50 ± 15.87 nM arasında olduğu tespit edilmiştir.

Analizler sonucu elde edilen *IC*₅₀ ve *K_i* değerleri incelendiğinde bileşiklerin tümü her iki izoenzim üzerinde de güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir. Yeni sentezlenen Schiff Bazı türevi olan LH bileşiğinin *hCA II* izoenzimini *hCA I*’e kıyasla yaklaşık iki kat daha güçlü

inhibe etme etkisine sahip olmasına rağmen diğer moleküllerin etkileri benzer seviyelerde gerçekleşmiştir. Referans inhibitör AAZ'ye kıyasla *hCA* I (K_I : 42.14 ± 4.47 nM) ve *hCA* II (K_I : 33.37 ± 3.84 nM) CuL_2 bileşiği tarafından en güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. Bu bileşiğin hemen arkasından *hCA* I'i yaklaşık 7 kat, *hCA* II yi ise 5 kat standart inhibitöre göre daha fazla inhibisyon etkisi gösteren ZnL_2 bileşiği takip etmiştir. Bunun aksine bileşiklerden en zayıf inhibitör etki gösteren ise *hCA* I ve *hCA* II için sırasıyla 322.80 ± 18.98 nM ve 161.50 ± 15.87 nM'lık K_I değerleri ile LH bileşiği olmuştur.

Ereminsoy tarafından 2023 yılında sentezlenen Schiff Bazı metal komplekslerinin Lipoksigenaz (LOX) enzimi üzerine etkilerini belirlemek üzere yürütülen bir çalışmada LOX enziminin sentezlenen komplekslerin bazıları tarafından inhibe edildiği ancak Cu^{+2} ve Zn^{+2} komplekslerinin enzim üzerinde herhangi bir inhibisyon etkisinin olmadığını belirlenmiştir (Ereminsoy, 2023).

Benzer olarak bir çalışmada Shi ve arkadaşları 2007 yılında altı adet Schiff Bazı türevi yeni geçiş metal kompleksi sentezlemiş ve kristalografik metotlarla karakterizasyonunu yapmış ve ayrıca sentezledikleri bu bileşiklerin üreaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerini incelemiştir. Değerlendirmeler sonucunda, Mn(II) bileşiğinin 8.30 ± 0.93 μM IC_{50} ile en güçlü inhibisyon etkisini gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca komplekslerin yapı ve aktivite ilişkileri değerlendirildiğinde tüm komplekslerin serbest iyonlarına kıyasla enzimle daha fazla etkileşim gösterdiği ortaya konulmuştur (Shi ve ark., 2007).

2020 yılında yürütülen bir çalışmada ise Schiff Bazı türevi Fe(II) bileşiğinin etkileri *hCA* I ve II izoenzimleri üzerinde araştırılmış ve sırasıyla 52.83 ± 11.52 nM ve 63.34 ± 8.88 nM'lık K_I değerleriyle kuvvetli inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir (Buldurun ve ark., 2020).

2019 yılında yürütülen başka bir çalışmada ise sentezlenen Schiff Bazı türevi metal bileşikleri, CA I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve Ni^{+2} kompleksinin *hCA* I için 62.98 ± 18.41 nM ve *hCA* II için 86.17 ± 23.62 nM'lık K_I değerleriyle en kuvvetli inhibisyon etkisine sahip olduğu bulunmuştur (Buldurun ve ark., 2019).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak tez kapsamında kullandığımız yeni sentezlenen Schiff bazı türevi olan bileşiklerin *hCA* I ve *hCA* II izoenzimlerini önemli seviyelerde inhibisyona uğrattığı saptanmış ve bu durum *in silico* çalışmalar yardımıyla da aydınlatılmıştır. CA enzimi gibi geniş izozim grubuna sahip olan enzimler için ilaç çalışmalarında izoenzimlerden sadece birini hedef alan maddeler seçicilik özelliği göstermesi nedeniyle daha fazla ilgi odağı olmaktadır. Bu sayede grubun diğer izozimlerine karşı inhibisyon etkisi az olacak ve yan etki riski daha düşük olacaktır. LH bileşiğinin bu şekilde bir inhibisyon özelliği göstererek *hCA* II enzimini, *hCA* I enzimine göre yaklaşık olarak iki kat daha kuvvetli inhibisyona uğrattığı tespit edildi. Ayrıca standart inhibitör asetozolamide kıyasla her iki enzim içinde yaklaşık 10 kat olacak şekilde en güçlü inhibisyon etkisine sahip olan bileşiğin CuL_2 olduğu tespit edilmiştir. Bu yönüyle hem LH ligandı hem de onun Cu^{+2} kompleksi hakkında daha fazla ve ileri adım çalışmalar yapılmasının gerektiği düşünülmektedir.

Tez kapsamındaki bileşiklerin her biri hem *hCA* I ve hem de *hCA* II izoenzimleri üzerinde standart inhibitöre kıyasla oldukça önemli seviyelerde inhibitör etki gösterdiği belirtilmişti. Yeni sentezlenen bu moleküllerin sülfonamid grubu ilaçların alternatifi ya da bu grupla kombine olarak kullanım için güçlü adaylar olma potansiyeline sahip olabileceği göz önüne alındığında bu bileşiklerin ileri çalışmalarda tercih edilerek iyice aydınlatılması gereken ve ilaç ön maddesi olarak değerlendirilebilecek güçlü inhibitör etkiye sahip önemli bileşikler olduğu görülmektedir.

Moleküllerin sentez basamaklarının ekonomik ve kolay olması, güçlü inhibisyon özelliği göstermeleri ve yüksek kararlılıkta olmaları sebebiyle CA ile bağlantılı önemli hastalıklarda inhibisyon özelliğinden yararlanılabileceği ve dolayısıyla sentezlenen ligand ile onların metalik komplekslerinin farklı kombinasyonlarının CA'nın diğer izoenzimlerinin inhibisyonunda da etkin rol oynayacağı beklenmektedir. Ayrıca metal komplekslerinin her birinin inhibisyon etkisinin değişiklik göstermesi daha fazla Schiff bazı metal komplekslerinin CA izoenzimleri üzerindeki etkileri belirlenerek güçlü CA inhibitörlerinin

bulunması daha fazla çalışmayla mümkün olacaktır. Bu amaçla gruptaki tüm enzimler için spesifik bir durumunun olup olmadığı da belirlenecektir.

Neticede CA enzimi çok geniş bir izoenzim grubu olup üzerinde daha fazla çalışma yapılması gereken bir enzim grubudur. Araştırmada kullandığımız yeni sentezlenen Schiff bazı türevi olan LH, CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂ bileşiklerinin tamamı *h*CA I ve *h*CA II izoenzimleri üzerinde tatmin edici derecede inhibisyona neden olmuş bu bileşiklerinde ileri çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği kanaatini oluşturmuştur.



KAYNAKLAR

- Akbaş, H. (2018). Pirazol Karboksilik Asitlerin, Tiyadiazolle Amitleşme Ürünlerinin Sığır CA'sı (Karbonik Anhidraz Enzimi) Üzerindeki İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi*.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., and De Simone, G. (2012). Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemical Reviews*, 112(8), 4421-4468.
- Armstrong, J. M., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T. J. J. O. B. C. (1966). Purification and Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases. *The Journal OF Biological Chemistry*, 241(21), 5137-5149.
- Arslan, O. B. (2001). İnhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds. *Biochemistry*, 66(9), 982-983.
- Ashok, C., Palanimuthu, D., Selvadurai, S. D. V., and Varshini, R. J. B. R. A. C. (2021). An Apodictic Review on Recent Approaches in Enzyme Technology. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12, 3446-3471.
- Bingöl, G. (1983). *Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- Bradford, M. M. J. A. B. (1976). A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglione, G., and Supuran, C. T. (1997). Carbonic Anhydrase Activators: X-Ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations for The Interaction of Isozymes I And II with Histamine. *Biochemistry*, 36(34), 10384-10392.
- Buldurun, K., Turan, N., Aras, A., Mantarcı, A., Turkan, F., Bursal, E. J. C., and Biodiversity. (2019). Spectroscopic and Structural Characterization, Enzyme İnhibitions, and Antioxidant Effects of New Ru (II) And Ni (II) Complexes of Schiff Base. *Chemistry & Biodiversity*, 16(8), E1900243.
- Buldurun, K., Turan, N., Bursal, E., Mantarcı, A., Turkan, F., Taslimi, P., and Gülçin, İ. J. R. O. C. I. (2020). Synthesis, Spectroscopic Properties, Crystal Structures, Antioxidant Activities and Enzyme İnhibition Determination of Co (II) And Fe (II) Complexes of Schiff Base. *Research on Chemical Intermediates*, 46, 283-297.
- Canpolat, E. (2003). İmin ve Oksim İçeren Ligandların Sentezi, Karakterizasyonu Ve Bu Ligandların Bazı Metal Komplekslerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Carta, F., Supuran, C. T., and Scozzafava, A. J. F. M. C. (2014). Sulfonamides and Their Isosters As Carbonic Anhydrase İnhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 6(10), 1149-1165.
- Cook, P. F., and Cleland, W. W. (2007). *Enzyme Kinetics And Mechanism*: Garland Science.

- Cuatrecasas, P. J. J. O. B. C. (1970). Protein Purification by Affinity Chromatography: Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads. *The Journal of biological Chemistry*, 245(12), 3059-3065.
- El-Azab, A. S., Alaa, A.-M., Bua, S., Nocentini, A., El-Gendy, M. A., Mohamed, M. A., Supuran, C. T. J. B. C. (2019). Synthesis of Benzensulfonamides Linked To Quinazoline Scaffolds As Novel Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 87, 78-90.
- Ereminsoy. (2023). *Lipoksigenaz Enziminin Kinoa (Chenopodium Qunioa Willd.)`Dan Saflařtirilmesi, Yeni Sentezlenmiş Bazi Schiff Bazlarinin Enzim Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Arařtirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Granger, D. L., and Lehninger, A. L. J. T. J. O. C. B. (1982). Sites of Inhibition of Mitochondrial Electron Transport in Macrophage-Injured Neoplastic Cells. *The Journal of Cell Biology*, 95(2), 527-535.
- Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., Lanoue, K. F., and Lynch, C. J. J. T. F. J. (1996). Differentiation-Dependent Expression of CA V and The Role of Carbonic Anhydrase Isozymes in Pyruvate Carboxylation in Adipocytes. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(4), 481-490.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G. N., Waheed, A., . . . Vihinen, M. J. B. J. (2005). Characterization of CA XV, A New GPI-Anchored form of Carbonic Anhydrase. *The Biochemical Journal*, 392(1), 83-92.
- Karthikeyan, M. S., Prasad, D. J., Poojary, B., Bhat, K. S., Holla, B. S., Kumari, N. S. J. B., and Chemistry, M. (2006). Synthesis and Biological Activity of Schiff And Mannich Bases Bearing 2, 4-Dichloro-5-Fluorophenyl Moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(22), 7482-7489.
- Keha, E., ve Küfrevioğlu, Ö. J. B. S. İ. (2007). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Keha, E. E., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2000). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Keha EE., K. Ö. İ. (2009). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.
- Kisker, C., Schindelin, H., Alber, B. E., Ferry, J. G., and Rees, D. C. J. T. E. J. (1996). A Left-Hand Beta-Helix Revealed By The Crystal Structure Of A Carbonic Anhydrase From The Archaeon Methanosarcina Thermophila. *The EMBO Journal*, 15(10), 2323-2330.
- Kohn, J., and Wilchek, M. (1978). A Colorimetric Method For Monitoring Activation Of Sepharose By Cyanogen Bromide. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 84(1), 7-14.
- Laemmli, U. K. J. N. (1970). Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C., Tashian, R. E. J. B., and Communications, B. R. (1996). Expression of Mouse Carbonic Anhydrase VII Ine. Coliand Demonstration of Its CO₂Hydrase Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(1), 268-272.

- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles Of Biochemistry*, New York: Macmillan.
- Lindskog, S. (1997). Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharmacology & therapeutics*, 74(1), 1–20.
- Lineweaver, H., and Burk, D. J. J. O. T. A. C. S. (1934). The Determination Of Enzyme Dissociation Constants. *Advances in Enzyme Research*, 56(3), 658-666.
- Lolak, N., Akocak, S., Bua, S., Koca, M., and Supuran, C. T. J. B. C. (2018). Design and Synthesis of Novel 1, 3-Diaryltriazene-Substituted Sulfonamides As Potent and Selective Carbonic Anhydrase II Inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 77, 542-547.
- Marangoni, A. G. (2003). *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Mohanty, A., Kannan, K., and Mahajant, S. J. J. O. B. (1998). Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function. *Journal of Biosciences*, 23(3), 235-246.
- Montgomery, R., Conway, T., Spector, A., and Chappell, D. J. Ç. E. A., N. (2000) *Biyokimya, Olgu Sunumlu Yaklaşım*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D., and Rodwell, V. J. G. M., B. (1993). *Harper'in Biyokimyası*, Çev. İstanbul: Ersoz, Barış Kitapevi.
- Nelson, D., and Cox, M. J. B. S. P. Y. (2016). *Biyokimyanın İlkeleri*. Ankara: Palme Kitapevi.
- Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2018). *Principios De Bioquímica De Lehninger-7*. Espana: Edidiones Omega.
- Nocentini, A., Ferraroni, M., Carta, F., Ceruso, M., Gratteri, P., Lanzi, C., Supuran, C. T. J. J. O. M. C. (2016). Benzenesulfonamides Incorporating Flexible Triazole Moieties Are Highly Effective Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis And Kinetic, Crystallographic, Computational, And Intraocular Pressure Lowering Investigations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(23), 10692-10704.
- Ouertani, A., Neifar, M., Ouertani, R., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., and Cherif, A. J. A. T. E. R. M. O. A. (2019). Effectiveness of Enzyme Inhibitors in Biomedicine and Pharmacotherapy. *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5, 85-90.
- Ozensoy, O., Arslan, O., and Oznur Sinan, S. J. B. (2004). A New Method for Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography. *Biochemistry*, 69, 216-219.
- Önal, S. (2010). Moleküler Biyoloji. In *Enzimler Kitap Bölümü* (p. 249-296). İstanbul: Nobel Yayınları.
- Parkkila, S., Vullo, D., Puccetti, L., Parkkila, A.-K., Scozzafava, A., Supuran, C. T. J. B., and Letters, M. C. (2006). Carbonic Anhydrase Activators: Activation of Isozyme XIII With Amino Acids And Amines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(15), 3955-3959.

- Pocker, Y., and Janjic, N. J. J. O. T. A. C. S. (1989). Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application To Carbonic Anhydrase II. *American Chemical Society*, 111(2), 731-733.
- Renzi, G., Scozzafava, A., and Supuran, C. T. (2000). Carbonic Anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incorporating Secondary Amine Moieties. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 10(7), 673-676.
- Rickli, E. E., Ghazanfar, S., Gibbons, B. H., and Edsall, J. T. J. J. O. B. C. (1964). Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes: Preparation and Properties of Two Enzymes. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 239(4), 1065-1078.
- Segel, I. (1975). *Enzyme Kinetics*. New York: Wiley Interscience.
- Shi, D.-H., You, Z.-L., Xu, C., Zhang, Q., and Zhu, H.-L. J. I. C. C. (2007). Synthesis, Crystal Structure and Urease Inhibitory Activities of Schiff Base Metal Complexes. *Inorganic Chemistry Communications*, 10(4), 404-406.
- Sly, W. S., and Hu, P. Y. (1995). Human Carbonic Anhydrases and Carbonic Anhydrase Deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 375-401.
- Stams, T., Chen, Y., Christianson, D. W., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Laipis, P., Dean, T. J. P. S. (1998). Structures Of Murine Carbonic Anhydrase IV and Human Carbonic Anhydrase II Complexed with Brinzolamide: Molecular Basis of Isozyme-Drug Discrimination. *Protein science : A Publication of the Protein Society*, 7(3), 556-563.
- Supuran, C., and Scozzafava, A. C. M. C.-I., Endocrine. (2001). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine Metabolic Agents*, 1(1), 61-97.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors And Activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 168-181.
- Supuran, C. T. (2009). Carbonic Anhydrases As Drug Targets General Presentation. In: *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, And Disease Applications* (p. 15-38). New Jersey: Wiley Publication.
- Supuran, C. T. (2010). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3467-3474.
- Supuran, C. T., and De Simone, G. (2015). *Carbonic Anhydrases As Biocatalysts: From Theory to Medical And Industrial Applications*. Holland: Elsevier.
- Supuran, C. T., and Scozzafava, A. (1999). Carbonic Anhydrase Activators: Amino Acyl/Dipeptidyl Histamine Derivatives Bind with High Affinity to Isozymes I, II And IV And Act As Efficient Activators. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 7(12), 2915-2923.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Casini, A. J. M. R. R. (2003). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 23(2), 146-189.
- Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D., and Supuran, C. T. (2006). Carbonic Anhydrase Activators. Activation of Isozymes I, II, IV, VA, VII, And XIV With L-And D-Histidine and Crystallographic Analysis of Their Adducts with Isoform II:

Engineering Proton-Transfer Processes Within The Active Site of An Enzyme. *Chemistry–A European Journal*, 12(27), 7057-7066.

Tuna, S. (2010). Aromatik Amin İçeren Schiff Bazı Ligandlarının Sentezi, Karakterizasyonu ve Bazı Geçiş Metal Komplekslerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.

Tunca, E. (2012). *Yeni Akridin Türevlerinin Antiglokom Etkisinin In Vitro Olarak İncelenmesi*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya.

Verpoorte, J. A., Mehta, S., and Edsall, J. T. J. O. B. C. (1967). Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B And C. *Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221-4229.

Wang, B. (2009). *Drug Design Of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, And Disease Applications*. New Jersey: Wiley Publication.



ÖZGEÇMİŞ

19** yılında Er*****/Me**** doğdu. İlk ve orta öğrenimini Er***** Kurtuluş İlk Öğretim Okulunda, Lise eğitimini ise Erzincan Laborant ve Veteriner Sağlık Meslek Lisesinde tamamladı. Yükseköğrenimi süresince; Atatürk üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi- İşletme Bölümü ve Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümlerinden mezun oldu. İlk yüksek lisans eğitimini Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalında ağır metal stresi üzerine çalışmalar yürüttü ve “Priming Uygulamalarının Kadmiyum Stresine Maruz Bırakılan Bazı Çeltik (Oryza SATİVA L.) Çeşitlerinde Çimlenme, Fide Gelişimi ve Bitki Bünyesinde Biriken Kadmiyum Miktarları Üzerine Etkileri” başlıklı tez çalışmasını hazırladı. 2010 yılında Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’na atandı Bakanlık bünyesinde, Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Er***** Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüklerinde görev yaptı. Hala Tarım ve Orman Bakanlığına Bağlı Er***** Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğünde Ziraat Yüksek Mühendisi olarak görev yapmaktadır. Evli ve üç çocuk babası olan yazar, ikinci yüksek lisans alanındaki çalışmasında bu tezi hazırlamıştır.