

ARZU ORHAN

FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS

2025



T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ SENTEZLENEN SCHIFF BAZI METAL
KOMPLEKSLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Arzu ORHAN

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

FARMASÖTİK BİLİMLER
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
Şubat 2025
Her Hakkı Saklıdır.

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

YÜKSEK LİSANS

**YENİ SENTEZLENEN SCHİFF BAZI METAL
KOMPLEKSLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Arzu ORHAN

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

**FARMASÖTİK BİLİMLER
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
Şubat 2025
Her Hakkı Saklıdır.**

Kabul ve Onay

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı Yüksek Lisans programında öğrenci Arzu ORHAN tarafından Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ danışmanlığında hazırlanan “Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../... tarihinde yapılan tez savunma sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Unvan Ad SOYAD

İmza:

Üye : Unvan Ad SOYAD

İmza:

Üye : Unvan Ad SOYAD

İmza:

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 I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezini tarafımda 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. 04/02/2025

(İmza)

Arzu ORHAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Yeni Sentezlenen Schiff Bazı Metal Komplekslerinin Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Arzu ORHAN

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Bilimler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

Amaç: Bu tez çalışmasında, Glokom hastalığının tedavisinde kullanılan Asetazolamide alternatif olarak yeni sentezlenen Schiff bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin *hCA* I ve *hCA* II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkilerini belirlemek üzere çalışmalar yapılmıştır.

Materyal Metot: Bu kapsamda gerçekleştirilen tez çalışmasında, sentezlenen Schiff bazı metal komplekslerinin *hCA* I ve *hCA* II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Asetazolamid pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Her bir metal kompleksi için IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanmış ve inhibisyon türleri belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmada IC_{50} ve K_i değerleri *hCA* I izoenzimi için sırasıyla $111,70 \pm 2,18$ - $771,90 \pm 17,55$ nM ve $99,16 \pm 9,21$ - $721,90 \pm 53,46$ nM aralığında olduğu belirlendi. Aynı parametreler *hCA* II izoenzimi için sırasıyla $160,50 \pm 3,27$ - $1076,00 \pm 29,39$ nM ve $125,60 \pm 9,31$ - $1033,00 \pm 56,99$ nM aralığında hesaplandı.

Sonuç: Çalışmada kullandığımız Schiff Bazı metal komplekslerinden CoL_2 bileşiğinin *hCA* I enzimini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir.

2025, 60 Sayfa

Anahtar Kelimeler: İnhibisyon, Karbonik Anhidraz, Schiff Bazı Metal Kompleksleri

ABSTRACT

MSc Thesis

Investigation of the Effects of Newly Synthesized Schiff Base Metal Complexes on the Activities of Carbonic Anhydrase I and II Isoenzymes

Arzu ORHAN

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

Supervisor: Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ

Aim: In this thesis study, studies were carried out to determine the inhibition effects of the newly synthesized Schiff base ligand (LH) and metal complexes (CoL₂, CuL₂, NiL₂ and ZnL₂) as an alternative to Acetazolamide used in the treatment of Glaucoma, on the activities of *hCA* I and *hCA* II isoenzymes.

Material and Method: In this thesis study, the inhibition effects of the synthesized Schiff base metal complexes on *hCA* I and *hCA* II isoenzymes were examined. Acetazolamide was used as a positive control. *IC*₅₀ ve *K*_i values were calculated for each metal complex and inhibition types were determined.

Result: In the study, *IC*₅₀ ve *K*_i values were determined to be in the range of 111.70 ± 2.18 - 771.90 ± 17.55 nM and 99.16 ± 9.21 - 721.90 ± 53.46 nM, respectively, for the *hCA* I isoenzyme. The same parameters were calculated for the *hCA* II isoenzyme in the range of 160.50 ± 3.27 - 1076.00 ± 29.39 nM and 125.60 ± 9.31 - 1033.00 ± 56.99 nM, respectively.

Conclusion: It has been determined that the CoL₂ compound, one of the Schiff Base metal complexes we used in the study, significantly inhibits the *hCA* I enzyme.

2025, 60 Pages

Keywords: Inhibition, Carbonic Anhydrase, Schiff Base Metal Complexes

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Sayın Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ yönetiminde, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmalarımın planlanması ve hayata geçirilmesi sürecinde, bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden, yol gösteren ve her zaman destek olan hem bilimsel birikimiyle hem de bireysel olarak örnek aldığım çok değerli hocam, Doç. Dr. Cüneyt TÜRKEŞ'e emeklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim sürecinde gösterdiği ilgi ve destekle yanımda olan ve Yüksek Lisans Tez çalışmamda kullandığım Schiff baz metal komplekslerini sentezleyerek çalışmama katkı sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra TUNA YILDIRIM'a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman samimiyetle destek veren Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyeleri Farmasötik Bilimler Anabilim Başkanı Sayın Doç. Dr. Gül ÇETİN'e, Sayın Prof. Dr. Esra, DİLEK'e, ve tüm değerli hocalarıma,

Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Hatice Esra DURAN'a,

Görev yapmakta olduğum kurumun yöneticisi Ergani İlçe Sağlık Müdürü Uzm. Dr. Rüstem KUZAN'a

Çalışmalarım sırasında her zaman her konuda bana destek olan ve yardımını esirgemeyen değerli arkadaşım Ecz. Esra YILDIRIM'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan aileme,

Gönülden teşekkür ve saygılarımla...

Arzu ORHAN

Şubat, 2025

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay.....	i
Bilimsel Etiğe Uygunluk.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi (CA Enzimi)	2
2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Fonksiyonları	3
2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Gen Ailesi	3
2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Roller ve Doku Dağılımları	4
2.4.1. α -CA izoformları:.....	4
2.4.2. β -CA izoformları:.....	6
2.4.3. γ -CA izoformları:.....	6
2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı.....	7
2.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması.....	8
2.6.1 Aktif Merkez	8
2.6.2. Katalitik Mekanizma Basmakları	9
2.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi.....	11
2.7.1. Eritrositlerde CA ve Difüzyonun Etkileşimi	11
2.7.2. Alveollerde CA ve Difüzyonun Etkileşimi	12
2.8. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	12
2.9. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	14
2.9.1. Metal Bağlayıcı Anyonlar.....	14
2.9.2 Sülfonamid Bazlı İnhibitörler	15
2.10. Glokom.....	16
2.11. Sistemik Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	18

2.11.1. Asetazolamid.....	18
2.11.2. Metazolamid.....	19
2.11.3. Diklorfenamid	20
2.11.4. Etokzolamid	21
2.11.5. İndisulam.....	22
2.11.6. Zonisamid.....	22
2.12. Topikal Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	23
2.12.1. Dorzolamid.....	24
2.12.2. Brinzolamid.....	25
2.13. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Karşılaştırılması	26
2.14. Karbonik Anhidraz Aktivasyonu	26
2.15. Schiff Bazları	27
3. MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Ekipmanlar	30
3.2. Hedeflenen LH Ligandının Sentezi.....	30
3.3. Hedeflenen Metal Komplekslerinin Sentezi	31
3.4. <i>hCA</i> I ve II izoenzimlerinin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	32
3.5. <i>hCA</i> I ve II izoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayini	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. <i>hCA</i> I ve II izoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Sentezlenen Schiff Bazı Bileşiklerinin Etkilerinin İncelenmesinin Sonuçları	34
4.2. <i>hCA</i> I ve II izoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Sentezlenen Schiff Bazı Türevleri İçin K_I Sabitlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları	43
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKÇA.....	56
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Katalitik Olarak Aktif İnsan <i>a</i> -CA'larının Hücre İçi Yerleşimlerinin Şematik Olarak Gösterimi.....	6
Şekil 2. 2. A-, B- Ve Γ -CA Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları	7
Şekil 2. 3. CA İzofomlarının Katalitik Bölgeleri	8
Şekil 2. 4. Aktif Bölgedeki Çinko Bağlanma Bölgesi, Hidrofobik / Hidrofilik Bölgeler Ve Giriş Kanalı	9
Şekil 2. 5. Zn-CA II'nin CO ₂ Hidrasyon Reaksiyon Mekanizması	10
Şekil 2. 6. CA'nın Eritrosit Ve Alveollerdeki Rolü	12
Şekil 2. 7. Sülfonamidlerin Genel İyonlaşma Reaksiyonu	16
Şekil 2. 8. Glokom Hastalığının Şematize Edilmiş Görüntüsü	17
Şekil 2. 9. Asetazolamid Yapısı.....	18
Şekil 2. 10. Metazolamid Yapısı	20
Şekil 2. 11. Diklorfenamid Yapısı	21
Şekil 2. 12. Etokzolamid Yapısı	21
Şekil 2. 13. İndisulam Yapısı.....	22
Şekil 2. 14. Zonisamid Yapısı	23
Şekil 2. 15. Dorzolamid Yapısı	24
Şekil 2. 16. Brinzolamid Yapısı.....	25
Şekil 2. 17. Schiff Bazının Oluşumuna İlişkin Genel Şema.....	28
Şekil 3. 1. Hedeflenen LH Ligandının Sentez Mekanizması.....	30
Şekil 3. 2. Hedeflenen Metal Komplekslerinin (CoL ₂ , CuL ₂ , NiL ₂ Ve ZnL ₂) Sentez Mekanizması.....	31
Şekil 4. 1. <i>h</i> CA I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	38
Şekil 4. 2. <i>h</i> CA I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	38
Şekil 4. 3. <i>h</i> CA I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	39
Şekil 4. 4. <i>h</i> CA I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	39
Şekil 4. 5. <i>h</i> CA I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	40
Şekil 4. 6. <i>h</i> CA II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	40
Şekil 4. 7. <i>h</i> CA II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL ₂ Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	41

Şekil 4. 8. <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	41
Şekil 4. 9. <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği.....	42
Şekil 4. 10. <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin Etkisini Gösteren ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % Grafiği	42
Şekil 4. 11. Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	47
Şekil 4. 12. Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	47
Şekil 4. 13. Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	48
Şekil 4. 14. Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	48
Şekil 4. 15. Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	49
Şekil 4. 16. Schiff Bazı Ligandlı LH Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren Ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği	49
Şekil 4. 17. Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	50
Şekil 4. 18. Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	50
Şekil 4. 19. Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	51
Şekil 4. 20. Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Etkisini Gösteren ve K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Lineweaver-Burk Grafiği.....	51

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2. 1 Ca İzoenzimlerinin Dağılımı, Aktivitesi Ve Hastalıkla İlişkisi.....	5
Tablo 2. 2 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	13
Tablo 4. 1 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları.....	34
Tablo 4. 2 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	34
Tablo 4. 3 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	35
Tablo 4. 4 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	35
Tablo 4. 5 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	35
Tablo 4. 6 <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı Lh Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	36
Tablo 4. 7 <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	36
Tablo 4. 8 <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	36
Tablo 4. 9 <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	37
Tablo 4. 10 <i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL ₂ Bileşiğinin IC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Madde Konsantrasyonları	37
Tablo 4. 11 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı LH Bileşiğinin K ₁ Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	43
Tablo 4. 12 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL ₂ Bileşiğinin K ₁ Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	43
Tablo 4. 13 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL ₂ Bileşiğinin K ₁ Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	44
Tablo 4. 14 <i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL ₂ Bileşiğinin K ₁ Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	44

Tablo 4. 15	<i>hCA</i> I İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	44
Tablo 4. 16	<i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Ligandı Lh Bileşiğinin K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	45
Tablo 4. 17	<i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CoL_2 Bileşiğinin K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	45
Tablo 4. 18	<i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi CuL_2 Bileşiğinin K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	45
Tablo 4. 19	<i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi NiL_2 Bileşiğinin K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	46
Tablo 4. 20	<i>hCA</i> II İzoenzimi Aktivitesine Karşı Sentezlenen Schiff Bazı Metal Kompleksi ZnL_2 Bileşiğinin K_1 Sabitinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Substrat Ve Madde Konsantrasyonları İle Aktivite Değerleri.....	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAZ	Asetazolamid
BOS	Beyin omurilik sıvısı (Serebrospinal sıvı)
CA	Karbonik Anhidraz Enzimi
CA I	Karbonik Anhidraz Enzimi –I
CA II	Karbonik Anhidraz Enzimi –II
CA III	Karbonik Anhidraz Enzimi -III
CA IV	Karbonik Anhidraz Enzimi -IV
CA IX	Karbonik Anhidraz Enzimi -IX
CA VA	Karbonik Anhidraz Enzimi -VA
CA VI	Karbonik Anhidraz Enzimi -VI
CA VII	Karbonik Anhidraz Enzimi -VII
CA XII	Karbonik Anhidraz Enzimi -XII
CA XIII	Karbonik Anhidraz Enzimi -XIII
CA XIV	Karbonik Anhidraz Enzimi -XIV
CA XV	Karbonik Anhidraz Enzimi -XV
CARP VIII	Karbonik Anhidraz İlişkili Protein -VIII
CARP X	Karbonik Anhidraz İlişkili Protein -X
CARP XI	Karbonik Anhidraz İlişkili Protein -XI
CB VB	Karbonik Anhidraz Enzimi -VB
IC ₅₀	Enzim Aktivitesini %50 Oranında Azaltan İnhibitör Konsantrasyonu
K _i	İnhibisyon Denge Sabiti
GİB	Göz içi basınç
hCA	İnsan Karbonik Anhidraz Enzimi
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat iyonu

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasında kimyasal reaksiyonları hızlandırabilen, yan ürün üretmeden %100 ürün verimi sağlayan biyokatalizörlerdir (Çelik, 2017).

Enzimle katalize edilen reaksiyonlar, katalizlenmemiş reaksiyonlardan çok daha hızlı gerçekleşir. Enzimler, reaksiyonlara özgüdürler ve genellikle belirli bir substrata bağlanarak onu ürüne dönüştürürler. Bu reaksiyonlar sırasında enzimler fiziksel değişikliğe uğramış olsalar bile, eski haline dönebilir. Bazı katalitik RNA moleküllerinin küçük bir kısmı dışında tüm enzimler protein yapısındadır. Metabolik reaksiyonların bir sonucu olarak canlılığın devamlılığı, hücrelerdeki organik maddelerin sentezi ve yıkılması ve önemli faaliyetlerin (hücre solunumu ve kas kasılması gibi) gerçekleştirilmesi enzimlerin katalizi ile sürdürülür. Enzimlerin aktivitesi, substrat konsantrasyonuna bağlıdır ve bu ilişki, Michaelis-Menten denklemi ile ifade edilebilir. Bu aktivite, sıcaklık ve pH değişimlerine karşı hassastır ve her enzim için bir optimum sıcaklık ve pH değeri vardır.

Enzimler, "hayat katalizdir" ilkesine göre en çok araştırılan biyomoleküllerdir. İlaçların etki mekanizmalarında enzimlerin rolü büyüktür. Günümüzde birçok ilaç, enzimlerin inhibisyonu yoluyla istenen etkiyi gösterir (Bisswanger, 2014; Özavcı, 2019).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi (CA Enzimi)

Karbonik anhidraz (CA, karbonik dehidrataz, E.C. 4.2.1.1) aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren monomerik yapıda bir metalloenzim ailesidir. İlk olarak 1933 yılında Muldrum ve Roughton tarafından kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmiştir. Bu enzim CO_2 ile su arasındaki reaksiyonu katalizlediği için 'Karbonik Anhidraz' olarak isimlendirilmiştir (Özavcı, 2019).

CA enziminin genel reaksiyon denklemi:



Keline ve Martin'in 1944'te yaptığı çalışmada, CA enziminin aktivitesinin Zn^{+2} konsantrasyonuna bağlı olduğu ve aktif bölgesinde Zn^{+2} içerdiği bulunmuştur. Bu keşif, CA enziminin bir metalloenzim olduğunu ve çinkonun enzim aktivitesi için kritik bir kofaktör olduğunu ortaya koymuştur. Bu da CA enziminin ilk metalloenzim olarak anılmasını sağlamıştır. CA, canlı hücrelerde genellikle sitoplazmada çözünmüş olarak bulunur, bazen de hücre membranına bağlı bir şekilde konumlanır (Yaylacı Karahalil, 2009).

Karbonik anhidraz enzimi, hemen hemen tüm canlı hücrelerde bulunan yaygın bir metalloenzim olup, çeşitli dokularda ve hücrelerde farklı izoformları ile önemli işlevler üstlenir (Karaman, 2013).

Karbonik anhidraz enzimi, insan vücudunda mide mukozasında, beyinde, iskelet kasında, böbrek dokusunda, göz merceğinde, tükürük bezlerinde, sinir miyelin kılıfta, eritrosit ve endometrium gibi dokularda aktivitesi vardır (Özensoy, 2006).

Bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında, balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böceklerde, bakterilerde, alglerde ve kabuklu hayvanların kabuk oluşumunda bu enzimin farklı rolleri olduğu tespit edilmiştir (Özavcı, 2019).

CA enziminin endüstriyel uygulamalarında karşılaşılan zorluklar, enzimin stabilitesinin düşük olması ve yeniden kullanılabilirliğinin sınırlı olmasıdır (Sharma ve ark., 2020).

2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Fonksiyonları

Karbonik anhidraz enzimi, vücutta birçok temel fizyolojik süreçte önemli bir rol oynayan bir enzimdir. Bu enzim, özellikle pH dengesinin korunmasında kritik bir işlev üstlenir. Farklı dokularda ve eritrositlerde asit-baz dengesini düzenleyerek metabolik olayların sorunsuz bir şekilde gerçekleşmesine yardımcı olur. Karbondioksit (CO_2) ve bikarbonat (HCO_3^-) arasındaki dönüşümü katalize ederek solunum sürecinde hayati bir rol oynar. Bu sayede, dokulardan akciğerlere CO_2 taşınması ve solunumun düzenlenmesi sağlanır. Bunun yanı sıra, elektrolit salgılanmasında da görev alarak vücuttaki sıvı ve iyon dengesinin korunmasına katkıda bulunur. CA, glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi gibi önemli biyosentetik tepkimelerde de yer alır. Ayrıca, ozmoz, kalsifikasyon ve tümör oluşumu gibi çeşitli süreçlerde de rol oynayan CA enzimi, diyabet, kanser, epilepsi, Alzheimer hastalığı (AD) ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok rahatsızlığın gelişiminde etkili olabilmektedir (Kuzu ve ark., 2016; Aslan ve ark., 2019).

2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Gen Ailesi

Karbonik anhidraz enzimi, çeşitli izoformlara sahip bir enzim ailesidir. İzozimler, α , β , γ , δ , ζ , η ve θ gibi farklı sınıflara ayrılır. Çoğu CA izoformu aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu içerir. Bu, özellikle α (alfa) sınıfı izoformları için geçerlidir. İnsanlarda bulunan α -CA izoformu da aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonuna sahiptir.

γ (gama) sınıfı CA izoformları aktif bölgelerinde Fe^{+2} (demir) iyonu içerir.

δ (delta) sınıfı CA izoformları aktif bölgelerinde Co^{+2} (kobalt) iyonu içerir.

ζ (zeta) sınıfı CA izoformları aktif bölgelerinde Cd^{+2} (kadmiyum) iyonu içerir.

ι (iota) sınıfı CA izoformları ise aktif bölgelerinde metal iyonu içermez.

Bu sınıflandırma, CA izoformlarının farklı metal iyonlarına bağlanma yeteneklerine ve yapısal özelliklerine dayanır. Bu izoformlar, vücutta çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar ve farklı dokularda bulunur.

2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Roller ve Doku Dağılımları

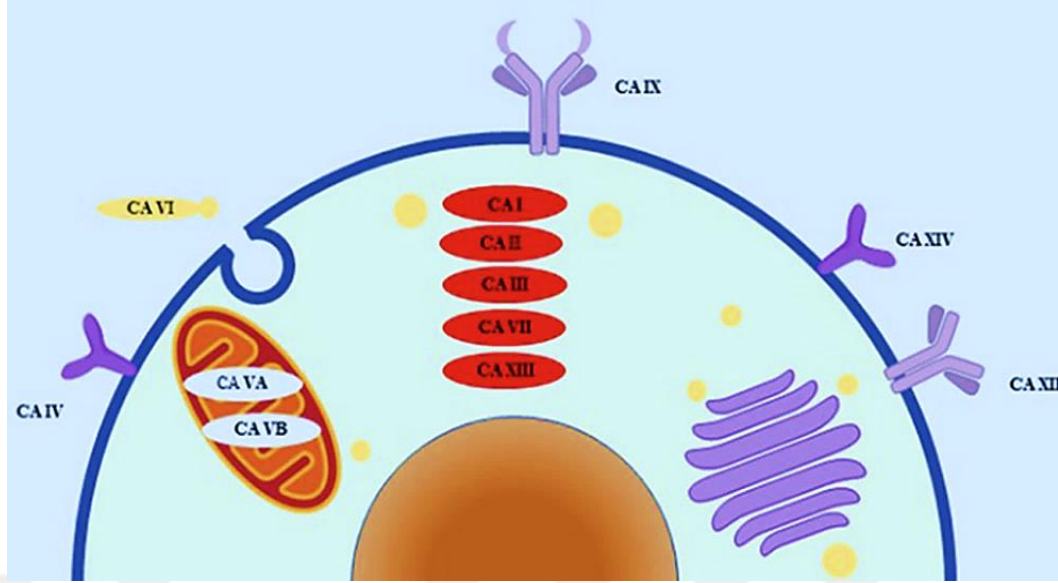
2.4.1. α -CA izoformları:

İnsanlarda, α -CA sınıfına ait 16 farklı CA izoformu (*hCA I-hCA XV*) bulunmaktadır. Bu izoformların 12'si (*hCA I-VA, VB-VII, IX, XII-XIV*) katalitik aktivite gösterirken, geri kalan 4'ü (*hCA-VIII, hCA X-XI*) katalitik olmayan izoformlardır. CA XV izoformu ise farede bulunur ve CA XV olarak adlandırılır. Bu izoformlar, CO₂ hidrasyonu ve bikarbonat dehidrasyonu reaksiyonlarını katalize ederek vücutta asit-baz dengesinin korunmasında iyon taşınmasında ve sıvı transportunda da rol oynar.

- **Sitoplazmik izoformlar:** CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII izoformları sitozolde bulunur. CA I, eritrositler, gastrointestinal sistem ve gözde bulunur ve hemolitik anemi ile ilişkilidir. CA II, özellikle eritrositlerde bulunur. CO₂ taşınmasında görev yapar, osteoklast farklılaşmasında ve kemik rezorpsiyonunda rol oynar. CA III, yüzeydeki sistein kalıntıları ile hücreleri oksidatif hasardan korur. CA VII ise nöronal uyarılmanın baskılanmasında rol oynar ve nöbet ve nöropatik ağrı tedavisinde hedef olarak görülür.
- **Membrana bağlı izoformlar:** CA IX, CA XII, CA IV ve CA XIV membranlara bağlı izoformlardır. CA IX, hipoksi (oksijen azlığı) koşullarında eksprese edilir ve tümörlerde yüksek seviyelerde bulunur. Anjiyogeneze ve tümör gelişiminde rol oynar. Ayrıca, gastrointestinal mukozada da bulunur. CA IX inhibitörleri, kanser hücrelerini kemoterapiye karşı hassaslaştırabilir. CA XII, hücre dışı bir izoformdur ve tümörlerde bulunur. CA XIV, hücre dışı membranda bulunur.
- **Mitokondriyal izoformlar:** CA VA ve CA VB mitokondrilerde bulunur. Perisitlerde bulundukları ve glikozun hızlı oksidatif metabolizmasını düzenledikleri görülmüştür.

Tablo 2. 1 CA izoenzimlerinin dağılımı, aktivitesi ve hastalıkla ilişkisi

	Organ ve Doku Durumu	Hücresel Lokalizasyon	Katalitik Aktivite	Hastalıklarla İlişkisi
CA I	Eritrositler, göz, sindirim yolu	Sitoplazma	Düşük (CA II' nin %10' u)	Retina/serebra 1
CA II	Eritrositler, göz, sindirim yolu, kemik osteoklastı, böbrek, akciğer, testis, beyin	Sitoplazma	Yüksek	Glokom, ödem, epilepsi, yükseklik hastalığı
CA III	İskelet kası, adipoz doku	Sitoplazma	Çok düşük	Oksidatif stres
CA IV	Böbrek, akciğer, pankreas, beyin kapileri, bağırsak, kalp kası, göz	Membran bağlı	Yüksek	Glokom, tavuk karası, felç
CA VA	Karaciğer	Mitokondri	Orta derece	Obezite
CA VB	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, spinal kord, sindirim borusu	Mitokondri	Yüksek	
CA VI	Tükürük ve süt bezleri	Tükürük/süt, salgı	Orta derece	Karyogenez
CA VII	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Yüksek	Epilepsi,
CARP VIII	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Akatalitik	Nörodejenerasyon, kanser
CA IX	Tümörler, mide-bağırsak mukozası	Transmembran	Orta derece	Kanser
CARP X	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Akatalitik	
CARP XI	Merkezi sinir sistemi	Sitoplazma	Akatalitik	Kanser, glokom
CA XII	Böbrek, bağırsak, göz, tümör	Transmembran	Düşük	Kısırlık
	Bağırsak, beyin, akciğer, gut, dalak,			
CA XIII	yumurtalık, testis, kolon timüs, ince bağırsak	Sitoplazma	Orta derece	Epilepsi, retinopati
CA XIV	Böbrek	Transmembran	Düşük	Epilepsi, retinopati
CA XV		Membran bağlı	Düşük	



Şekil 2. 1. Katalitik olarak aktif insan α -CA'larının hücre içi yerleşimlerinin şematik olarak gösterimi

2.4.2. β -CA izoformları:

İlk olarak bitkilerde (özellikle ıspanak ve bezelye kloroplastlarında) tanımlanmıştır. Daha sonra birçok yüksek bitkide, tek ve çift çelenklilerde ve siyanobakterilerde de bulunmuştur. Örnek olarak; *C. Reinhardtii*'de mitokondriyal bir β -CA ve *Synechococcus PCC7942* siyanobakterisinde de bir β -CA bulunmuştur. *Escherichia Coli*'de bulunan bir β -CA, siyanat tarafından indüklenir ve siyanat degradasyonunda rol oynar.

Özetle, bu aile bitkilerde fotosentez ve siyanat metabolizması gibi önemli süreçlerde görev alır.

2.4.3. γ -CA izoformları:

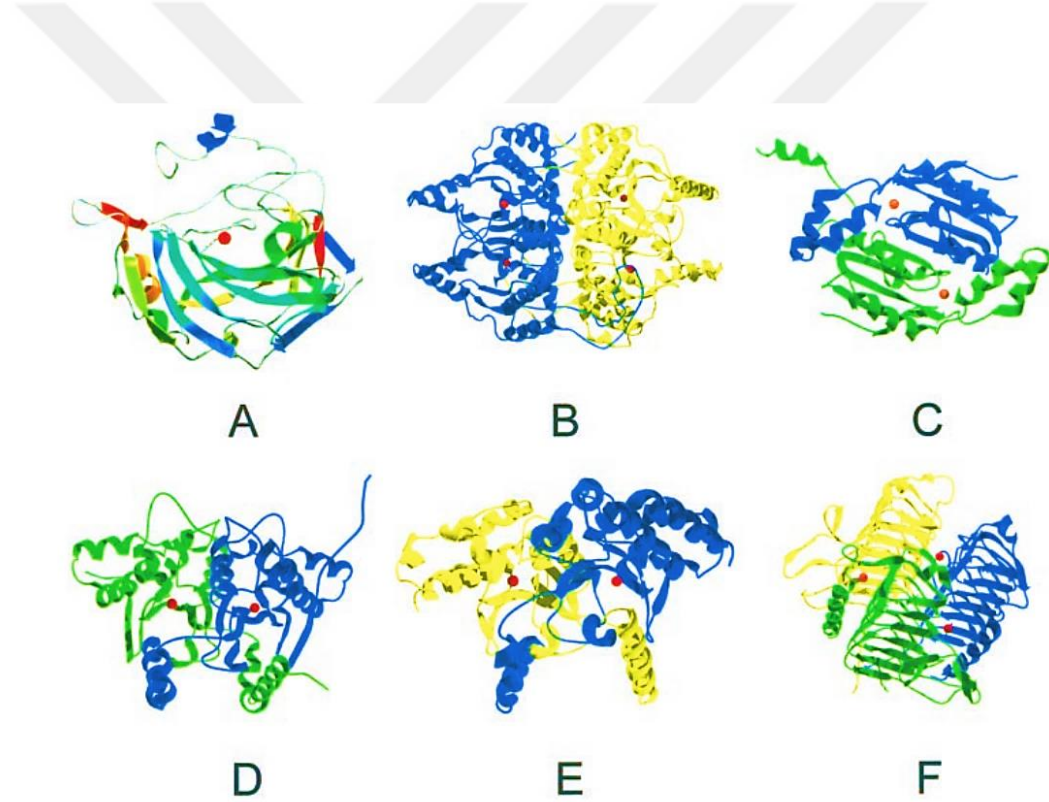
Daha az yaygın olarak bulunur ve şimdiye kadar metanojenik arkeobakteri *Methanosarcina Thermophila*'da karakterize edilmiştir. *M. thermophila*'daki γ -CA'nın yapısı, α -CA'lardan tamamen farklıdır; her bir alt birim, solak bir β -heliksi yapısıyla baskındır. İlginç bir şekilde, çinko bağlama bölgesinin geometrisi α -CA'lardaki metal merkezine benzerlik gösterir, bu da katalitik fonksiyonun evriminde benzerliklerin olduğunu vurgular.

CA ailesinin evrimsel ilişkileri, her birinin farklı organizma gruplarında ve farklı fizyolojik süreçlerde özelleştiğini gösterir. α -CA'lar hayvanlarda yaygınken, β -CA'lar

bitkilerde ve bazı bakterilerde, γ -CA'lar ise arkelerde ve bazı bakterilerde bulunur. Her ne kadar farklı amino asit dizilerine sahip olsalar da üç ailenin de ortak bir katalitik işlevi yerine getirmesi, doğadaki biyokimyasal reaksiyonların evrimi ve çeşitliliği hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Lindskog, 1997).

2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı

X ışını kristalografi çalışmaları aracılığıyla CA izoformlarının üç boyutlu yapıları ortaya çıkarılmıştır. CA II izoformu, yapısı en ayrıntılı olarak incelenen isoform olmuştur. Bu çalışmalar, tüm CA izoformlarının üç boyutlu yapılarının oldukça benzer olduğunu ve aktif bölgelerinin neredeyse aynı katalitik gruplara sahip olduğunu göstermektedir (Tripp ve ark., 2001).



Şekil 2. 2. α -, β - ve γ -CA enzimlerinin üç boyutlu yapıları: (A) α -sınıf, insan CA II'sı; (B) β -sınıf, *P. Purpureum* CA'sı; (C) β -sınıf, *P. Sativum* CA'sı; (D) β -sınıf, *M. Thermoautotrophicum* CA'sı; (E) β -sınıf, *E. Coli* CA'sı; (F) γ -sınıf, *M. thermophila* CA'sı

Bir enzimin aktif bölgesi, substrata (varsa kofaktör) bağlanan bağların oluşumu ve yok edilmesinde rol oynayan rezidüleri içerir. Bunlara katalitik gruplar denir. Aktif bölge, enzimin toplam hacminin küçük bir kısmını oluşturur. CA'ların aktif bölgesindeki iki

değerli metal iyonu, üç amino asit grubu ile etkileştiği için genellikle dört yüzlü bir geometriye sahiptir (Özavcı, 2019).

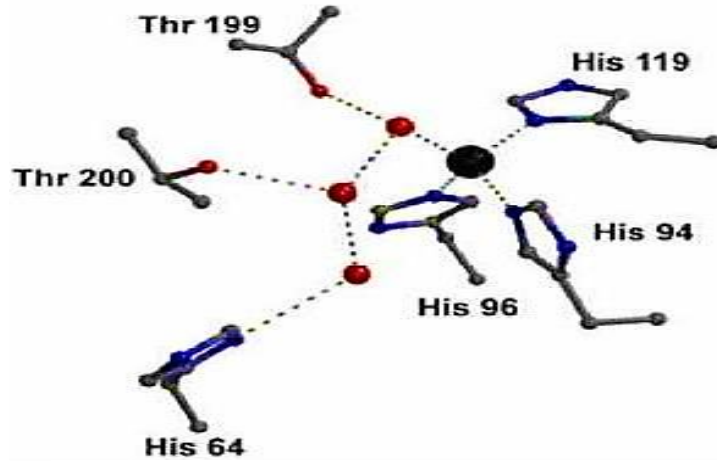
CA izoformlarının aktif bölgelerinde bir Zn^{+2} iyonu yer alır. Bu enzimatik aktiviteye sahip CA izoformları, bir Zn^{+2} iyonu, H_2O bir veya (OH^-) iyonu ve üç histidin amino asit rezidüsü (His 94, His 96, His 119) ile koordine bir yapı oluşturur. Aktif bölgeye yakın bulunan amino asitler, proton verici ve proton gradyanı oluşturacak şekilde düzenlenmiştir (Kumar ve ark., 2020)

2.6. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Karbonik anhidraz enzimi, karbondioksitin (CO_2) su ile reaksiyona girerek bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen iyonu (H^+) oluşturmalarını katalize eden bir enzimdir. Bu reaksiyon tersinirdir ve fizyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir (Ozensoy ve ark., 2016).

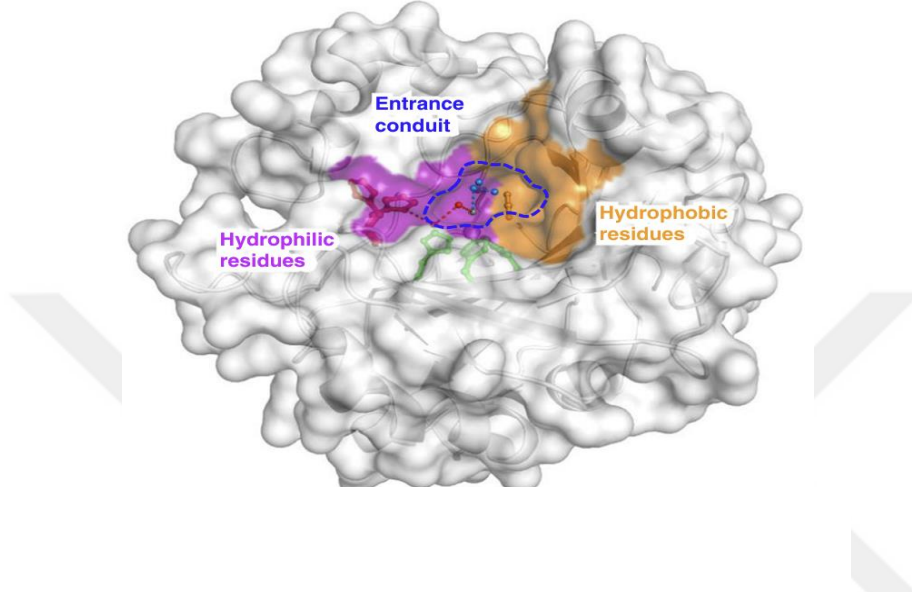
2.6.1 Aktif Merkez

CA'nın aktif merkezi, bir Zn^{+2} iyonu içerir. Bu Zn^{+2} iyonu, üç histidin amino asit (His 94, His 96, His 119) rezidüsünün imidazol grupları ve bir solvent molekülü (su veya hidroksit iyonu) aracılığıyla protein yapısına tetrahedral olarak koordine olur.



Şekil 2. 3. CA izoformlarının katalitik bölgeleri (Büyük küre Zn^{+2} iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.)

Zn^{+2} iyonu, Lewis asidi olarak işlev görür ve Zn'ye bağlı suyun pKa değerini 10'dan 7'ye düşürerek fizyolojik pH'da çinko bağlı bir hidroksit iyonunun oluşmasını sağlar. Aktif merkez, substrat bağlanması, proton transferi ve substrat/ürün/su değişimi gibi işlevler için hidrofobik ve hidrofilik bölgelerden oluşur.

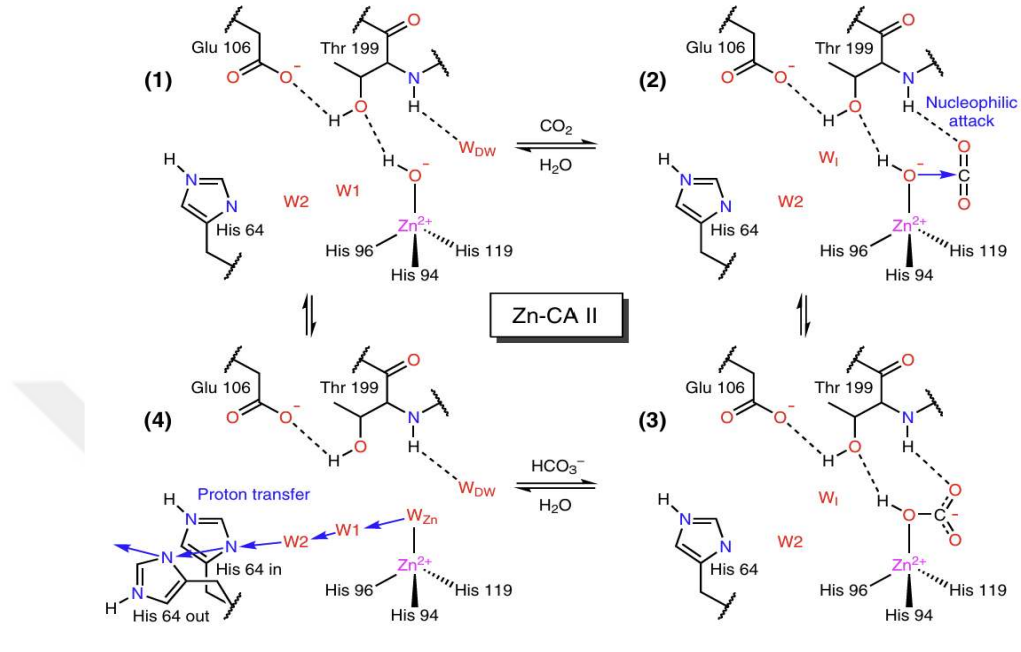


Şekil 2. 4. Aktif bölgedeki çinko bağlanma bölgesi, hidrofobik / hidrofilik bölgeler ve giriş kanalı

2.6.2. Katalitik Mekanizma Basmakları

- Hidroksit İyonunun (OH^-) Oluşumu: Zn^{+2} iyonuna bağlı su molekülü, protonunu kaybederek hidroksit iyonuna (OH^-) dönüşür. Bu, enzimin aktif formudur.
- CO_2 'nin Bağlanması: CO_2 molekülü, aktif merkezin hidrofobik bölgesine gevşek bir şekilde bağlanır.
- Nükleofilik Atak: Çinko bağlı hidroksit iyonu (OH^-), CO_2 molekülüne nükleofilik bir saldırı yapar ve bikarbonat iyonu (HCO_3^-) oluşur.
- Proton Transferi: Oluşan bikarbonat iyonu (HCO_3^-), metal iyonundan su ile yer değiştirir. Bu süreçte, bir proton transferi gerçekleşir. Çinkoya bağlı su molekülünden bir proton, His64 kalıntısına aktarılır, bu da metal merkezi ve reaksiyon ortamındaki tampon molekülleri arasında bir proton köprüsü görevi görür.

- Su Molekülünün Aktif Merkeze Girmesi: Bikarbonat iyonu (HCO_3^-) ayrıldıktan sonra su molekülü aktif merkeze girerek döngü yeniden başlar (Kim ve ark., 2020; Kumar ve ark., 2021; Rowlet, 2010).



Şekil 2. 5. Zn-CA II'nin CO_2 hidrasyon reaksiyon mekanizması

His64, aktif merkez ile reaksiyon ortamı arasındaki proton transferinde kritik bir rol oynar. Bu kalıntı, metal merkezi ile aktif merkez boşluğunun ağzı arasında yer alır. His64'ün pKa değeri, katalitik aktivite için uygun bir aralıkta bulunur ve tampon molekülleriyle etkileşime girerek proton transferini kolaylaştırır (Temperini ve ark., 2006).

Farklı CA izoformları arasında, His64'ün yanı sıra, His-200 ve Phe-198 gibi kalıntılar da aktif merkezde bulunabilir, bu da izoformlar arasında katalitik aktivite farklılıklarına yol açar. Özellikle CA III izoformunda Phe-198 kalıntısı, Thr-199 ile etkileşime girerek aktif merkezin yapısını etkiler ve aktiviteyi düşürür (Lindskog, 1997).

Enzimin yapısındaki çinko, KCN, H_2S ve NaN_3 gibi inhibitörler tarafından etkilenir; bu inhibitörler genellikle aktif merkeze bağlanarak Zn^{2+} iyonunun koordinasyonunu engeller ve enzimin katalitik aktivitesini durdurur (Keilin ve Mann, 1940).

Çinko, CA'nın aktif merkezindeki temel metaldir ancak Co^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} gibi diğer metal iyonları da bağlanabilir. Farklı metal iyonları, enzimin aktivitesinde değişikliklere

neden olur. Örneğin, Co^{+2} ile ikame edilmiş CA, çinko kadar olmasa da aktivite gösterirken, Ni^{+2} ve Cu^{+2} ile ikame edilmiş CA'nın aktivitesi önemli ölçüde azalır veya tamamen kaybolur (Kim ve ark., 2020).

2.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz enzimi genel olarak, vücutta böbreklerde, bağırsaklarda, gözde korpus sillerde, akciğerler ve eritrositlerde konsantre olmuştur. Ancak enzimin en önemli rolü kırmızı kan hücrelerindeki fonksiyonlarıdır (Brown ve ark., 1983).

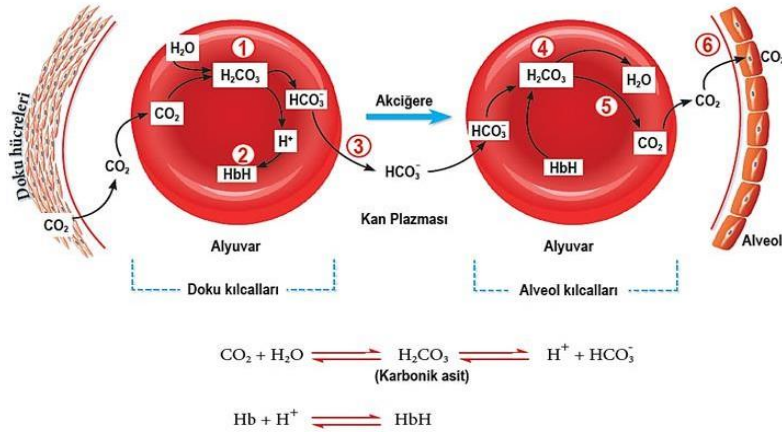
Karbonik anhidraz enzimi, eritrositlerde ve alveollerde karbondioksit (CO_2) taşınması ve asit-baz dengesinin korunması süreçlerinde birbirini tamamlayan hayati roller üstlenir. Bu süreçler, solunum sisteminin verimli çalışması için kritik öneme sahiptir ve her iki alandaki CA aktivitesi, CO_2 'nin vücutta taşınma, dönüştürülme ve atılma süreçlerini doğrudan etkiler.

Difüzyon, moleküllerin yüksek konsantrasyonlu ortamdan düşük konsantrasyonlu ortama doğru hareket etmesi olarak tanımlanır ve solunum gazlarının taşınmasında önemli bir mekanizmadır. CA enzimi, bu difüzyon süreçlerini hızlandırarak, gaz değişiminin verimliliğini artırır.

2.7.1. Eritrositlerde CA ve Difüzyonun Etkileşimi

Doku ve hücrelerde üretilen CO_2 , kısmi basınç farkı nedeniyle difüzyon yoluyla eritrositlerin içine girer. Eritrosit içinde, CA enzimi (özellikle CA I ve CA II izoformları), CO_2 'nin su (H_2O) ile hızlı bir şekilde reaksiyona girerek bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen iyonlarına (H^+) dönüşmesini katalize eder. Oluşan bikarbonat iyonları (HCO_3^-), eritrositlerden plazmaya geçerken, klorür iyonları (Cl^-) eritrositlere girer. Bu olaya klorür kayması denir ve elektriksel nötraliteyi korumaya yardımcı olur. Plazmada taşınan bikarbonat iyonları (HCO_3^-), akciğerlere doğru hareket eder.

Eritrositlerdeki CA aktivitesi, difüzyon yoluyla taşınan CO_2 'nin hızlı bir şekilde bikarbonata (HCO_3^-) dönüşmesini sağlayarak CO_2 yükünü artırır ve bu da dokulardan akciğerlere CO_2 taşınmasında önemli bir etken olur.



Şekil 2. 6. CA'nın eritrosit ve alveollerdeki rolü

2.7.2. Alveollerde CA ve Difüzyonun Etkileşimi

Akciğerlerde, alveollerin etrafındaki kılcal damarlara ulaşan eritrositlerde, bikarbonat iyonları (HCO_3^-) plazmadan eritrositlere geri döner. Burada CA enzimi, (özellikle CA IV izoformu), bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen iyonlarının (H^+) birleşerek CO_2 ve suya dönüşmesini hızlandırır. Oluşan CO_2 , difüzyonla eritrositten alveol boşluğuna geçer ve solunum yoluyla vücuttan atılır. Böylece alveollerde CO_2 birikimi engellenir.

Bu süreç, alveollerden kana oksijen geçişini kolaylaştırır ve kanın oksijen taşıma kapasitesini artırır, böylece kandaki pH dengesi korunmuş olur (Geers ve Gros, 2000; Henry ve Swenson, 2000; Sharma ve ark., 2020).

2.8. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz enzimi, karbondioksitin (CO_2) tersinir hidratasyonunu katalize eden çinko içeren bir enzimdir. Bu reaksiyon, CO_2 'nin su (H_2O) ile birleşerek bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen iyonu (H^+) oluşturmaya gerçekleşir. CA Enziminin genel denklemi: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ şeklindedir. Bu temel reaksiyonun yanı sıra, siyanatın karbamik aside hidratasyonu, ürenin siyanamide hidratasyonu, aldehidin geminal diol hidratasyonu, karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizi, pirüvat, alkil pirüvatların ve aldehit hidratasyonu, pirüvik, sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi çeşitli başka reaksiyonları da katalize edebilir.

CA enziminin katalitik mekanizması, aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonuna bağlı bir hidroksit iyonunun (OH^-) CO_2 molekülüne nükleofilik bir saldırısı ile başlar. Bu saldırı, bikarbonat oluşumunu hızlandırır. Enzimdeki aktif bölge, hidrofobik ve hidrofilik bölgeler içerir. Hidrofobik bölge, CO_2 'nin bağlanmasına ve reaksiyona uygun bir ortam sağlarken, hidrofilik bölge reaksiyonun diğer aşamalarına yardımcı olur.

CA enzimlerinin farklı izoformları, aynı temel mekanizmayı kullanmalarına rağmen, substrat ve inhibitör bağlama özelliklerinde farklılıklar gösterebilir. Örneğin, bazı CA izoformları (CA II gibi) yüksek CO_2 hidratasyon hızlarına sahipken, diğerleri (CA I ve CA III gibi) daha düşük aktivite gösterir. Bu farklılıklar, enzimlerin amino asit dizilimlerindeki ve aktif bölgelerindeki yapısal farklılıklardan kaynaklanır (Lindskog, 1997; Mishra ve ark., 2020; Stams ve ark., 1998).

Tablo 2. 2 Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

Reaksiyon	Reaksiyon tipi
Karbondiyoksitin bikarbonat ve protonlara hidrolizi	$O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$
Siyanattan karbamik asit hidrasyonu	$O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$
Siyanitten üre hidrasyonu	$HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$
Aldehitin gem-diollere hidrasyonu	$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$
Karboksilik esterlerin hidrolizi	$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$
Sülfonik esterlerin hidrolizi	$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$
Az araştırılmış hidrolitik süreçler	$\left[\begin{array}{l} ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH \text{ (Ar: 2,4-dinitrofenil)} \\ PhCH_2OCOC(=O)Cl + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl \\ RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl \text{ (R: Me; Ph)} \end{array} \right.$

2.9. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

In vivo ve *in vitro* koşullar altında belirli bileşiklerin enzim aktivitesini azaltması veya tamamen yok etmesi olayına inhibisyon; inhibisyona neden olan bileşiklere inhibitör denir. Enzim aktivitesinin inhibisyonu, organizmalarda önemli bir kontrol mekanizmasıdır. Pek çok toksik bileşiğin ve ilacın etkisine enzim inhibisyonu neden olmaktadır (Özavcı, 2019).

CA inhibitörlerinin, antiglokom, antitümör, antiobezite, antikonvülzan, antikanser ve diüretik aktiviteleri bulunmaktadır. CA izoformlarının çeşitli patolojik koşullarda ilişkisi ve fonksiyonel rolünün tanımlanmasının ardından, bu enzimler ilaç sektöründe önemli bir konuma gelmiştir (Terzi, 2015).

CA spesifik izoformlarının inhibisyonu farklı hastalıkları tedavi etmek için kullanılır. Glokomun terapötik yönetiminde CA II ve CA XII, epilepsinin terapötik yönetiminde CA VII ve CA II, obezitenin terapötik yönetiminde CA VA ve CA VB, tümörün terapötik yönetiminde CA IX ve CA XII izoformlarının inhibisyonu hedeflenir (Scozzafava ve ark., 2006).

Karbonik anhidraz inhibitörleri, etki mekanizmalarına göre temel olarak iki ana sınıfa ayrılabilir bunlar metal bağlayıcı anyonlar ve sülfonamid bazlı inhibitörlerdir. Bu iki sınıf, enzimi inhibe etme şekilleri açısından farklılık gösterir ve her birinin kendine özgü özellikleri vardır.

2.9.1. Metal Bağlayıcı Anyonlar

Bu sınıf, siyanür (CN^-), halojenürler (örneğin, florür, iyodür) ve sülfat (SO_4^{2-}) gibi anyonları içerir. Bu anyonlar, CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonuna doğrudan bağlanarak enzimi inhibe ederler. Bu bağlanma, Zn^{+2} iyonunun katalitik aktivitesini engeller. Anyonlar, Zn^{+2} iyonuna bağlanarak, koordine olmuş hidroksit iyonunun (OH^-) oluşumunu engeller. (OH^-) iyonu, CA'nın katalitik döngüsünde önemli bir rol oynar. Bazı anyonlar (örneğin, siyanür) çok güçlü inhibitör özellik gösterir, bazıları ise (örneğin, florür) daha zayıf inhibitörler olarak kabul edilir. Anyonların inhibisyon gücü, enzime bağlanma yeteneklerine ve Zn^{+2} iyonu ile etkileşimlerine bağlıdır.

Metabolonlar, bir dizi enzimin ve proteinin bir araya gelerek belirli bir metabolik yolu daha verimli bir şekilde işlemesine olanak tanıyan komplekslerdir. Bazı anyonlar, enzim aktif bölgesinde metabolonlara katılan proteinlerle etkileşime girerek de inhibisyona katkıda bulunur.

CA izoformları farklı anyonlara karşı farklı duyarlılığa sahip olabilirler. Örneğin, CA IV izoformu halojenürler tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken, diğer izoformlar daha az etkilenir. Benzer şekilde CA XIII izoformu fizyolojik anyonlara (bikarbonat, klorür) karşı dirençli olabilir (Lindskog, 1997; Scozzafava ve ark., 2006; Supuran ve ark., 2003).

2.9.2 Sülfonamid Bazlı İnhibitörler

Bu sınıf, R-SO₂NH₂ genel formülüne sahip molekülleri içerir ve CA inhibitörlerinin en önemli grubunu oluşturur. Sülfonamidler, aktif bölgedeki Zn⁺² iyonuna koordinasyon yoluyla bağlanır. Sülfonamid molekülünün proton (H⁺) kaybetmiş azot atomu (NH⁻) Zn⁺² iyonu ile tetrahedral bir kompleks oluşturur. Bu etkileşim, Zn⁺² iyonunun katalitik aktivitesini engeller ve su molekülünün bağlanmasını önler. Sülfonamidler genellikle tersinir (reversibl) inhibitörlerdir. Bağlanma şekli ve inhibisyon gücü, moleküldeki R grubunun yapısına ve özelliklerine bağlı olarak değişir. Bazı sülfonamidler, enzimin aktif bölgesindeki hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler yoluyla da enzime bağlanabilir. Bu etkileşimler, inhibisyon gücünü artırır ve inhibitörün enzime özgülüğünü etkiler.

Sülfonamidler, aynı zamanda aktif bölgedeki amino asitlerle etkileşime girerek de inhibisyon yaparlar. Örneğin, Dorzolamidin etilamino grubu, histidin-64 pozisyonunu değiştirerek suyun bağlanmasını engeller (Carta ve ark., 2014; Sugrue, 2000).

Sülfonamidler, bakteriyostatik antibiyotiklerin sentezi için gerekli bileşiklerdir. Sülf ilaçları olarak adlandırılırlar, penisilinin keşfinden önce bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak için kullanılmışlardır. Bu bileşikler, geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptir. Örneğin; diüretik olarak kullanılan Furosemid, HIV tedavisinde kullanılan Amprenavir, antibakteriyel ajan olarak Sülfatiazol ve sülfonamid bazlı bir ilaç olan Asetazolamid (Türkeş ve ark., 2019).

Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.

Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



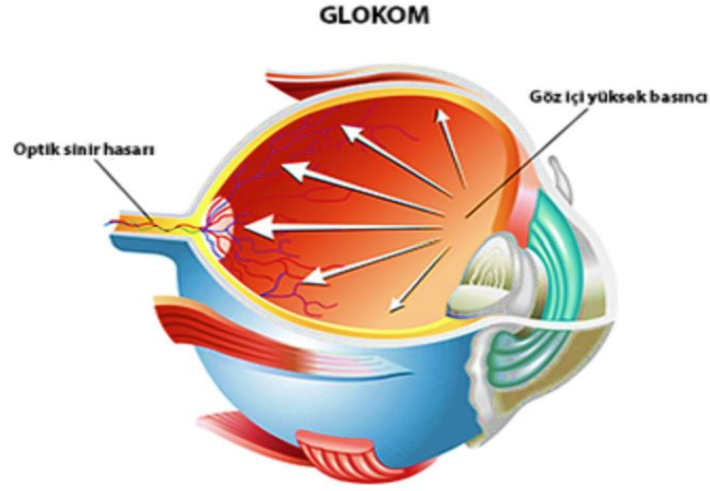
Şekil 2. 7. Sülfonamidlerin genel iyonlaşma reaksiyonu

Dünyanın pek çok bölgesinde ilaç tasarımı ve inhibitör geliştirme çalışmaları kapsamında yeni sülfonamid türevlerinin sentezi gerçekleştirilmektedir. Sentezlenen bileşiklerin belirli özelliklere sahip olması beklenir:

- Yüksek anti-enzim aktivitesi göstermesi,
- Yağda istenilen seviyede çözünürlük sağlaması,
- Su ve yağda dengeli bir çözünürlük sunması,
- Suda minimum %3 g/ml oranında çözünürlüğe sahip olması,
- Göz dokusuyla uyumlu olması,
- Yan etkilerinin bulunmaması ya da en az düzeyde olması (Gümüş, 2008).

2.10. Glokom

Glokom, optik sinirde meydana gelen hasar sonucu ortaya çıkan ve ileri derecede görme kaybına yol açan bir göz hastalığıdır. Hastalığın temelinde, retina ganglion hücrelerinin ve aksonlarının dejenerasyonu yatar. Glokomun oluşumunda rol oynayan çeşitli faktörler bulunmaktadır ancak en belirgin olanı göz içi basıncındaki (GİB) artıştır. Yüksek GİB, optik sinir liflerine zarar vererek, sinir liflerinde ve görme alanında hasara yol açar. Ancak, glokom vakalarının yaklaşık %20'sinde GİB normal sınırlarda olmasına rağmen optik sinir hasarı görülür. Bu durum, glokomun sadece GİB yüksekliği ile sınırlı olmadığını, oküler kan akışı gibi diğer faktörlerin de etkili olduğunu gösterir (Sugrue, 2000).



Şekil 2. 8. Glokom hastalığının şematize edilmiş görüntüsü

Glokomun dünya çapında 70 milyondan fazla insanı etkilediği belirtilmiştir. Bu hastalık kadınlarda erkeklere göre daha yaygın bir şekilde görülmektedir. Hastaların %15-20'sinde görme kaybına neden olmaktadır. Kataraktan sonra dünya üzerinde körlük nedenleri arasında ikinci sırada gelmektedir. Normal şartlar altında göz içi basıncı 10-30 mmHg aralığında kabul edilir ancak glokomlu hastalarda bu basınç 70 mmHg seviyesine kadar çıkabilir.

CA enzimleri, bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen iyonu (H^+) oluşturarak karbondioksitin (CO_2) hidrasyonunda rol alır. Bu süreç, göz içi sıvısı olan aköz humorun oluşumunda önemlidir. Asetazolamid, Diklorfenamid ve Metazolamid gibi sistemik inhibitör ilaçları, göz epitelindeki C II ve C IV izoformlarını inhibe ederek bikarbonat oranını azaltır ve göz içi sıvısının salgılanmasını yavaşlatır ancak sistemik inhibitörler vücuttaki diğer CA enzimlerini de etkileyebildiği için yan etkileri olabilir. Dorzolamid ve Brinzolamid gibi ilaçlar ise göze doğrudan uygulanır ve daha az sistemik yan etkiye sahiptir. Son araştırmalar, yeni sentezlenen inhibitör bileşiklerin özellikle CA II izoformu üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir. Bu durum, glokom tedavisinde kullanılan ilaçların, özellikle CA II izoformunu hedef alarak daha etkili olabileceğini düşündürmektedir (İmdat, 2019; Steele ve ark., 2009; Supuran ve ark., 2019).

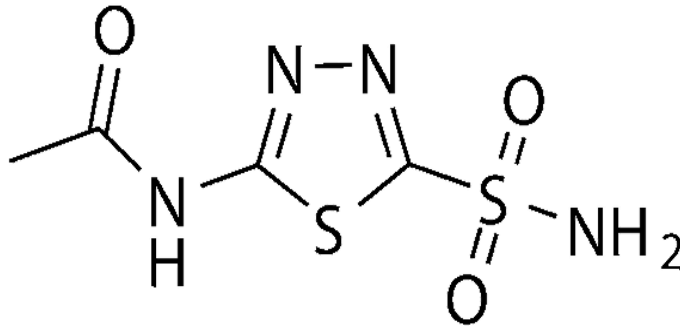
2.11. Sistemik Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Vücuda ağız yoluyla veya enjeksiyon yoluyla alınan ilaçlardır. Bunlar, kan dolaşımına karışarak tüm vücutta CA enzimini inhibe ederler. Asetazolamid, bu sınıfa dahil olan bir ilaçtır ve ilk olarak glokom tedavisinde kullanılmıştır. Ancak, sistemik kullanıma bağlı birçok yan etki görülebilir. Bu yan etkiler arasında diürez, metabolik ve solunum asidozu, pareteziler, GIS rahatsızlıkları, kilo kaybı, libido kaybı, halsizlik, hirsutizm, hipokalemi, hiperürisemi, karaciğer yetmezliği ve böbrek taşı oluşumu gibi durumlar yer alır. Nadir durumlarda, hayatı tehdit eden trombositopeni, agranülositoz veya aplastik anemi de görülebilir. Bu nedenle, gözdeki siliyer hücrelerde bulunan CA II, CA IV ve CA XII gibi izoformlara özgü inhibitörler geliştirmek hedeflenmektedir (Pfeiffer, 1997; Supuran, 2010).

2.11.1. Asetazolamid

Asetazolamid, CA enziminin non-kompetitif bir sülfonamid inhibitörüdür. İntraselüler ve ekstraselüler ortamlarda pH değişikliği yaparak etki gösterir (Di Fiore ve ark., 2009).

Asetazolamid; böbreklerde, proksimal tübüllerde CA enzimini inhibe ederek hidrojen iyonu (H^+) salgılanmasını azaltır. Bu durum, bikarbonat ve katyon atılımını artırır, idrarı alkalileştirir ve diüreze neden olur. Beyinde koroid pleksusta CA enzimini inhibe ederek beyin omurilik sıvısı (BOS) üretimini azaltır bu da kafa içi basıncını düşürmeye yardımcı olur. Gözde göz içi sıvısı üretimini azaltarak göz içi basıncını düşürür.



Şekil 2. 9. Asetazolamid yapısı N-(5-(aminosulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-il)-asetamid

Asetazolamid'in başlıca kullanım alanları şunlardır:

- Epilepsi: AAZ, fokal ve jeneralize nöbetlerin tedavisinde kullanılan bir antiepileptik ajandır. Özellikle diğer antiepileptik ilaçlara yanıt vermeyen hastalarda ek tedavi olarak kullanılabilir. Beyindeki pH seviyelerini etkileyerek, nöbet eşiğini yükseltir.
- Glokom: AAZ, göz içi sıvısı üretimini azaltarak göz içi basıncını düşürür.
- Ödem: AAZ, diüretik etkisi sayesinde vücuttaki aşırı sıvıyı atmaya yardımcı olur, böbreklerde bikarbonat reabsorpsiyonunu engelleyerek etki gösterir.
- Yüksek İrtifa Hastalığı: AAZ, yüksek irtifada görülen semptomları hafifletmek ve önlemek için kullanılabilir.
- Metabolik Alkaloz: AAZ, bikarbonat atılımını arttırarak kan pH'ını düşürür ve metabolik alkalozu düzeltmeye yardımcı olur. Özellikle mekanik ventilasyon altında olan kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) hastalarında görülen metabolik alkalozun tedavisinde kullanılır.
- İdiyopatik İntrakraniyal Hipertansiyon (IIH) ve BOS Kaçakları: AAZ, beyin omurilik sıvısı (BOS) üretimini azaltarak kafa içi basıncını düşürür ve baş ağrısı gibi semptomları hafifletebilir.
- İdrar Alkalizasyonu: AAZ, idrarı alkalize etmek için kullanılabilir. Özellikle yüksek doz metotreksat alan hastalarda metotreksat toksisitesini önlemek ve ürat ve sistin taş oluşumunu engellemek için kullanılabilir (Leaf ve Goldfarb, 2007; Van Berkel ve Elefritz, 2018).

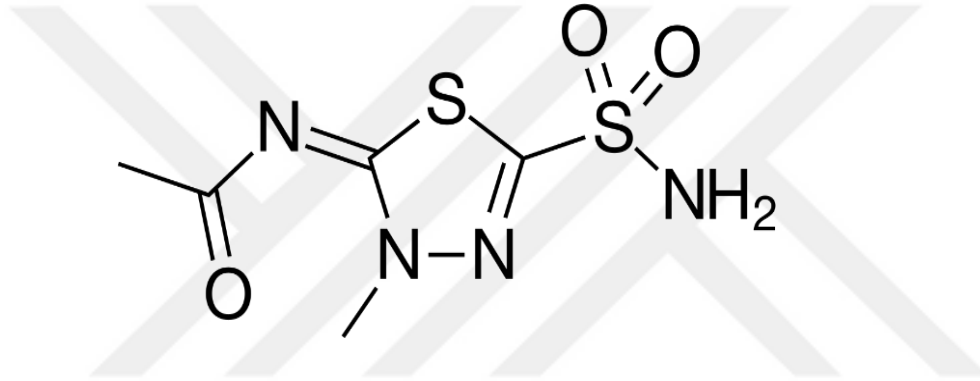
Asetazolamid'in yan etkileri arasında parestezi, uyuşukluk, baş ağrısı, iştahsızlık ve gastrointestinal rahatsızlıklar yer alır. Ayrıca, böbrek taşı oluşumu ve metabolik asidoza da neden olabilir. Asetazolamid, sülfonamid türevi olduğu için sülfonamid alerjisi olan hastalarda dikkatli kullanılmalıdır. Hamilelikte ise potansiyel teratojenik etkileri nedeniyle kullanılması önerilmez (Shukralla ve ark., 2022).

2.11.2. Metazolamid

Asetazolamid'e benzer bir güce sahip olmasına rağmen, fizikokimyasal özellikleri sayesinde vücutta daha farklı bir dağılım gösterir. Özellikle lipid çözünürlüğünün yüksek olması ve plazma proteinlerine düşük oranda bağlanması, dokulara ve sıvılara kolayca yayılmasını sağlar. Bu özelliği, Metazolamidi göz içi sıvısı salgısını azaltmada AAZ'den

daha etkili kılar. Metazolamid ayrıca, böbrekler tarafından salgılanmaz ve böbreklerde daha az etki gösterir.

Metazolamid, glokom tedavisinde, özellikle düşük dozlarda kullanıldığında göz içi basıncını düşürmede etkilidir ve bazı durumlarda AAZ'in yan etkilerine alternatif olarak da tercih edilir. Alzheimer tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji olarak incelenmektedir. Huntington hastalığı (HD) ve diğer inme semptomlarında nöroprotektif özelliklere sahiptir. Mitokondriyal H₂O₂ üretimini inhibe ederek sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu önleyerek nöron ve glial hücreleri korur. Akut dağ hastalığı ve yüksek irtifa serebral ödemi gibi durumlarda kullanılır.



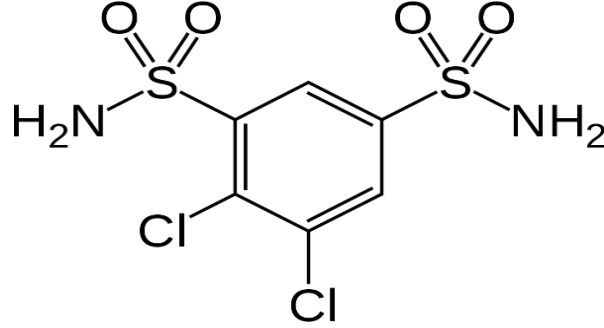
Şekil 2. 10. Metazolamid yapısı N-(3-Metil-5-sulfamoil-3H-1,3,4-tiadiazol-2-iliden) etanamid

Metazolamidin plazma yarı ömrü yaklaşık 14 saattir, bu da AAZ'den daha uzun süre etkili olmasını sağlar. Ayrıca, kan beyin bariyerini kolayca geçebilme özelliği sayesinde beyin dokusunda etkilidir. Düşük dozlarda kullanıldığında böbrekler üzerinde minimal etki gösterir, bu da asidoz ve böbrek taşı oluşumu riskini azaltır. Sonuç olarak, Metazolamid, çok yönlü bir ilaç olarak sadece glokom tedavisinde değil, aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli alanlarda da potansiyel kullanım alanları sunmaktadır (Fossati ve ark., 2016; Maren ve ark., 1977).

2.11.3. Diklorfenamid

Diklorfenamid, glokom tedavisinde kullanılan ilk jenerasyon sistemik CA inhibitörlerinden biridir. Etkili olmasına rağmen, yan etkileri nedeniyle günümüzde daha

çok topikal CA inhibitörlerinin tercih edildiği belirtilmektedir. Ancak, dirençli glokom vakalarında hala bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir (Masini ve ark., 2013).

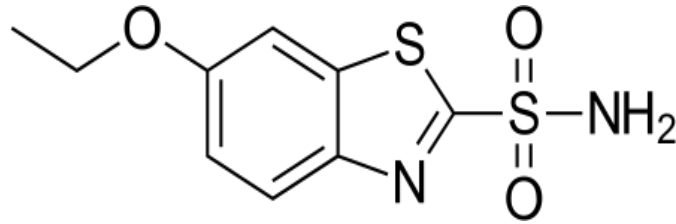


Şekil 2. 11. Diklorofenamid yapısı 4,5-diklorobenzen-1,3-disulfonamid

Diklofenamid ayrıca epilepsi, hipokalemik periyodik paralizi gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için klinik olarak kullanılır. Kullanımına bağlı olarak iştahsızlık, tat alma bozukluğu, ishal, baş dönmesi, kaşıntı, cilt döküntüsü, parestezi gibi yan etkiler de görülebilir (Tawil ve ark., 2000).

2.11.4. Etokzolamid

Etokszolamid, benzotiyazol-2-sülfonamid bazlı bir ilaç molekülüdür. *In vitro* klinik çalışmalarda en etkili CA inhibitörü olarak bilinir. Ancak *in vivo* çalışmalarda plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanması nedeniyle aktivitesi azalır (Durgun, 2004).



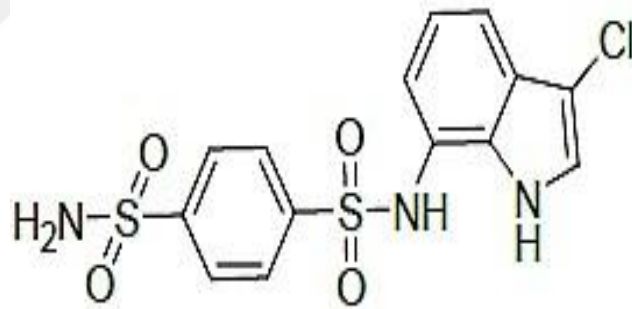
Şekil 2. 12. Etokzolamid yapısı 6-etoksibenzotiazol-2-sulfonamid

Etokszolamid etkisini; su, sodyum, potasyum ve bikarbonatın geri emilimini azaltmak amacıyla proksimal renal tübüllerdeki CA aktivitesini inhibe ederek gösterir. Glokom, duodenal ülser ve epilepsinin bazı formlarının tedavisinde kullanılır. Ayrıca diüretik olarak kullanım alanları da vardır (Birinci, 2017).

Oral yoldan 125 mg tablet şeklinde alındıktan sonra 2 saat içinde göz içi basıncı düşmeye başlar, 1-5 saat içinde en düşük seviyeye ulaşır ve 12 saat sonra temel hale geri döner (Durgun, 2004).

2.11.5. İndisulam

İndisulam, başlangıçta antitumor bir sülfonamid olarak geliştirilmiş ve klinik çalışmalara girmiş bir CA inhibitörüdür. 1999'da hücre döngüsünün G1 fazını hedefleyen bir ilaç olarak tanımlanmış olsa da daha sonra güçlü bir CA inhibitörü olduğu anlaşılmıştır. İndisulam, hem sitozolik CA izoformları I ve II'yi hem de tümörlerle ilişkili transmembran izoformları CA IX ve CA XII'yi etkili bir şekilde inhibe eder (Supuran, 2018; Vullo ve ark., 2005).

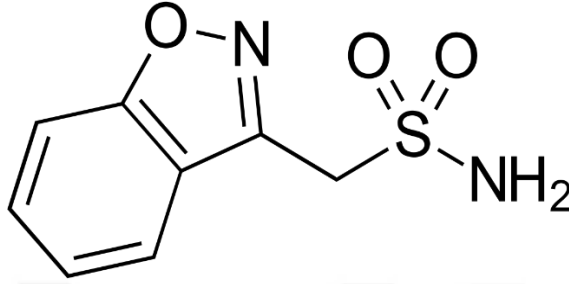


Sekil 2. 13. İndisulam yapısı N-(3-kloro-7-indolil)-1,4-benzendisulfonamid

2.11.6. Zonisamid

Zonisamid, çok yönlü etki mekanizmaları ile öne çıkan hem antiepileptik hem de nöroprotektif özelliklere sahip bir ilaçtır. Geleneksel olarak epilepsi tedavisinde kullanılan bu ilaç, voltaja duyarlı sodyum ve T-tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek nöronal membranları stabilize eder ve nöbetlerin yayılmasını engeller.

Zonisamid, Parkinson hastalığının (PH) tedavisinde özellikle L-dopa tedavisine yeterli yanıt vermeyen hastalarda motor fonksiyonları iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Bazı çalışmalar, Zonisamidin alkol tüketimini azalttığını ve alkol yoksunluk semptomlarını hafiflettiğini de göstermiştir (Krupa ve ark., 2013).



Şekil 2. 14. Zonisamid yapısı 1,2-benzisokazol-3-metansülfonamid

Zonisamid, yapısal olarak sülfonamid türevi olmasına rağmen, CA inhibitörü olarak diğer sülfonamidlere kıyasla çok daha zayıf bir etkiye sahiptir. Bu durum, Zonisamidin moleküler yapısındaki metilen grubundan kaynaklanmaktadır. İlaç, CA enzimini inhibe etse de bu inhibisyon için gerekli olan dozlar, anti-epileptik etki için kullanılan dozlardan 100 ila 1000 kat daha yüksektir. Bu nedenle, Zonisamidin terapötik dozlarda CA inhibisyonunun klinik açıdan anlamlı olmadığı kabul edilir (Leppik, 2004).

2.12. Topikal Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Sistemik CA inhibitörleri, göz içi basıncını düşürmede etkili olsalar da vücutta yaygın yan etkilere neden olmaktadır. Bu yan etkiler, ilacı kullananların yaklaşık %50'sinin ilacı tolere edememesine yol açmaktadır. Bu nedenle, göze doğrudan uygulanan topikal bir CA inhibitörünün, daha düşük dozlarda ve daha az yan etkiyle aynı tedavi edici etkiyi gösterebileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Bu düşünceden yola çıkılarak AAZ'in topikal olarak kullanımını hedeflemiş ancak bu denemeler başarısız olmuştur.

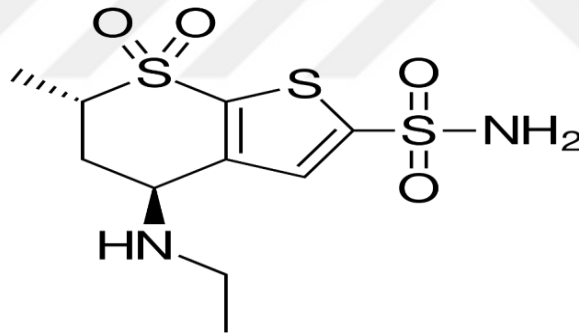
Topikal CA inhibitörlerinin geliştirilmesindeki temel amaç, sistemik CA inhibitörleri ilaçların korneadan geçerek siliyer cisimdeki CA enzimlerine ulaşmasını sağlayacak uygun fizikokimyasal özelliklere sahip olmamasıydı. Bu sorunun üstesinden gelmek için, suda çözünabilirliği yüksek ve lipid çözünürlüğü dengeli Dorzolamid ve Brinzolamid gibi yeni moleküller tasarlanmıştır.

Topikal CA inhibitörleri, sistemik ilaçlara kıyasla daha az yan etkiyle göz içi basıncını düşürme potansiyeline sahiptir. Ancak, topikal ilaçların da batma, yanma, kızarıklık gibi bazı yan etkileri olabileceği ve bazı durumlarda kontakt alerjisi ve daha ciddi sorunlara yol açabileceği unutulmamalıdır (Mincione ve ark., 2008; Taşkesen, 2002).

2.12.1. Dorzolamid

Dorzolamid, 1995 yılında FDA onayı alarak ticari olarak piyasaya sürülen ilk topikal CA inhibitörüdür. Glokom tedavisinde önemli bir gelişme olarak kabul edilen bu ilaç, Tiyopiran-2-sülfonamid yapısına sahip bir molekül olup, yüksek kornea geçirgenliğine sahiptir (Storgaard ve ark., 2021).

Dorzolamid, özellikle CA II izoformunu selektif olarak inhibe ederek etkisini gösterir. Bu özelliği sayesinde, sistemik yan etkileri daha yüksek olan AAZ'e bir alternatif olarak kullanılabilir. İntraoküler hipertansiyon olmak üzere çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan ilaç, topikal oftalmik olarak %2'lik bir çözelti şeklinde uygulanır. Bu sayede ilacın doğrudan göz üzerinde etki göstermesi sağlanır.



Şekil 2. 15. Dorzolamid yapısı 4-Etilamino-6-metil-7,7-diokso-4,5,6,7-tetrahidro-7λ6-thieno[2,3-b]tiopiran-2- sülfonamid

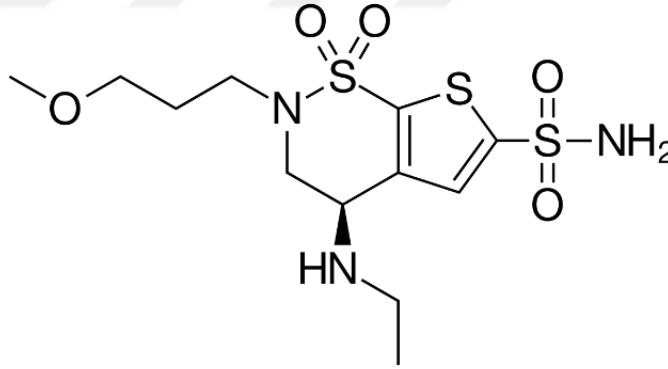
Bazı çalışmalarda, uzun süreli Dorzolamid kullanımının kornea endotel hücrelerinde azalmaya yol açabileceği belirtilmiştir. Bu nedenle özellikle yaşlı hastaların ve kornea rahatsızlığı olan kişilerin bu ilacı kullanırken daha dikkatli olması gerekmektedir (Cumurcu, 2008).

Kardiyovasküler ve pulmoner yan etkilerin olmaması, Dorzolamidi yüksek göz içi basıncının tedavisi için ilk tercih edilen ilaçlardan biri yapmıştır (Pfeiffer, 1997).

İlacın göz içi basıncını %18 oranında azalttığı düşünülmektedir. Dorzolamid, genellikle timolol gibi beta blokerlerle kombine olarak kullanılır. Bu kombinasyon, GİB'i daha etkin düşürmeye yardımcı olabilir. Rosenberg ve ekibinin 1998 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmada, sistemik AAZ ve topikal Dorzolamid'in göz içi basıncı (GİB) ve aköz hümr oluşumunu azaltmadaki kombinasyon etkileri incelenmiştir. Araştırma sonuçları, bu ilaçların tek başına kullanıldıklarında sağladıkları maksimum etkiye ek bir avantaj sunmadığını göstermiştir. Bu nedenle, topikal ve sistemik bir CA inhibitörünün birlikte kullanılmasına gerek görülmemiştir (Kibar, 2015; Lippa ve ark., 1992; Rosenberg ve ark., 1998).

2.12.2. Brinzolamid

Brinzolamid, açık açılı glokom veya oküler hipertansiyonu olan bireylerde göz içi basıncını (GİB) düşürmek için kullanılan, topikal olarak uygulanan, heterosiklik bir sülfonamid CA inhibitörüdür. 1999 yılında glokom tedavisi için onaylanmıştır. Siliyer epitelyumda bulunan insan CA II izoformuna inhibe ederek etkisini gösterir (Masini ve ark., 2013; Sall ve ark., 2000).



Şekil 2. 16. Brinzolamid yapısı 5R)-5-etilamino-3-(3-metoksipropil)-2,2-diokso- 2λ6,9-ditia-3-azabisiklo [4.3.0]nona 7,10-dien-8-sülfonamid

Topikal olarak uygulandığında sistemik dolaşıma girer ancak eritrositlere bağlanarak plazmada düşük konsantrasyonlarda kalır. Bu durum, sistemik yan etki riskini azaltır (Iester, 2008).

%1'lik konsantrasyonu günde 2 kez olacak şekilde uygulanması önerilmektedir. Ağızda acı tat ve gözde irritasyona sebep olabilir (Masini ve ark., 2013).

2.13. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Karşılaştırılması

- Dorzolamid, GİB'yi %23'e kadar azaltırken, oral AAZ yaklaşık %30 oranında azaltır.
- Dorzolamid, göz sıvısı akışını %17'ye kadar engellerken, AAZ göz sıvısı akışını %30'a kadar engeller.
- Yaygın olarak kullanılan %2 Dorzolamid çözeltisi, GİB'yi düşürmede neredeyse %1 AAZ oftalmik çözeltiye eşdeğerdir.
- Raporlara göre, günde 2-3 kez %2 Dorzolamid solüsyonu aldıktan sonra, hastaların %19'unda göz yanması ve %12'sinde göz ağrısı tespit edilmiştir.
- Günde 3 kez %12 Brinzolamid kullanmak GİB'yi %20,3 oranında azaltabilir.
- AAZ ile karşılaştırıldığında Metazolamid, GİB'yi düşürmede daha az etkiye sahiptir.
- AAZ, Dorzolamid ve Brinzolamide göre güvenilirliği ve düşük maliyeti olduğu için etkili topikal preparatların geliştirilmesinde, AAZ'ın uzun süreli klinik çalışmaları yapılmıştır.
- Zonisamid yavaş emilir ve diğer antiepileptik ilaçlarla karşılaştırıldığında yarılanma ömrü daha uzundur.
- Dorzolamidin göz içi basıncını düşürme etkisi, ortalama 4.5-5.9 mmHg iken, Brinzolamidin etkisi ortalama 4.4-4.5 mmHg olarak bulunmuştur.
- Brinzolamid, Dorzolamidden daha lipofilik (yağda çözünebilir) özelliktedir.
- Brinzolamid, fizyolojik pH'a (yaklaşık 7.5) yakın bir pH'ta formüle edilmiş sulu bir süspansiyondur. Bu, Dorzolamidin asidik çözeltisine (pH 5.6) kıyasla daha az batma hissi yaratır (Gugleta, 2010; Iester, 2008; Mert, 2014).

2.14. Karbonik Anhidraz Aktivasyonu

Karbonik anhidraz enzimi aktivatörleri, CA enziminin katalitik aktivitesini artıran moleküllerdir. İnhibitörlere kıyasla daha az ilgi görmüş olsa da aktivatörlerin potansiyel terapötik kullanımları giderek artmaktadır. Bu aktivatörler, enzimin aktif bölgesine bağlanarak veya proton transferini kolaylaştırarak enzimin etkinliğini yükseltirler (Dave ve ark., 2011).

Karbonik anhidraz aktivatörleri, temelde protonlanabilir gruplar içeren doğal bileşiklerdir ve genellikle biyojenik aminler, amino asitler ve peptitler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılır.

Biyojenik aminler sınıfı, histamin, serotonin, dopamin, adrenalin gibi katekolaminler gibi bileşikler içerir. Amino asitler sınıfı, L- ve D-histidin, L- ve D-fenilalanin, L- ve D-tirozin, L- ve D-DOPA, D-triptofan ve glutamat gibi çeşitli amino asitleri kapsar. Peptitler ise karnosine (β -Ala-His) türevleri, dipeptitler, tripeptitler/tetrapeptitler gibi çeşitli peptitleri içerir. Ayrıca, imidazol türevleri, piridinyum tuzları, amino-azoller ve sülfonilüreido türevleri gibi diğer yapılar da CA aktivatörü olarak işlev görebilir. Bazı aktivatörler, özellikle histamin türevleri ve peptidomimetik yapılar, daha yüksek aktivasyon potansiyeli göstermektedir (Kuzu ve ark., 2016; Supuran ve Scozzafava, 2002; Vullo ve ark., 2016).

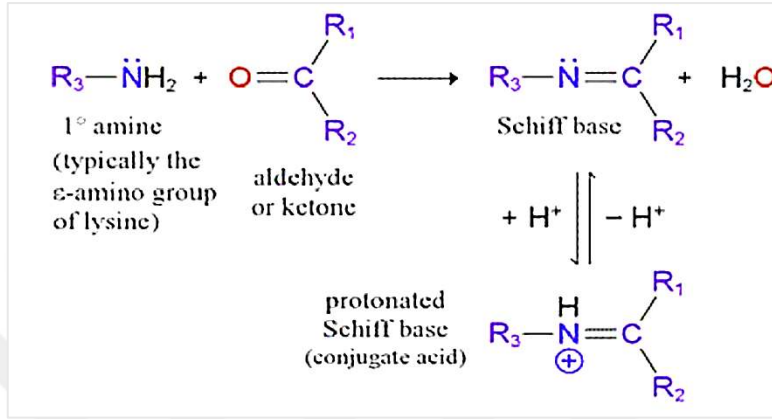
Bu enzimin aktivasyonunu sağlayan maddeler aynı zamanda, Alzheimer hastalığı gibi CA I ve CA II izoformlarının aktivitesinin azaldığı veya dengesizleştiği durumlarda terapötik bir çözüm olarak kullanılabilir. Bazı çalışmalarda, Fenilalanin gibi CA aktivatörlerinin deneysel hayvanlarda sinaptik etkinliği, mekansal öğrenmeyi ve hafızayı geliştirdiği gösterilmiştir. Bu durum, CA izoformlarının bilişsel fonksiyonlardaki önemini ortaya koymaktadır (Temperini ve ark., 2006).

2.15. Schiff Bazları

Schiff bazları, aldehit veya ketonların primer aminlerle reaksiyonu sonucu elde edilen bileşiklerdir. Yapılarında $C=N$ (imin veya azometin) grubu bulundurulur ve genel formülleri $R_1R_2C=NR_3$ şeklindedir. Bu formüldeki R_1 , R_2 ve/veya R_3 grupları alkil veya aril sübstitüentleridir. Schiff bazları, imin grubuna bağlı sübstitüentlere göre değişen özellikler gösterirler. Azot atomuna bağlı elektronegatif bir grup bulunduğunda, azometin bileşiğinin kararlılığı artar.

Schiff bazı sentezinin en yaygın yöntemlerden biri olan aldehit veya ketonların primer aminlerle reaksiyonu genellikle etanol gibi bir çözücü ortamında, oda sıcaklığında veya geri soğutucu altında gerçekleştirilir. Reaksiyon ortamına su tutucu maddelerin (örn. $MgSO_4$) eklenmesi, Schiff bazının oluşumunu kolaylaştırır. Ayrıca, organometalik bileşiklerin nitrillerle reaksiyonu, aminlerin yükseltgenmesi ve metal amitlerin

reaksiyonu gibi alternatif yöntemler de kullanılmaktadır. Schiff bazı oluşumu iki aşamalı bir mekanizmayı takip eder; İlk aşamada, nükleofilik amin kısmi pozitif yük taşıyan karbonil karbonuna katılır. İkinci aşamada ise, azot bir proton kaybeder ve oksijene bir proton bağlanır. Daha sonra protonlanmış OH grubu su olarak ayrılır ve ‘Schiff bazı’ oluşur (Esmer Demir, 2019).



Şekil 2. 17. Schiff Bazının oluşumuna ilişkin genel şema

Reaksiyonun gerçekleştiği çözücüler ve ortamın pH değeri Schiff bazının sentezinde önemlidir. Uygun reaksiyon şartları sağlandığında farklı çözücüler kullanılabilirken, etanol genellikle daha iyi sonuçlar verir. İmin oluşumu pH’a bağımlı bir tepkimedir, en uygun pH aralığı ise 3-4 arasındadır. Bu pH değeri, nükleofilik katılma tepkimesini başlatmak ve yeterli hızda ayrılmanın gerçekleşmesi için yeterlidir. Amonyak kullanılarak elde edilen Schiff bazları dayanıklı değildir ve bekletildiğinde polimerleşebilir. Bu nedenle, daha dayanıklı bileşikler elde etmek için birincil aminler tercih edilmelidir (Değirmencioglu, 2010; Esmer Demir, 2019).

Schiff bazlarının önemi, geniş kullanım alanlarından ve çeşitli özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Erime noktalarının kesin olmasından dolayı karbonil bileşiklerinin tanınmasında, metallerle koordinasyon bileşiği verme özelliklerinden dolayı metal miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Schiff bazları ayrıca sentetik oksijen taşıyıcısı, enzimatik reaksiyonlarda ara ürün, antitümör ajanı olarak kullanılmaktadır. Metal iyonlarına karşı seçici ve spesifik tepkimeler göstererek analitik kimyada spektrofotometrik reaktif olarak kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki önemi her

geçen gün artmakta, kemoterapide, oksijen taşıyıcı olarak, antistatik madde olarak ve boyarmadde endüstrisinde kullanılmaktadır

Schiff bazlarının antimikrobiyal etkileri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve bu bileşiklerin antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktiviteler gösterdiği belirlenmiştir. Bazı çalışmalar, Schiff bazlarının lipofilik özelliklerinin, Gram-negatif bakterilerin membran geçirgenliğini artırarak antimikrobiyal etkilerini güçlendirdiğini göstermiştir. Cr^{+3} (krom) ve Fe^{+3} (demir) kompleksleri, *Aspergillus sp.*'ye karşı daha yüksek antifungal aktiviteye sahiptir. Bazı araştırmalar, Cu^{+2} (bakır) komplekslerinin diğer komplekslere göre daha yüksek antifungal aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. 2-Aminometiltiyofenil-4-bromosalisilaldehit Schiff bazı ve metal komplekslerinin, Gram-pozitif bakterilere karşı daha aktif olduğu kanıtlanmıştır (Kumar ve ark., 2009; Abu-Dief ve ark., 2015).

Genel olarak, Schiff bazlarının ve metal komplekslerinin antimikrobiyal aktiviteleri, yapılarına, metal türüne, ligandlara ve kullanılan mikroorganizmaya bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu nedenle, farklı Schiff bazları ve kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar, antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi için önemli potansiyel sunmaktadır (Değirmencioğlu, 2010).

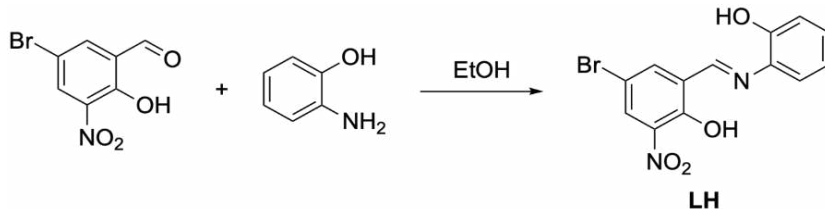
3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Ekipmanlar

Araştırmamız, Erzincan Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. UV spektrofotometre, buzdolabı, pH metre, hassas terazi, otomatik pipetler, vorteks ekipmanları kullanılmıştır. Ekipmanların kalibrasyonu ve kontrol takibi düzenli olarak yapılmaktadır. Çalışmaya başlamadan önce ekipmanlar, olası hataları en aza indirmek amacıyla güven aralığı içinde dikkatlice kontrol edilmektedir.

3.2. Hedeflenen LH Ligandının Sentezi

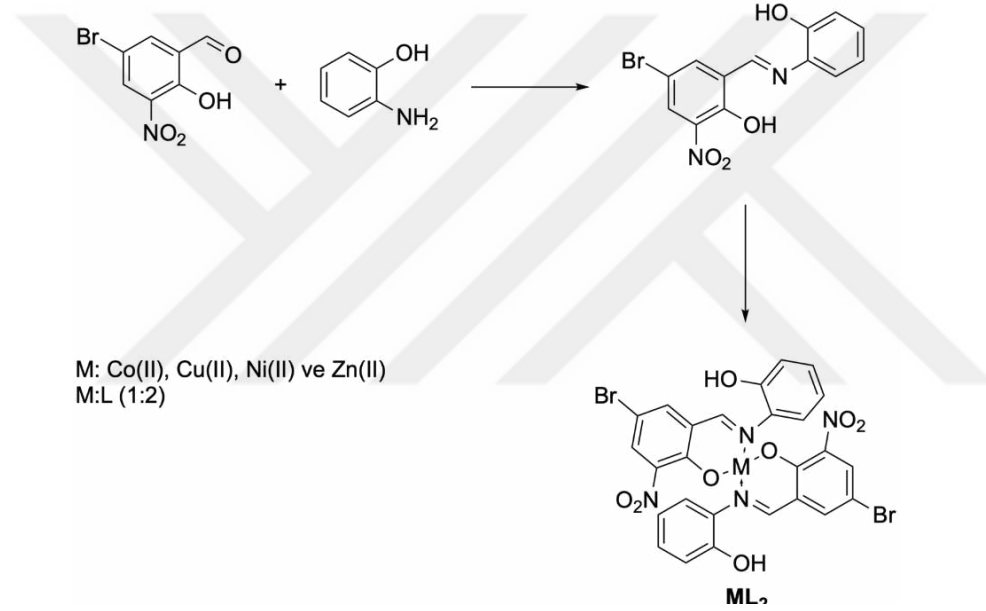
2,46 g (10 mmol) 5-Brom-2-hidroksi-3-nitrobenzaldehit, 20 mL mutlak etil alkolde çözülerek paralel sentez cihazındaki 100 mL'lik balona ilave edildi. 20 mL mutlak etil alkol içerisinde çözünmüş olan 1,09 g (10 mmol) 2-aminofenol ve 0,01 g *p*-toluen sülfonik asit yavaş yavaş bu çözeltiye damlatıldı. Reaksiyon 50-60 °C'de yaklaşık 2-4 saatte gerçekleştirildi. Reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı FT-IR spektrometresinde karbonil piki ile takip edildi. Sentezlenen ürün bir müddet bekletildikten sonra sıcak saf su, etil alkol ve dietil eter ile yıkandı. Daha sonra vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010).



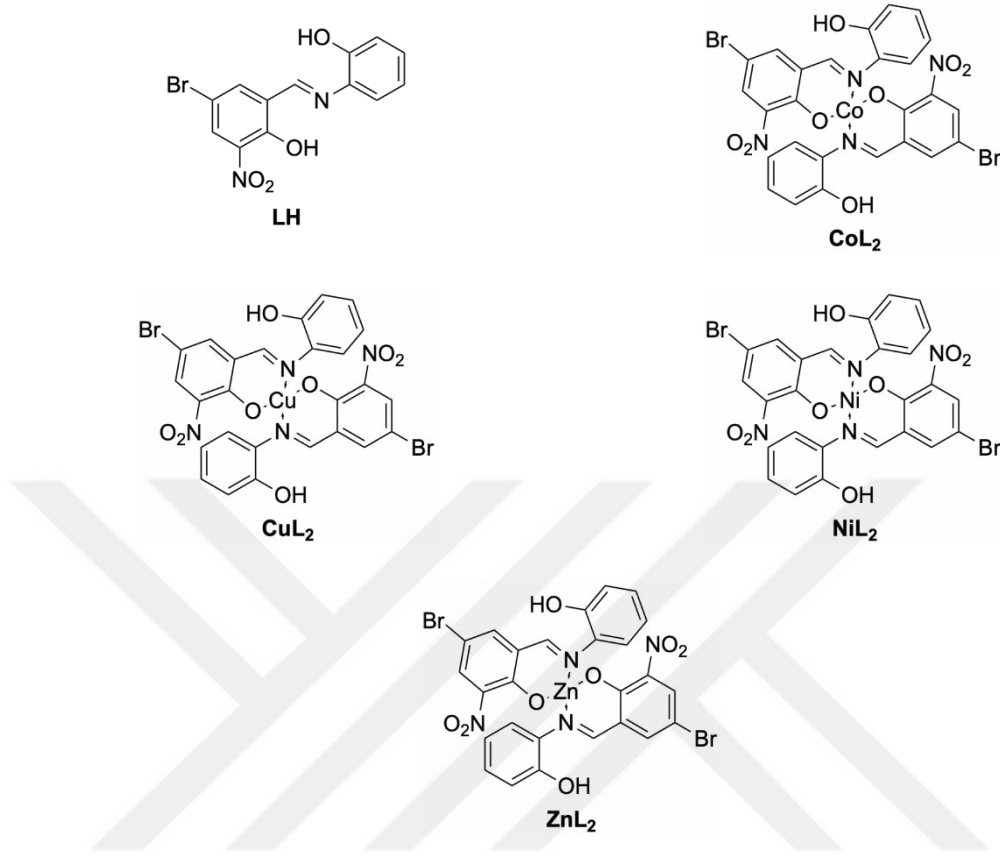
Şekil 3. 1. Hedeflenen LH ligandının sentez mekanizması

3.3. Hedeflenen Metal Komplekslerinin Sentezi

0,594 g (1,00 mmol) LH ligandı 10 mL mutlak etil alkolde çözülerek paralel sentez cihazındaki 50 mL'lik balon içerisine konuldu ve bu çözeltiye 10 mL mutlak etil alkolde çözülen metal asetatları (0,50 mmol, 0,125 g Co^{+2} asetatetrahidrat, 0,50 mmol, 0,10 g Cu^{+2} asetatmonohidrat, 0,50 mmol, 0,124 g Ni^{+2} asetatetrahidrat ve 0,50 mmol, 0,110 g Zn^{+2} (asetatdihidrat) damlatma hunisi vasıtasıyla karıştırıldı. Reaksiyon 50-60 °C'de yaklaşık 2-4 saatte gerçekleştirildi. Sentezlenen ürünler bir müddet bekletildikten sonra sıcak saf su, etil alkol ve dietil eter ile yıkandı. Daha sonra vakum altında kurutuldu (Canpolat, 2003; Tuna, 2010)



Şekil 3. 2. Hedeflenen metal komplekslerinin (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2) sentez mekanizması

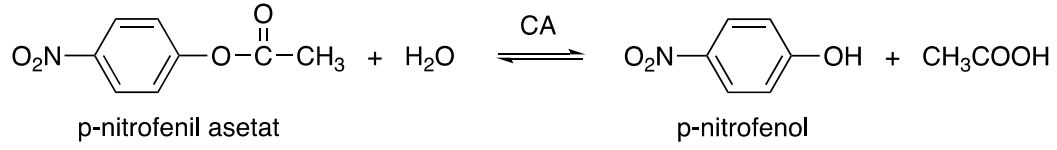


Şekil 3.3. Hedeflenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂)’nin kimyasal yapı

3.4. *h*CA I ve II izoenzimlerinin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

- 0,05 M Tris/SO₄ (pH:7,4) tampon çözeltisi: 6,055 g tris 950 ml destile suda çözülür. 1 N H₂SO₄ çözeltisi ile pH 7,4’e ayarlanır. Daha sonra toplam hacim destile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.
- 3 mM p-nitrofenilasetat çözeltisi (substrat): 27,2 mg p-nitrofenilasetat alınarak 1 ml asetonunda çözülür. Karışım 49 ml destile suya manyetik karıştırıcı eşliğinde yavaş yavaş ilave edilir.

3.5. hCA I ve II izoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayini



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

EU/ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

ε : p-nitrofenol'ün molar ekstinksiyon katsayısı ($5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_T : Toplam küvet hacmi (ml)

V_E : Enzim numunesinin hacmi (ml)

f : Seyreltme faktörü

*Absorbans artışı 348 nm'de üç dakikalık süreyle ölçülür ve birer dakika aralıklarla sonuçlar kaydedilir

Tablo 3.1. CA aktivite tayin yönteminde kullanılan küvet içeriği ve madde miktarları

Stok Aktivite Çözeltileri	Kontrol Küveti (μl)	Numune Küveti (μl)
Tris/ SO_4	467	467
P-nitrofenilasetat	333	333
Destile Su	167	Değişken
Enzim	33	33
İnhibitör	0	Değişken

4. BULGULAR

4.1. *h*CA I ve II izoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Sentezlenen Schiff Bazı Bileşiklerinin Etkilerinin İncelenmesinin Sonuçları

*h*CA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin etkilerini belirlemek amacıyla bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgiler ışığında [Konsantrasyon]-Aktivite % grafikleri çizildi.

Tablo 4. 1 *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin IC50 değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
370,78	90,28
519,09	77,78
667,40	55,56
815,71	48,61
964,02	34,72

Tablo 4. 2 *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CoL_2 bileşiğinin IC50 değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
40,11	79,17
80,22	62,50
120,33	48,61
160,44	37,50
200,55	29,17

Tablo 4. 3 *hCA* I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CuL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
238,90	72,22
318,53	58,33
398,16	51,39
477,79	37,50
557,42	27,78

Tablo 4. 4 *hCA* I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi NiL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
321,01	83,33
481,51	62,50
642,01	48,61
802,52	34,72
963,02	27,78

Tablo 4. 5 *hCA* I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi ZnL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
317,60	76,39
476,40	58,33
635,20	48,61
794,00	38,89
952,80	33,33

Tablo 4. 6 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
593,24	82,22
815,71	62,22
1038,18	48,89
1260,64	42,22
1483,11	35,56

Tablo 4. 7 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CoL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
200,55	75,56
320,88	64,44
441,21	48,89
561,55	35,56
681,88	28,89

Tablo 4. 8 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CuL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

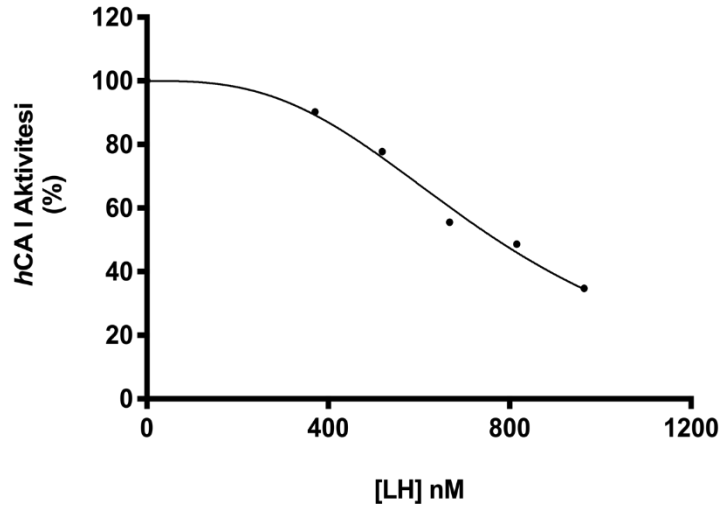
İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
199,08	82,22
318,53	68,89
437,97	48,89
557,42	31,11
676,87	20,00

Tablo 4. 9 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi NiL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

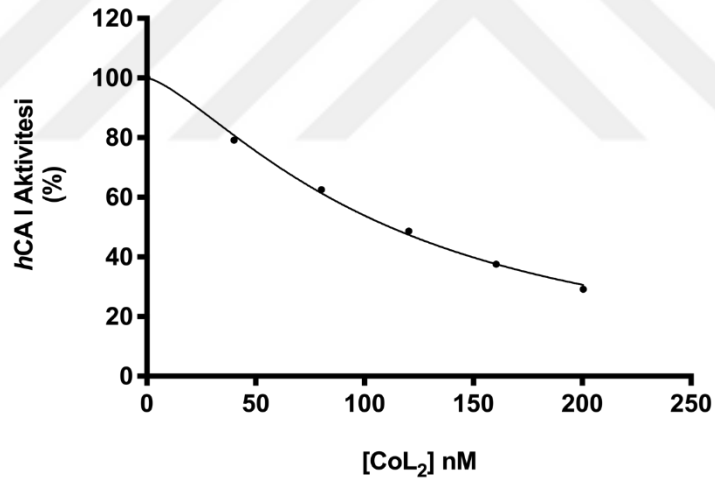
İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
160,50	84,44
240,76	66,67
321,01	51,11
401,26	42,22
481,51	33,33

Tablo 4. 10 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi ZnL_2 bileşiğinin IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan madde konsantrasyonları

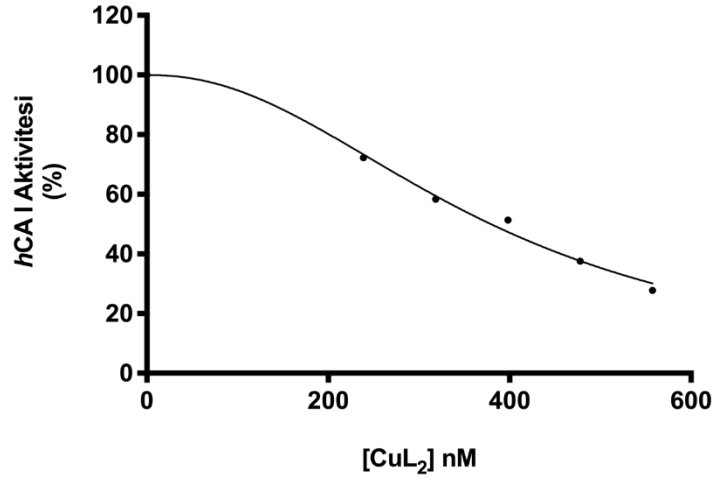
İnhibitör Konsantrasyonu (nM)	Aktivite (%)
0	100
317,60	78,95
476,40	65,79
635,20	52,63
794,00	39,47
952,80	31,58



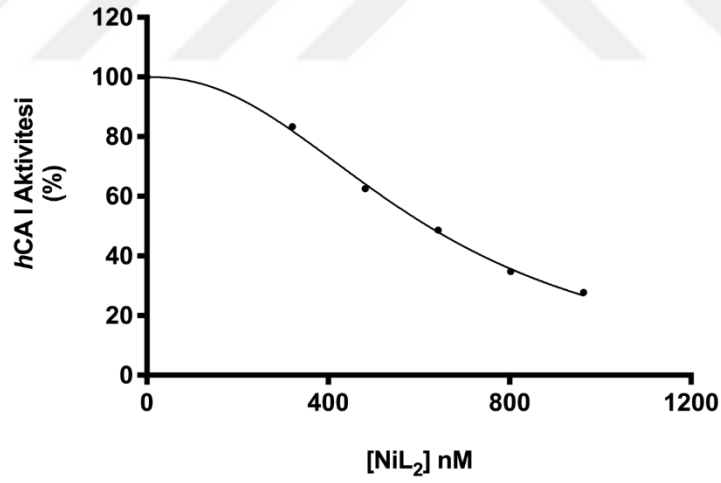
Şekil 4. 1. *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin etkisini gösteren ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



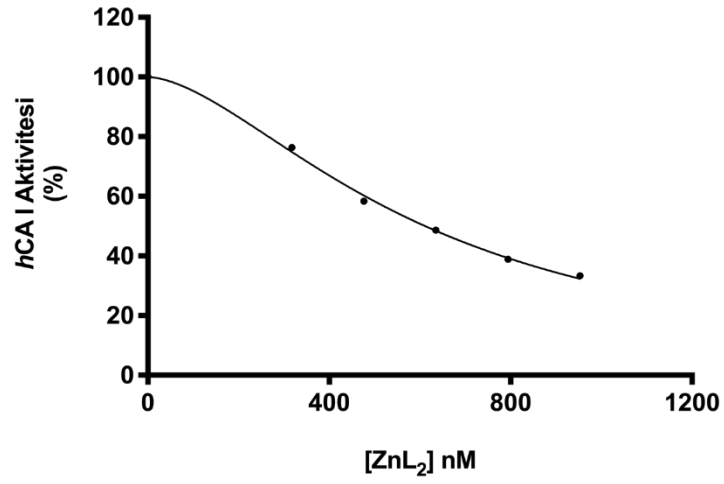
Şekil 4. 2. *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CoL₂ bileşiğinin etkisini gösteren ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



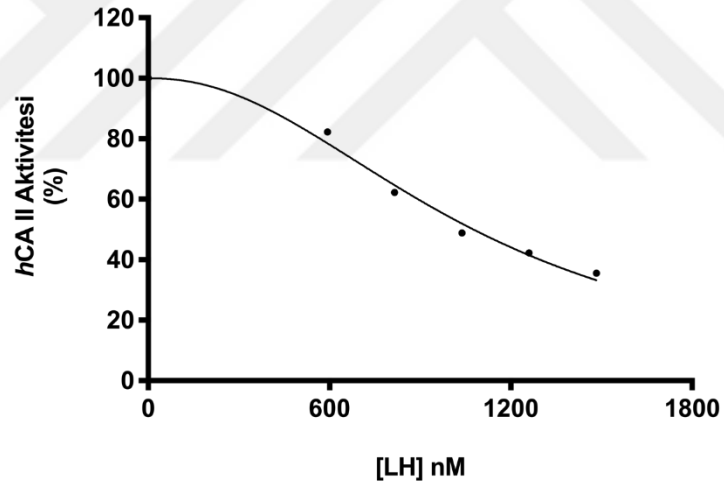
Şekil 4. 3. *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CuL₂ bileşiğinin etkisini gösteren ve *IC*₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



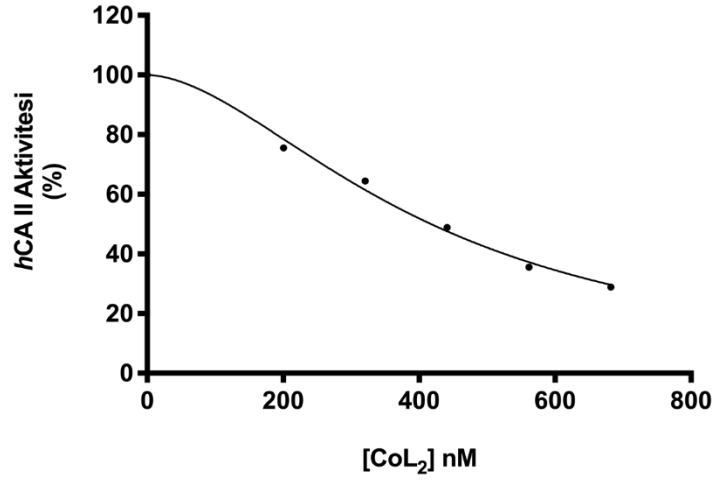
Şekil 4. 4. *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi NiL₂ bileşiğinin etkisini gösteren ve *IC*₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



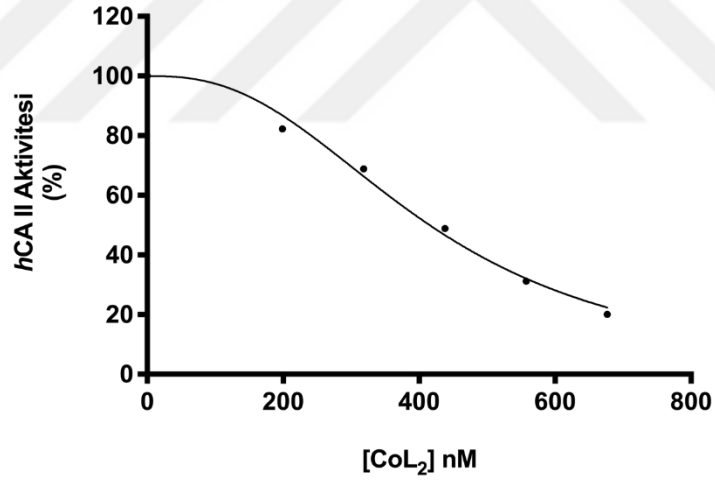
Şekil 4. 5. *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi ZnL₂ bileşiğinin etkisini gösteren ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



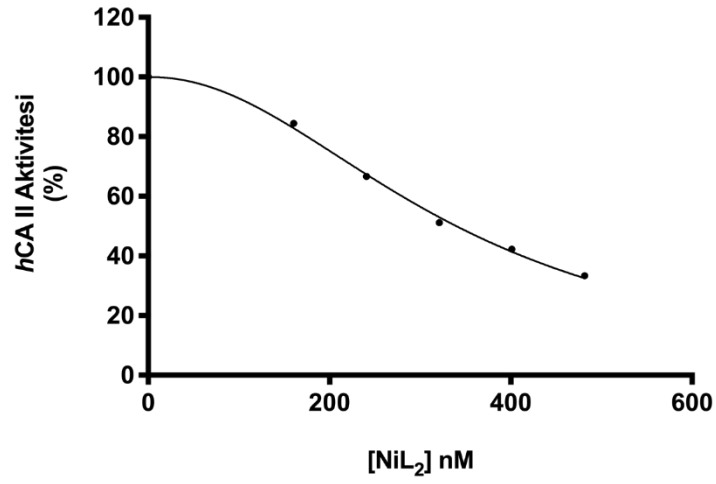
Şekil 4. 6. *hCA II* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin etkisini gösteren ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



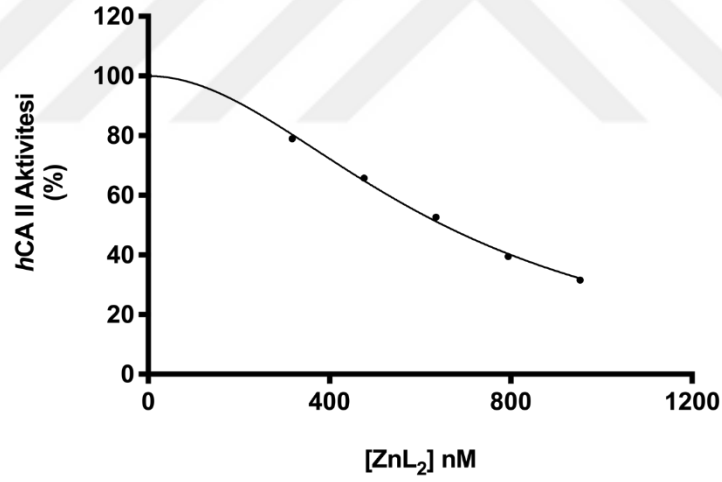
Şekil 4. 7. *hCA II* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CoL₂ bileşiğinin etkisini gösteren ve *IC*₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



Şekil 4. 8. *hCA II* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CuL₂ bileşiğinin etkisini gösteren ve *IC*₅₀ değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



Şekil 4. 9. *hCA II* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi NiL_2 bileşiğinin etkisini gösteren ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği



Şekil 4. 10. *hCA II* izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi ZnL_2 bileşiğinin etkisini gösteren ve IC_{50} değerinin belirlenmesi için kullanılan [Konsantrasyon] - Aktivite % grafiği

4.2. *h*CA I ve II izoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren Sentezlenen Schiff Bazı Türevleri İçin K_I Sabitlerinin Belirlenmesine Ait Çalışmaların Sonuçları

*h*CA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin K_I sabitlerini tespit etmek amacıyla sabit üç uygun madde konsantrasyonu ve beş substrat konsantrasyonu belirlenerek aktiviteleri ölçüldü. Bu değerler yardımıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_I sabitleri hesaplandı (Lineweaver and Burk 1934).

Tablo 4. 11 *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	222,47 nM	335,19 nM	504,26 nM
0,150	0,035	0,032	0,031	0,028
0,300	0,076	0,054	0,048	0,045
0,450	0,113	0,082	0,074	0,060
0,600	0,141	0,102	0,099	0,085
0,750	0,172	0,118	0,123	0,105

Tablo 4. 12 *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CoL_2 bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	64,18 nM	96,27 nM	144,4 nM
0,150	0,031	0,019	0,021	0,017
0,300	0,071	0,044	0,040	0,033
0,450	0,105	0,067	0,062	0,048
0,600	0,135	0,095	0,078	0,062
0,750	0,164	0,099	0,080	0,070

Tablo 4. 13 *hCA* I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CuL_2 bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	106,71 nM	159,27 nM	238,9 nM
0,150	0,029	0,024	0,024	0,020
0,300	0,066	0,049	0,049	0,042
0,450	0,101	0,077	0,076	0,067
0,600	0,136	0,104	0,090	0,084
0,750	0,172	0,120	0,105	0,089

Tablo 4. 14 *hCA* I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi NiL_2 bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	240,76 nM	361,14 nM	542,51 nM
0,150	0,032	0,023	0,020	0,019
0,300	0,071	0,046	0,044	0,042
0,450	0,109	0,074	0,066	0,066
0,600	0,142	0,095	0,083	0,080
0,750	0,178	0,116	0,101	0,091

Tablo 4. 15 *hCA* I izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi ZnL_2 bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	211,21 nM	317,61 nM	476,41 nM
0,150	0,033	0,027	0,025	0,022
0,300	0,073	0,051	0,050	0,042
0,450	0,108	0,072	0,065	0,060
0,600	0,141	0,099	0,087	0,083
0,750	0,173	0,114	0,105	0,099

Tablo 4. 16 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	474,6 nM	711,9 nM	1067,84 nM
0,150	0,042	0,026	0,025	0,022
0,300	0,076	0,051	0,051	0,040
0,450	0,099	0,059	0,055	0,051
0,600	0,114	0,080	0,065	0,053
0,750	0,123	0,083	0,076	0,062

Tablo 4. 17 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CoL_2 bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	240,67 nM	361 nM	542,3 nM
0,150	0,040	0,028	0,027	0,021
0,300	0,075	0,052	0,053	0,042
0,450	0,098	0,065	0,058	0,049
0,600	0,114	0,083	0,074	0,063
0,750	0,124	0,097	0,087	0,079

Tablo 4. 18 *hCA* II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi CuL_2 bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

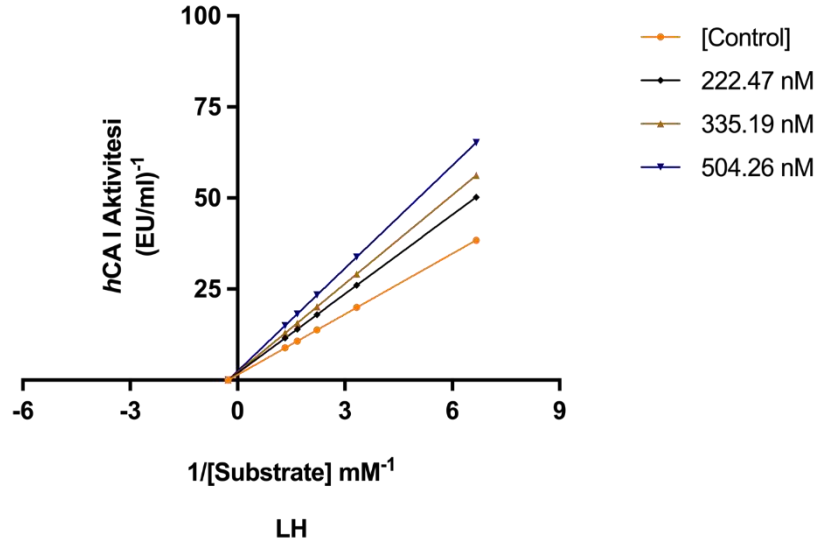
Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	170,42 nM	254,83 nM	382,24 nM
0,150	0,032	0,024	0,022	0,021
0,300	0,065	0,047	0,048	0,040
0,450	0,094	0,065	0,060	0,060
0,600	0,118	0,083	0,076	0,070
0,750	0,140	0,102	0,088	0,077

Tablo 4. 19 *h*CA II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi NiL₂ bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

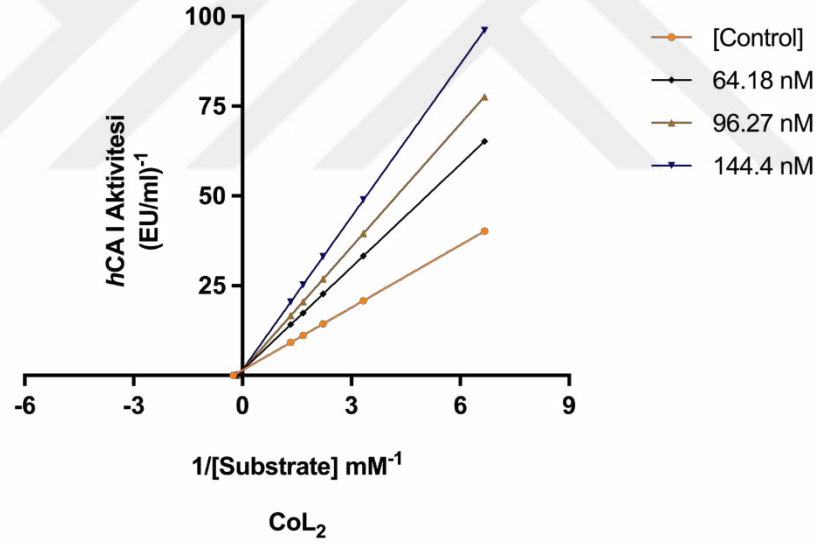
Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	160,51 nM	240,76 nM	361,14 nM
0,150	0,035	0,027	0,026	0,020
0,300	0,070	0,046	0,042	0,040
0,450	0,095	0,070	0,063	0,054
0,600	0,115	0,093	0,080	0,069
0,750	0,129	0,095	0,085	0,073

Tablo 4. 20 *h*CA II izoenzimi aktivitesine karşı sentezlenen Schiff Bazı metal kompleksi ZnL₂ bileşiğinin K_I sabitinin belirlenmesi için kullanılan substrat ve madde konsantrasyonları ile aktivite değerleri

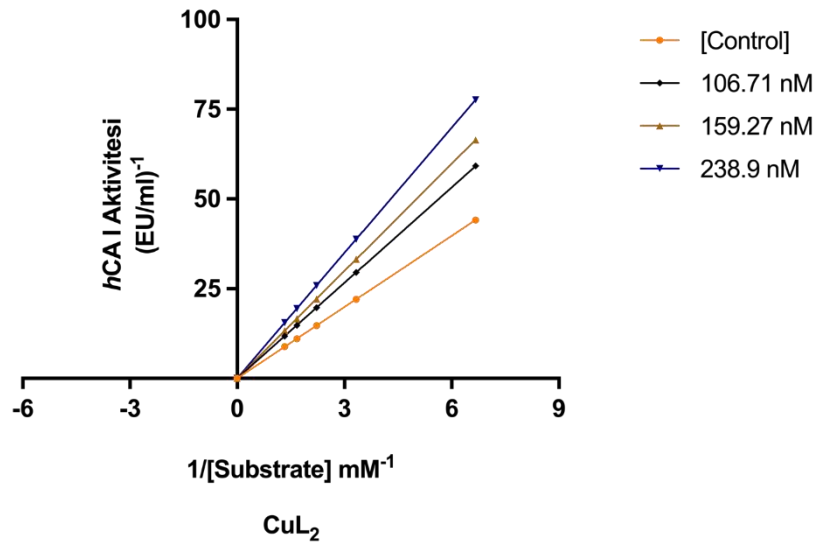
Substrat (mM)	İnhibitör			
	0	301,73 nM	452,59 nM	679,67 nM
0,150	0,028	0,021	0,017	0,017
0,300	0,057	0,034	0,032	0,028
0,450	0,075	0,047	0,042	0,036
0,600	0,091	0,057	0,050	0,041
0,750	0,099	0,059	0,059	0,049



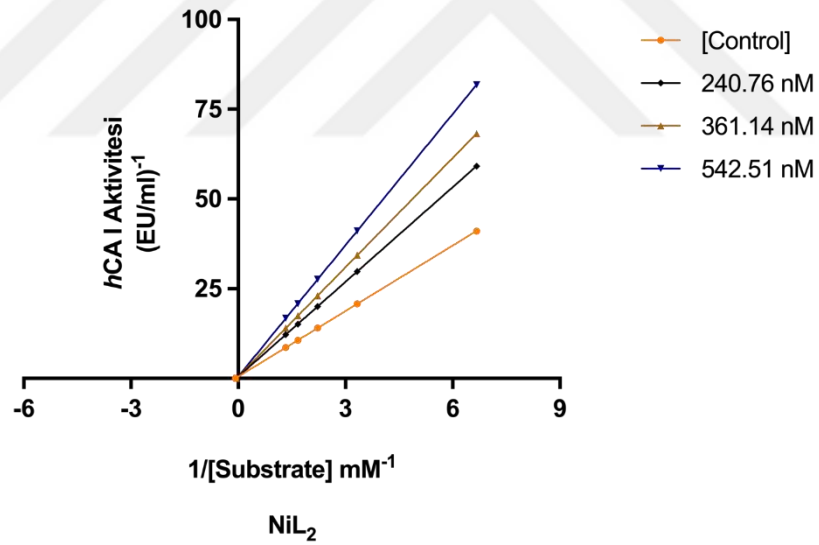
Şekil 4. 11. Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



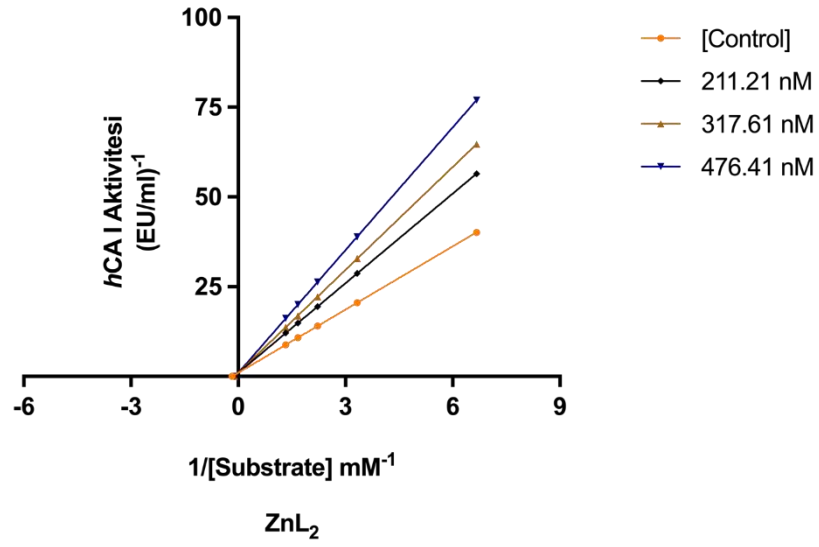
Şekil 4. 12. Schiff Bazı metal kompleksi CoL₂ bileşiğinin *hCA I* izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



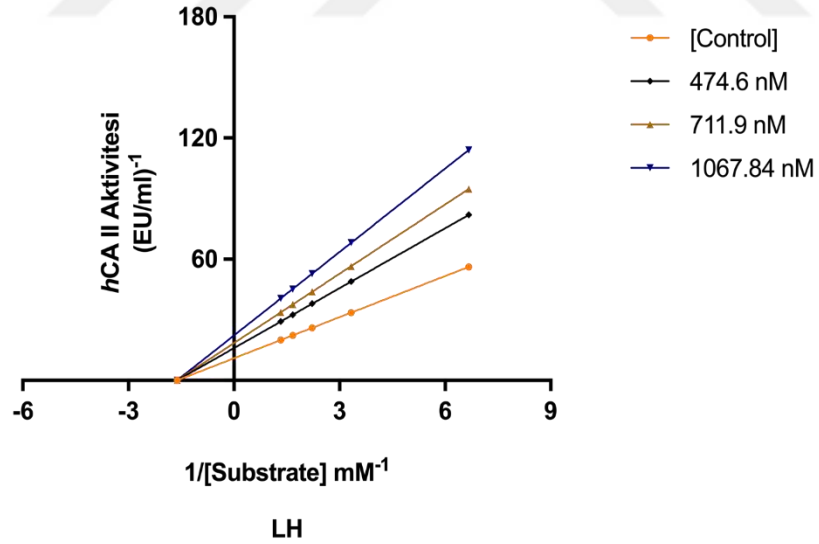
Şekil 4. 13. Schiff Bazı metal kompleksi CuL₂ bileşiğinin *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



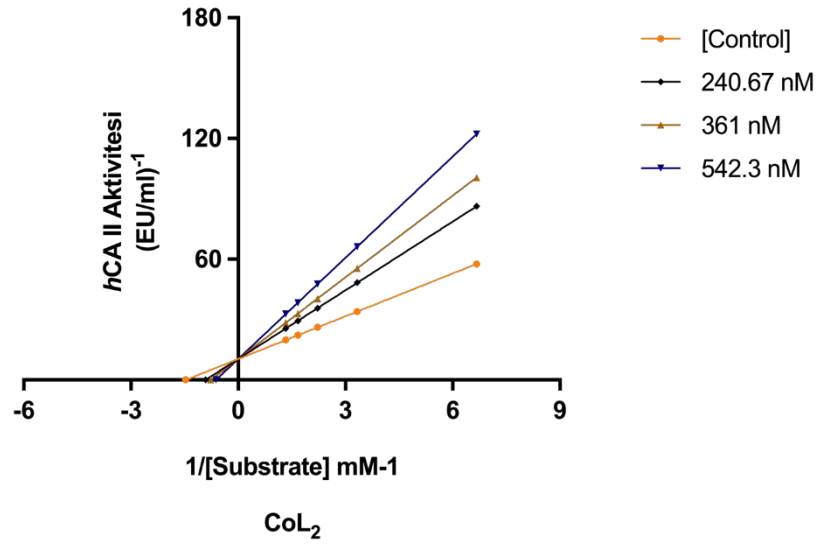
Şekil 4. 14. Schiff Bazı metal kompleksi NiL₂ bileşiğinin *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



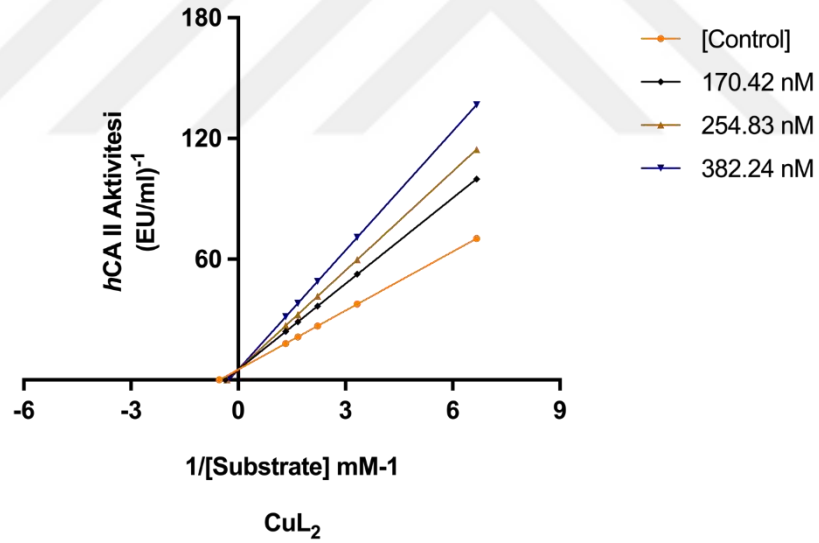
Şekil 4. 15. Schiff Bazı metal kompleksi ZnL₂ bileşiğinin *h*CA I izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



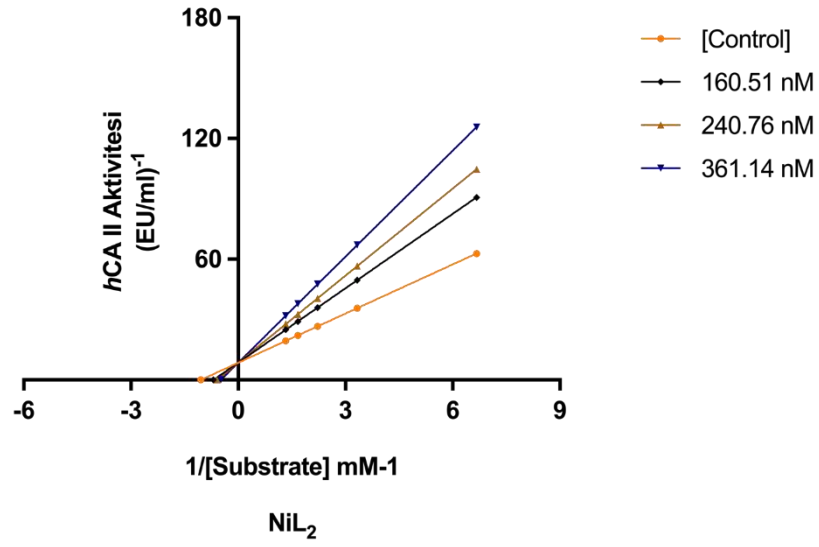
Şekil 4. 16. Schiff Bazı ligandı LH bileşiğinin *h*CA II izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



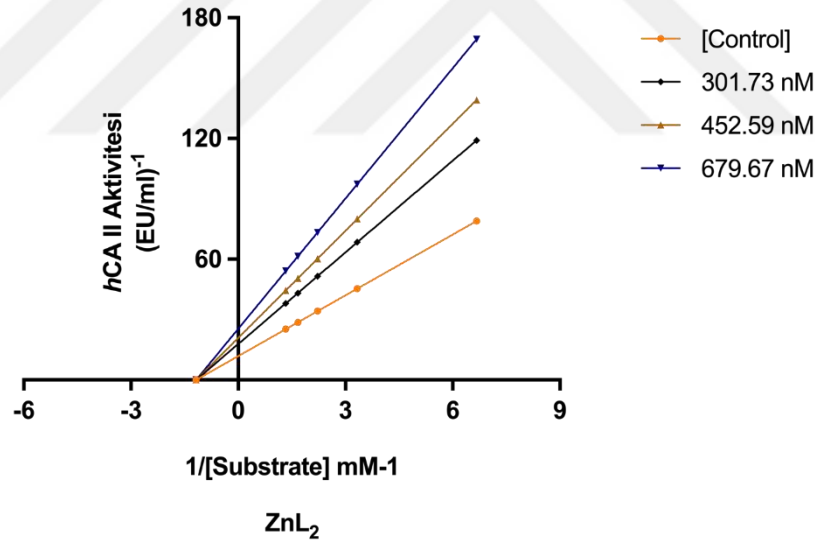
Şekil 4. 17. Schiff Bazı metal kompleksi CoL_2 bileşiğinin $h\text{CA II}$ izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. 18. Schiff Bazı metal kompleksi CuL_2 bileşiğinin $h\text{CA II}$ izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. 19. Schiff Bazı metal kompleksi NiL_2 bileşiğinin $h\text{CA II}$ izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4. 20. Schiff Bazı metal kompleksi ZnL_2 bileşiğinin $h\text{CA II}$ izoenzimi aktivitesine karşı etkisini gösteren ve K_i sabitinin belirlenmesi için kullanılan Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA

CA enzimleri gibi geniş bir izoenzim grubuna sahip enzimler üzerinde yapılan ilaç çalışmalarında, yalnızca belirli bir izoenzimi hedef alan maddeler, seçicilik özellikleri sayesinde daha fazla dikkat çekmektedir. Bu durum, diğer izozimler üzerinde minimum düzeyde inhibisyon etkisi yaratarak yan etki riskini azaltma avantajı sunar.

hCA I ve *hCA II* inhibisyonu için daha önce birçok çalışma yapıldığı bilinmektedir. Örneğin bir çalışmada 3-aminobenzen-sülfonilamit (abs) ve maleik anhidrit (mal) kullanılarak (E)-4-okso-4-(3-sülfamoyilfenil)amino)büt-2-enoik asit (Hmabsmal) bileşiği sentezlenmiş, ardından bu bileşiğin değişik yöntemlerle Co^{+2} ve Cu^{+2} metal kompleksleri sentezlenmiştir. Daha sonra, bu yeni sentezlenen maddelerin *hCA I* ve *hCA II* izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri *in vitro* ortamda incelenmiştir. Sonuç olarak sentezlenen maddelerin izoenzimlerin esterase aktivitesini inhibe ettiğini ve bu inhibisyon değerlerinin kontrol bileşiği AAZ ile karşılaştırılabilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir (İlkinen ve ark., 2017).

Bir diğer çalışmada Trimetoksiinden türevlerinin insan *hCA I* ve *hCA II* inhibisyon etkileri araştırılmış trimetoksiinden türevleri (1-9), CA izoformlarına (*hCA I* ve *II*) karşı etkili inhibisyon profilleri gösterdiği tespit edilmiştir (Taslimi ve ark., 2016).

Yaptığımız bu çalışmada, *hCA I* ve *hCA II* izoenzimleri kullanılmıştır. *hCA I* ve *hCA II* izoenzimleri ile ilgili yapılan *in vitro* inhibisyon çalışması, yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ile metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2) bileşiklerin bu enzimler üzerindeki inhibisyon etkilerini detaylı bir şekilde incelemeyi hedeflemiştir. Sentezlenen bileşiklerin esterase aktivitelerini ne kadar etkilediğini, inhibisyon güçlerini, izoenzim seçiciliklerini ve etki mekanizmalarını anlamak için yapılmıştır.

IC_{50} değeri, bir inhibitörün belirli bir enzim aktivitesini %50 oranında inhibe ettiği konsantrasyonu ifade eder. K_i değeri ise inhibitörün enzime ne kadar güçlü bağlandığını gösterir ve inhibisyon mekanizmasını anlamak için önemlidir. Burada, IC_{50} (yarı

İnhibisyon konsantrasyonu) ve K_i (inhibisyon sabiti) değerleri hesaplanarak, inhibitörlerin etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

Enzim üzerine ilave edilen inhibitörlerin, inhibitörlü ve inhibitörsüz koşullarda, sentezlenen metal kompleksleri için esteraz aktivite ölçümleri yapılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin esteraz aktivitesini yarışmalı inhibisyon mekanizması ile engellediğini göstermiştir. Bu, bileşiklerin enzimin aktif bölgesi için yarışarak enzimin aktif yerini işgal ettiğini böylece enzim aktivitesinin azalttığını ifade eder. *hCA* I ve *hCA* II izoenzimlerinin inhibisyon çalışmasında AAZ pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin inhibisyon etkileri, AAZ'nin inhibisyon etkisi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tablo 6. 1 Sentezlenen Schiff Bazı türevlerinin ve referans ilaç Asetazolamid'in *hCA I* izoenziminin aktivitesine karşı etkisini gösteren IC_{50} değerleri ve K_I sabitleri.

İnhibitör	<i>hCA I</i>				İnhibisyon tipi
	IC_{50} (nM)	R^2	K_I (nM)	R^2	
LH	771,90 ± 17,55	0,9894	721,90 ± 53,46	0,9874	Yarışmasız
CoL ₂	111,70 ± 2,18	0,9980	99,16 ± 9,21	0,9868	Yarışmalı
CuL ₂	379,30 ± 8,42	0,9928	304,40 ± 30,37	0,9865	Yarışmalı
NiL ₂	620,00 ± 7,48	0,9982	542,60 ± 49,54	0,9877	Yarışmalı
ZnL ₂	611,50 ± 9,68	0,9977	506,50 ± 44,26	0,9888	Yarışmalı
Asetazolamid	287,00 ± 10,57	0,9935	260,80 ± 14,38	0,9952	Yarışmasız

Tablo 6. 2 Sentezlenen Schiff Bazı türevlerinin ve referans ilaç Asetazolamid'in *hCA II* izoenziminin aktivitesine karşı etkisini gösteren IC_{50} değerleri ve K_I sabitleri.

İnhibitör	<i>hCA II</i>				İnhibisyon tipi
	IC_{50} (nM)	R^2	K_I (nM)	R^2	
LH	1076,00 ± 29,39	0,9888	1033,00 ± 56,99	0,9865	Yarışmasız
CoL ₂	417,70 ± 11,42	0,9936	381,90 ± 33,44	0,9884	Yarışmalı
CuL ₂	415,40 ± 11,31	0,9919	377,20 ± 34,69	0,9876	Yarışmalı
NiL ₂	339,90 ± 4,72	0,9976	308,00 ± 28,43	0,9877	Yarışmalı
ZnL ₂	651,10 ± 8,23	0,9982	585,80 ± 30,97	0,9879	Yarışmasız
Asetazolamid	160,50 ± 3,27	0,9965	125,60 ± 9,31	0,9921	Yarışmasız

Bu tezde kullanılan ve yeni sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ile metal kompleksleri (CoL₂, CuL₂, NiL₂ ve ZnL₂), Dr. Öğr. Üyesi Sümeyra Tuna YILDIRIM tarafından sentezlenmiştir. Schiff bazlarının *hCA I* ve *hCA II* enzimleri üzerindeki inhibitör etkileri IC_{50} ve K_I değerleriyle analiz edilmiştir. IC_{50} hesaplaması sırasında, öncelikle substrat konsantrasyonları sabit tutulmuş ve farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite yüzdeleri belirlenmiştir. Ardından, %50 inhibisyon sağlayan inhibitör konsantrasyonu grafiksel olarak tespit edilerek IC_{50} değeri hesaplanmıştır.

Her bir bileşiğin K_i değerleri, üç farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak saptanmıştır. K_i değerlerinin yanı sıra inhibisyon tipini belirlemek amacıyla Lineweaver-Burk eğrileri çizilmiştir. *hCA* I ve *hCA* II enzimleri için elde edilen IC_{50} ve K_i değerleri sırasıyla Tablo 6.1 ve Tablo 6.2'de sunulmuştur. Sentezlenen Schiff bazlı metal komplekslerinin, *hCA* I ve *hCA* II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri değerlendirilmiştir.

Sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin ve referans ilaç olarak kullanılan AAZ'ın *hCA* I için IC_{50} değerleri incelendiğinde LH için $771,90 \pm 17,55$, CoL_2 için $111,70 \pm 2,18$, CuL_2 için $379,30 \pm 8,42$, NiL_2 için $620,00 \pm 7,48$, ZnL_2 için $611,50 \pm 9,68$, AAZ için $287,00 \pm 10,57$ değerleri bulunmuştur. Bulunan değerlerin enzim üzerindeki inhibisyon etkisi karşılaştırıldığında; $CoL_2 > AAZ > CuL_2 > ZnL_2 > NiL_2 > LH$ olarak belirlenmiştir.

Sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ve metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2)'nin ve referans ilaç olarak kullanılan AAZ'ın *hCA* II için IC_{50} değerleri incelendiğinde LH için $1076,00 \pm 29,39$, CoL_2 için $417,70 \pm 11,42$, CuL_2 için $415,40 \pm 11,31$, NiL_2 için $339,90 \pm 4,72$, ZnL_2 için $651,10 \pm 8,23$, AAZ için $160,50 \pm 3,27$ değerleri bulunmuştur. Bulunan değerlerin enzim üzerindeki inhibisyon etkisi karşılaştırıldığında; $AAZ > NiL_2 > CuL_2 > CoL_2 > ZnL_2 > LH$ olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak sentezlenen Schiff Bazı ligandı (LH) ile metal kompleksleri (CoL_2 , CuL_2 , NiL_2 ve ZnL_2) referans ilaç AAZ'e kıyasla, sadece CoL_2 metal kompleksinin *hCA* I enzimi üzerinde güçlü bir inhibisyon etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu etkinin yaklaşık 2.5 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *hCA* II için ise istenilen etki sağlanmamıştır. Bu durum, *hCA* II enzimi üzerinde daha etkili bir inhibisyon sağlayacak alternatif ilaç arayışlarını gündeme getirmiştir. CoL_2 molekülün sentez aşamalarının ekonomik ve kolay olması, güçlü inhibitör özellikler göstermesi ve oldukça stabil olması nedeniyle CA enzimi ile ilgili önemli hastalıkların (glokom, yükseklik hastalığı, ödem vb.) tanı ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- Abu-Dief, A. M. and Mohamed, I. M. (2015). A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 119-133.
- Aslan, H. E., Demir, Y., Özaslan, M. S., Türkan, F., Beydemir, Ş. ve Küfrelioğlu, Ö. I. (2019). The behavior of some chalcones on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase activity. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(6), 634-640.
- Birinci, P. (2017). *Pelajik ve Bentik Balıklarının Solungaçlarından Saflaştırılan Karbonik anhidraz Aktivitelerinin İrdelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Rize.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
- Brown, D., Kumpulainen, T., Roth, J. and Orci, L. (1983). Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in postnatal and adult rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 245(1), F110-F118.
- Carta, F., Supuran, C. T. and Scozzafava, A. (2014). Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 6(10), 1149-1165.
- Cumurcu, T. (2008). Topikal Karbonik Anhidraz İnhibitörü Kullanımına Bağlı Gelişen Bir Kornea Ödemi Olgusu. *Fırat Tıp Dergisi*, 13(2), 134-136.
- Çelik, H. (2017). *Sığır Böbrek Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı Doğal Moleküllerle İnhibisyonunun Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı.
- Dave, K., Ilies, M. A., Scozzafava, A., Temperini, C., Vullo, D. and Supuran, C. T. (2011). An inhibitor-like binding mode of a carbonic anhydrase activator within the active site of isoform II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(9), 2764-2768.
- Değirmencioglu, S. M. (2010). *Bazı schiff bazı metal komplekslerinin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Di Fiore, A., Monti, S. M., Hilvo, M., Parkkila, S., Romano, V., Scaloni, A. and De Simone, G. (2009). Crystal structure of human carbonic anhydrase XIII and its complex with the inhibitor acetazolamide. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 74(1), 164-175.
- Durgun, M. (2004). *Glokom Tedavisinde Kullanılan Yeni Sülfanilamid Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi/Synthesis and Investigation of Biological Activities of Novel Derivatives of Sulfanilamide For Glaucoma Therapy*. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Esmer Demir, E. (2019). *Tiyofenli Schiff bazı türevlerinin DFT çalışması ve antimikrobiyal aktiviteleri*. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara
- Fossati, S., Giannoni, P., Solesio, M. E., Cocklin, S. L., Cabrera, E., Ghiso, J. and Rostagno, A. (2016). The carbonic anhydrase inhibitor methazolamide prevents amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and caspase activation protecting neuronal and glial cells in vitro and in the mouse brain. *Neurobiology of Disease*, 86, 29-40.
- García-Llorca, A., Carta, F., Supuran, C. T. and Eysteinnsson, T. (2024). Carbonic anhydrase, its inhibitors and vascular function. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 11, 1338528.

- Geers, C. and Gros, G. (2000). Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiological Reviews*, 80(2), 681-715.
- Gilmour, K. M. (2010). Perspectives on carbonic anhydrase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157(3), 193-197.
- Gugleta, K. (2010). Topical carbonic anhydrase inhibitors and visual function in glaucoma and ocular hypertension. *Current Medical Research and Opinion*, 26(6), 1255-1267.
- Gümüş, M. (2008). *Yeni Karbonik Anhidraz İnhibitörleri Sentezi ve İn Vitro İnhibitör Aktivitelerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Henry, R. P. and Swenson, E. R. (2000). The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respiration Physiology*, 121(1), 1-12.
- Iester, M. (2008). Brinzolamide. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(4), 653-662.
- Istrefi, Q., Türkeş, C., Arslan, M., Demir, Y., Nixha, A. R., Beydemir, Ş. and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2020). Sulfonamides incorporating ketene N, S-acetal bioisosteres as potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 353(6), 1900383.
- İlkimen, H., Yenikaya, C., İmdat, G., Tunca, E. ve Bülbül, M. (2017). 2-aminopiridin türevleri ile sülfonamid içeren maleamik asit türevinin proton transfer tuzları ve Cu (II) komplekslerinin sentezi, karakterizasyonu ve insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2), 480-494.
- İmdat, G. (2019). *Aminopiridin türevlerinin ve metal komplekslerinin insan karbonik anhidraz enzimi üzerine etkisinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya.
- Karaman, M. (2013). *Yönlendirilmiş Mutagenез ile Karbonik Anhidraz 9 Promotorunun Fonksiyonel Analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Keilin, D. and Mann, T. (1940). Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochemical Journal*, 34(8-9), 1163.
- Kibar, M. (2015). Tavşanlarda bazı antiglokomatöz ilaçların göz içi basıncı üzerine etkileri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(2), 99-107.
- Kim, J. K., Lee, C., Lim, S. W., Adhikari, A., Andring, J. T., McKenna, R. and Kim, C. U. (2020). Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis. *Nature Communications*, 11(1), 4557.
- Köseoğlu, İ. (2016). *İnsan Karbonik Anhidrazı İzoenziminin Alternatif Bir Metot ile İmmobilizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Krupa, A., Zwierzyńska, E. and Pietrzak, B. (2013). Zonisamid-lek nie tylko przeciwpadaczkowy. *Aktualności Neurologiczne*, 13(2).
- Kumar, S., Dhar, D. N. and Saxena, P. N. (2009). Applications of metal complexes of Schiff bases-A review.
- Kumar, S., Rulhania, S., Jaswal, S. and Monga, V. (2020). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112923.
- Kumar, S., Rulhania, S., Jaswal, S. and Monga, V. (2021). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112923.

- Kuzu, M., Demirdağ, R., Özkaya, A., Çomaklı, V., Şahin, Z., Dardağan, U. ve Koca, M. (2016). HO Uygulanan Sıçanlarda Yeni Karbonik Anhidraz Aktivatörleri. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 44(4), 409-417.
- Leaf, D. E. and Goldfarb, D. S. (2007). Mechanisms of action of acetazolamide in the prophylaxis and treatment of acute mountain sickness. *Journal of Applied Physiology*.
- Leppik, I. E. (2004). Zonisamide: chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. *Seizure*, 13, S5-S9.
- Lindskog, S. (1997). Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1), 1-20.
- Lippa, E. A., Carlson, L. E., Ehinger, B., Eriksson, L. O., Finnström, K., Holmin, C. and Ytteborg, J. (1992). Dose response and duration of action of dorzolamide, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Archives of Ophthalmology*, 110(4), 495-499.
- Maren, T. H., Haywood, J. R., Chapman, S. K. and Zimmerman, T. J. (1977). The pharmacology of methazolamide in relation to the treatment of glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 16(8), 730-742.
- Masini, E., Carta, F., Scozzafava, A. and Supuran, C. T. (2013). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23(6), 705-716.
- Mert, T. (2014). *Asetazolamid Yüklü Partiküllerin Hazırlanması ve İlaç Salım Sistemi Olarak Kullanımının Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- Mincione, F., Scozzafava, A. and Supuran, C. T. (2008). The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7), 649-654.
- Mishra, C. B., Tiwari, M. and Supuran, C. T. (2020). Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2485-2565.
- Ozensoy Guler, O., Capasso, C. and Supuran, C. T. (2016). A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(5), 689-694.
- Ökemler, G. (2016). *Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Özavcı, A.M. (2019). *Siraz (Capoeta Umbla) Karaciğerinden Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu, Bazı Metal ve Pestisitlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Ağrı.
- Özensoy, Ö. (2006). *Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (Ca-IX, Ca-XII) Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması*. Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir.
- Pfeiffer, N. (1997). Dorzolamide: development and clinical application of a topical carbonic anhydrase inhibitor. *Survey of Ophthalmology*, 42(2), 137-151.
- Rosenberg, L. F., Krupin, T., Tang, L. Q., Hong, P. H. and Ruderman, J. M. (1998). Combination of systemic acetazolamide and topical dorzolamide in reducing intraocular pressure and aqueous humor formation. *Ophthalmology*, 105(1), 88-93.
- Rowlett, R. S. (2010). Structure and catalytic mechanism of the β -carbonic anhydrases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(2), 362-373.

- Sall, K. and Brinzolamide Primary Therapy Study Group. (2000). The efficacy and safety of brinzolamide 1% ophthalmic suspension (Azopt®) as a primary therapy in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *Survey of Ophthalmology*, 44, S155-S162.
- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. and Supuran, C. T. (2006). Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(12), 1627-1664.
- Sharma, T., Sharma, S., Kamyab, H. and Kumar, A. (2020). Energizing the CO₂ utilization by chemo-enzymatic approaches and potentiality of carbonic anhydrases: A review. *Journal of Cleaner Production*, 247, 119138.
- Shukralla, A. A., Dolan, E. and Delanty, N. (2022). Acetazolamide: Old drug, new evidence? *Epilepsia Open*, 7(3), 378-392.
- Stams, T., Chen, Y., Christianson, D. W., Boriack-Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Laipis, P. and Dean, T. (1998). Structures of murine carbonic anhydrase IV and human carbonic anhydrase II complexed with brinzolamide: Molecular basis of isozyme-drug discrimination. *Protein Science*, 7(3), 556-563.
- Steele, R. M., Benedini, F., Biondi, S., Borghi, V., Carzaniga, L., Impagnatiello, F. and Supuran, C. T. (2009). Nitric oxide-donating carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of open-angle glaucoma. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6565-6570.
- Storgaard, L., Tran, T. L., Freiberg, J. C., Hauser, A. S. and Kolko, M. (2021). Glaucoma clinical research: Trends in treatment strategies and drug development. *Frontiers in Medicine*, 8, 733080.
- Sugrue, M. F. (2000). Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(1), 87-112.
- Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3467-3474.
- Supuran, C. T. (2018). Carbonic anhydrase inhibitors as emerging agents for the treatment and imaging of hypoxic tumors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(12), 963-970.
- Supuran, C. T. and Scozzafava, A. (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12(2), 217-242.
- Supuran, C. T., Altamimi, A. S. A. and Carta, F. (2019). Carbonic anhydrase inhibition and the management of glaucoma: a literature and patent review 2013-2019. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(10), 781-792.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A. and Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146-189.
- Taslimi, P., Gulcin, I., Ozgeris, B., Goksu, S., Tumer, F., Alwasel, S. H. and Supuran, C. T. (2016). The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II (hCA I and II) inhibition effects of trimethoxyindane derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 152-157.
- Taşkesen, M. (2002). *Glokom Tedavisinde Kullanılan Yeni Karbonik Anhidraz İnhibitörleri Sentezi/Novel Carbonic Anhydrase Inhibitors For Glaucoma Therapy*. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.
- Tawil, R., McDermott, M. P., Brown Jr, R., Shapiro, B. C., Ptacek, L. J., McManis, P. G. and Working Group on Periodic Paralysis. (2000). Randomized trials of dichlorphenamide in the periodic paralyses. *Annals of Neurology*, 47(1), 46-53.

- 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.
- Terzi, E. (2015). *Benzotiyazol Grubu İçeren Sülfonamidlerin Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX XII (CA-IX, CA-XII) İzoenzimleri ve Sitozolik Karbonik Anhidraz I, II (CA-I, CA-II) İzoenzimleri Üzerine Spesifik İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Ankara.
- Tripp, B. C., Smith, K. and Ferry, J. G. (2001). Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme* 210. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), 48615-48618.
- Türkeş, C., Arslan, M., Demir, Y., Cocaj, L., Nixha, A. R. and Beydemir, Ş. (2019). Synthesis, biological evaluation and in silico studies of novel N-substituted phthalazine sulfonamide compounds as potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 89, 103004.
- Van Berkel, M. A. and Elefritz, J. L. (2018). Evaluating off-label uses of acetazolamide. *The Bulletin of the American Society of Hospital Pharmacists*, 75(8), 524-531
- Vullo, D., Del Prete, S., Capasso, C. and Supuran, C. T. (2016). Carbonic anhydrase activators: Activation of the β -carbonic anhydrase from *Malassezia globosa* with amines and amino acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(5), 1381-1385.
- Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastoreková, S. and Supuran, C. T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides—a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs? *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(4), 963-969.
- Yaylaci Karahalil, F. (2009). *Mersin Balığı (Acipenser Gueldenstaedti) Eritrositlerinden Elde Edilen Karbonik Anhidraz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi*. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- Zhang, Z. P., Zhong, Y., Han, Z. B., Zhou, L., Su, H. S., Wang, J. and Cheng, M. S. (2021). Synthesis, molecular docking analysis and biological evaluations of saccharide-modified thiadiazole sulfonamide derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5482.

ÖZGEÇMİŞ

Arzu ORHAN, *****'ın Çe**** ilçesinde doğdu. İlköğretim ve ortaöğretimini Se**** Be**** İÖÖ'da tamamladı. 2014 yılında Ab**** Sı**** Ça**** Anadolu Lisesinden mezun oldu. 2016 yılında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Eczacılık Fakültesine yerleşti. 2021'de Er**** İlçe Sağlık Müdürlüğü'ne Eczacı olarak atandı, halen görevini yapmaya devam etmektedir. 2022 yılında Farmasötik Bilimler Tezli Yüksek Lisans Programında lisanüstü eğitimine başladı.