

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4-TRİAZOL-5-ON TÜREVLERİNİN SIĞIR SERUM  
KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* VE  
*İN SİLİKO* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kimyager Hasan AYALOĞLU**

**EYLÜL 2019  
TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kimya Anabilim Dalında  
Hasan AYALOĞLU Tarafından Hazırlanan

YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4-TRIAZOL-5-ON TÜREVLERİNİN SIĞIR SERUM  
KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO*  
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 28/ 05/ 2019 gün ve 1806 sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK

Üye : Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

Üye : Doç. Dr. Hüseyin ŞAHİN

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Yeni sentezlenmiş 1,2,4-triazol-5-on türevlerinin sığır serum karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkisinin *in vitro* ve *in siliko* yöntemlerle incelenmesi adlı bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmada bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde yardımcı olan, çalışmam süresince yakın ilgi ve önerileriyle bana yol gösterip beni yönlendiren danışmanım sayın Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK'a ve organik maddeleri sentezleyen Prof. Dr. Olcay BEKİRCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansım boyunca Biyokimya Lisansüstü Araştırma Laboratuvarında beraber çalışıp yardımlarını aldığım Doç. Dr. Yakup KOLCUOĞLU özellikle de Dr. Kimyager Ümmühan ÇAKMAK ve Dr. Kimyager Fulya ÖZ TUNCAY'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans tez süresince beni anlayışla karşılayan, nazımı çeken Abidin GÜMRÜKÇÜOĞLU ve dostlarıma teşekkür ederim.

Son olarak benim her daim arkamda bir kuvvet olarak duran, hayatın mihenk taşlarından olan ve aile olgusunu ve düsturunu yaşatan canım aileme minnet ve ilelebet teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Hasan AYALOĞU  
Trabzon, 2019

## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yeni sentezlenmiş 1,2,4-triazol-5-on türevlerinin sığır serum karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkisinin *in vitro* ve *in siliko* yöntemlerle incelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 25/09/2019

Hasan AYALOĞLU

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET .....	VII
SUMMARY .....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ .....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Küçük Moleküllerin Enzim İnhibitörü Olarak Önemi .....	2
1.3. Endüstride Enzim Kullanımı .....	3
1.4. Karbonik Anhidraz (CA).....	5
1.4.1. Dağılımı ve CA Sınıfları .....	5
1.4.1.1. CA II.....	6
1.4.2. CA'nın Üç Boyutlu Yapısı ve Kataliz Mekanizması .....	6
1.4.3. CA Enziminin Fonksiyonları.....	9
1.4.4. CA Sınıfları ve İnhibitörleri .....	10
1.5. Triazollerin Yapısı ve Biyolojik Etkileri.....	15
1.6. İlaç Keşfinde Yeni Yaklaşımlar .....	16
1.6.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları.....	17
1.6.2. ADME Özellikleri .....	18
1.6.3. Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (QSAR) .....	18
1.7. Literatür Özeti.....	19
1.8. Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi .....	20
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler .....	21
2.1.1. Enzim, Tampon ve Substrat Çözeltileri.....	21

2.1.2.	Çalışmada Kullanılan İnhibitör Moleküller.....	22
2.1.3.	Kullanılan Cihazlar.....	25
2.2.	bCA Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu .....	26
2.2.1.	CA (Esteraz) Aktivitesi Tayini .....	26
2.2.2.	Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi.....	27
2.2.3.	Substrat Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi .....	27
2.2.4.	Sıcaklığın Aktivite Üzerine Etkisi.....	27
2.2.5.	pH'nın Aktivite Üzerine Etkisi.....	27
2.3.	İnhibisyon Çalışmaları.....	28
2.3.1.	Organik Moleküllerin Sığır Serum Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkisi	28
2.3.2.	İnhibisyon Türünün Belirlenmesi.....	29
2.4.	<i>İn Siliko</i> Çalışmalar .....	29
2.4.1.	Moleküler Modelleme Çalışmaları.....	29
2.4.2.	ADME Çalışması.....	30
2.5.	İstatistiksel Analiz .....	30
3.	BULGULAR .....	31
3.1.	Sığır Serum Karbonik Anhidrazın (bCA) Optimizasyonu .....	31
3.2.	bCA İnhibisyonu .....	31
3.3.	Moleküler Modelleme Çalışmaları.....	35
3.4.	ADME Çalışmaları.....	37
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	39
5.	ÖNERİLER .....	43
6.	KAYNAKLAR.....	44

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

YENİ SENTEZLENMİŞ 1,2,4-TRIAZOL-5-ON TÜREVLERİNİN SIĞIR SERUM  
KARBONİK ANHİDRAZ AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* VE  
*İN SİLİKO* YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

Hasan AYALOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK  
2019, 53 Sayfa

Karbonik anhidraz (CA)-II metabolizmada bazı süreçlerde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, CA inhibitörleri ilaç tasarımında önemli moleküllerdir ve bazı farmakolojik uygulamalara sahiptir. Dolayısıyla, ülser, obezite, kanser, epilepsi ve glokoma gibi bazı hastalık durumlarının giderilmesinde hedef enzim durumundadır. Bu çalışmada, yeni sentezlenen bazı triazol bileşiklerinin endüstriyel ve klinik öneme sahip olan CA için inhibisyon potansiyelleri incelendi. Öncelikle ticari olarak satın alınan sığır serum karbonik anhidraz (bCA) için optimum reaksiyon şartları tespit edildi. Daha sonra biyokimyasal *in vitro* kinetik çalışmalar yapılarak organik moleküllerin bCA inhibisyon potansiyelleri  $IC_{50}$  değerleri hesaplanarak belirlendi. Buna göre incelenen moleküller arasında 7c bileşiğinin  $60,80 \mu\text{M}$  olan  $IC_{50}$  değeri ile en etkili molekül olduğu tespit edildi. bCA için en etkili inhibitör olarak tespit edilen 7c molekülü varlığında inhibisyon türü ve  $K_i$  değeri belirlendi. Buna göre, inhibisyonun türünün yarı-yarışmalı (uncompetitive) ve  $K_i$  değerinin de  $60,67 \text{ mM}$  olduğu gözlemlendi. Moleküler modelleme çalışmalarıyla da her bir molekülün bCA'nın kristal yapısıyla aktif bölgede etkileşimi *in siliko* olarak ele alındı. Bu çalışmada incelenen 11 molekülden 7c molekülünün enzimle en iyi etkileşen dört molekülden biri olduğu belirlendi. Enzimle inhibitörün etkileşiminde Gln102, Leu240, Ala241 ve Trp243 aminoasit birimlerinin etkili olduğu görüldü. Yeni sentezlenmiş moleküllerin Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon (ADME) özellikleri de ayrıca incelendi ve görüldü ki bu çalışmada ele alınan tüm moleküller iyi bir oral ilaç adaydır.

**Anahtar Kelimeler:** 1,2,4-triazol, Karbonik anhidraz, Enzim inhibisyonu, ADME, Moleküler modelleme



Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NEWLY SYNTHESIZED 1,2,4-TRIAZOL-5-  
ON DERIVATIVES ON BOVINE SERUM CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY BY  
*IN VITRO* AND *IN SILICO* METHODS

Hasan AYALOĞLU

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK  
2019, 53 Pages

Carbonic anhydrase (CA) -II plays a crucial role in some processes in metabolism. For this reason, CA inhibitors are important molecules in drug design and have some pharmacological applications. Therefore, CA is the target for the treatment of certain disease states such as ulcer, obesity, cancer, epilepsy and glaucoma. In this study, the inhibition potential of some newly synthesized triazole compounds for CA, which has industrial and clinical importance, was investigated. First, the optimum reaction conditions for commercially available bovine serum carbonic anhydrase (bCA) were determined. Then, biochemical *in vitro* kinetic studies were performed to determine the bCA inhibition potential  $IC_{50}$  values of organic molecules. According to this, 7c was the most effective molecule with an  $IC_{50}$  value of 60.80  $\mu$ M. Inhibition type and  $K_i$  value were determined in the presence of 7c molecule which was found to be the most effective inhibitor for bCA. Accordingly, the type of inhibition was uncompetitive and the  $K_i$  value was 60.67 mM. In molecular modeling studies, the interaction of each molecule with the crystal structure of bCA in the active site was considered as *in silico*. In this study, it was determined that 7c of the 11 molecules examined was one of the four molecules that interacted best with the enzyme. Gln102, Leu240, Ala241 and Trp243 amino acid units were found to be effective in the interaction of the enzyme and the inhibitor. The Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) properties of the newly synthesized molecules have also been examined and found to be a good candidate for oral medication.

**Key Words:** 1,2,4-triazol, Carbonic Anhydrase, Enzyme inhibition, ADME, Molecular Docking

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Kırmızı küre; His94, His96 ve His119 tarafından koordine edilen çinko (II) iyonu ve mavi küre; dördüncü ligandında bir su molekülü/hidroksit iyonu görülür.....	7
Şekil 2. CA'ların kataliz mekanizması.....	7
Şekil 3. CA kataliz denklemi .....	8
Şekil 4. X-ışını kristalografisi ile belirlenen şekilde sülfamidin (monoanyon olarak) hCA II'ye şematik bağlanması .....	9
Şekil 5. Asetazolamidin (AZA), metazolamid (MZA), etokszolamid (EZA) ve topiramid molekülleri.....	11
Şekil 6. 1) Çinko bağlayıcılar 2) Çinko koordineli su molekülü/hidroksi iyonuna bağlanan bileşikler 3) Aktif alanın girişini oluşturan bileşikler 4) Aktif bölgeden bağlanan bileşikler 5) CAI bilinen mekanizma olmadan hareket edenler.....	13
Şekil 7. Pirimidinil benzen sülfonamidler ve yeni indol halkaları.....	14
Şekil 8. Piazol türevleri.....	14
Şekil 9. 1,2,4-Triazol halkası .....	15
Şekil 10. Triazol izomerleri.....	15
Şekil 11. 3a molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi .....	32
Şekil 12. 3b-3e moleküllerinin bCA aktivitesi üzerine etkisi .....	32
Şekil 13. 7a molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi .....	33
Şekil 14. 7c molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi .....	33
Şekil 15. 6, 7b ve 7d moleküllerinin bCA aktivitesi üzerine etkisi.....	33
Şekil 16. 7e molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi .....	34
Şekil 17. 7c bileşiği varlığında bCA inhibisyon türünün belirlenmesi .....	35
Şekil 18. 7c molekülünün sığır eritrosit bCA'nın bağlanma cebindeki yaklaşık konformasyonu A) bileşik atomlarının amino asit birimleri ile çeşitli etkileşimlerini gösteren mikro ortam B) genel görünüm .....	36

## TABLolar DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Tablo 1. Endüstride kullanılan bazı enzimler.....	4
Tablo 2. Kullanılan enzim ve kimyasallar.....	21
Tablo 3. Çalışmada kullanılan inhibitör molekülleri .....	22
Tablo 4. Kullanılan cihazların listesi.....	25
Tablo 5. bCA aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı .....	26
Tablo 6. bCA çalışması için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	29
Tablo 7. bCA aktivitesinin optimizasyonu.....	31
Tablo 8. İnhibitör Moleküllerinin bCA Aktivite üzerine etkisi.....	34
Tablo 9. 7c molekülü varlığında bCA inhibisyon türünün belirlenmesi ve $K_i$ değeri.....	35
Tablo 10. İnhibitör Moleküllerin bCA'a <i>in siliko</i> Bağlanma Afiniteleri .....	36
Tablo 11. Sentezlenen organik bileşiklerin farmakokinetik özellikleri.....	38

## KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

<b>CA</b>	: Karbonik anhidraz
<b>bCA</b>	: Sığır serum karbonik anhidraz
<b>Zn<sup>+2</sup></b>	: Çinko (II) iyonu
<b>dk</b>	: Dakika
<b>CA-I</b>	: Karbonik anhidraz-I
<b>CA-II</b>	: Karbonik anhidraz-II
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
<b>kDa</b>	: Kilo dalton
<b>K<sub>i</sub></b>	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
<b>K<sub>m</sub></b>	: Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
<b>M</b>	: Molar
<b>Me<sup>2+</sup></b>	: Metal (II) iyonu
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Mili molar
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b><math>\gamma</math></b>	: Gama
<b><math>\delta</math></b>	: Delta
<b><math>\zeta</math></b>	: Zeta
<b><math>\eta</math></b>	: Eta
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	: Mikrogram
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	: Mikrometre
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	: Mikromolar

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Tahribata uğrayan organizmadaki dokuların yenilenmesi gibi birçok fizyolojik olayın gerçekleşmesi ve dolayısıyla hayatın devam etmesi bir dizi biyokimyasal reaksiyonun olmasıyla mümkündür. Hayati reaksiyonların bir kısmı doğasından dolayı yavaş gerçekleşirken bazıları ise enzimler denilen biyolojik katalizörlerle son derece hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir (Atasagungil, 1965).

Yaşam için enzimlerin ve aktivitelerinin çok önemli olmasının yanı sıra bulaşıcı olan organizmalarda (virüsler, bakteriler) bulunan enzimlerin seçimli inhibisyonları da bulaşıcı hastalıklara kemoterapik müdahalede önem arz etmektedir. Seçimli inhibisyon yaklaşımı eczacılık sektöründe dikkat çekmektedir, ayrıca antiviral ve antibiyotik ilaçların büyük bir kısmının faaliyetlerini bu yolla gösterdikleri bilinmektedir.

Enzim inhibisyonu stratejisi farmakolojik araştırma alanında kullanılan popüler bir yöntemdir. Alzheimer, kanser ve diyabet gibi günümüzde yaygın olarak görülmekte olan hastalıkların tedavi stratejilerin arasında enzim inhibisyonu yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzim inhibitörleri küçük moleküler kimyasal bileşenler olup, enzimlerin katalitik aktivitelerini inhibe ederek düşürecekleri ön görülür (Chauhan PS, vd., 2012 ). Küçük organik moleküller ve doğal ürünler, enzimler ile etkileşmesi sonucunda enzimlerin aktivitesi kontrol edilebilmektedir. Enzim inhibitörlerinin önemli görevlerinden bir tanesi birçok fizyolojik koşullarda ilaç olarak kullanılmalarıdır (Amtul Z, vd., 2002).

Canlılıktan sorumlu hücresel süreçler yanında enzimler, gıda, tekstil, kozmetik, kağıt ve temizlik endüstrisinde, ilaç kimyasallarının sentezi ve diğer bazı önemli moleküllerin endüstriyel ölçekteki üretimi süreçlerinde ve diğer birçok alan için de vazgeçilmez olmuşlardır (Benjamin ve Pandey, 2000). Enzimlerin endüstride kullanımı, geleneksel kimyasal muamelelerle elde edilemeyen daha yüksek ürün kalitesi, daha düşük üretim maliyeti, daha az atık ve az enerji tüketimi gibi faydalarla sonuçlanır. Sıradan kimyasal reaksiyonlar genellikle spesifik değildir, istenmeyen yan ürünler ortaya çıkmaktadır, kontrol edilmesi kolay değildir ve ılımlı olmayan şartlarda gerçekleşmektedir. Bütün bu problemler enzimlerin kullanımı ile ortadan kalkmaktadır (URL-1, 2013). Bu durum, amaca yönelik özel enzim üretimini ve endüstriyel prosesin kontrolünü sağlamak adına kontrollü regüle

edilebilir enzimlerin kullanımını gerektirmektedir. Buradan da anlaşılacağı üzere enzim inhibisyonu, sadece hastalıklarla mücadele edebilme açısından önemli olmamakta aynı zamanda biyoteknolojik süreçlerin kontrol altında tutulabilmesi açısından da önem arz etmektedir.

Bu amaçlar için keşfedilen yeni inhibitör moleküller, uzun bir araştırma sürecinin ürünüdür. Geçmiş yıllarda inhibitörlerin bulunmasının yegane yöntemi deneme ve yanılma ile olmaktadır. Kimyasal bileşiklerden oluşmakta olan kütüphaneler araştırılarak hedef enzime etki edecek bir inhibitörün ortaya konulması ümit edilirdi. Bu yaklaşım spesifik olmamakla beraber hala başarılıdır ve bütünleştirici (kombinatorial) kimya yaklaşımıyla çok kısa bir sürede oldukça fazla miktarda yeni bileşiklerin üretimi sağlanmaktadır. Günümüzde ise yüksek hacimli tarama teknolojileri sayesinde çok kısa zamanda inhibitörler tespit edilebilmektedir (Saravanamuthu, A., 2004).

Son zamanlarda ise alternatif bir yaklaşım yaygınlaşmıştır. Enzimin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı kullanılarak hangi moleküllerin inhibitör olma potansiyelinin yüksek olduğu ön görülmektedir (Scapin G., 2006). Daha sonra moleküler modelleme ile enzimin aktif bölgesine nasıl bağlandığı enzimin inhibitörle oluşturduğu kompleks yapısı çözülmeye çalışılmaktadır. Bu süreç, inhibitörün yapısında değişiklikler yaparak güçlü bir inhibitör bulana kadar tekrar edilir (Gohlke H ve Klebe G., 2002). Bunun ardından moleküllerin inhibiyon potansiyelleri, biyokimyasal anlamda enzim kinetiği ölçümleri sayesinde  $IC_{50}$  ve/veya  $K_i$  gibi değerlerin bulunmasıyla ölçülmektedir. Son olarak ise absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve emilim (ADME) çalışmalarıyla bu yeni inhibitör moleküllerin ilaç olma potansiyelleri belirlenebilmektedir.

## 1.2. Küçük Moleküllerin Enzim İnhibitörü Olarak Önemi

Küçük organik moleküllerle sağlanan enzim inhibisyonu ve bu alanda yapılan çalışmalar, yüksek enzim aktivitesinin önlenmesi nedeniyle farmasötik ve klinik alanında önemlidir. (Copeland, 2000; Copeland, 2005). Tıp, son yıllarda patojenik olduğu veya hastalıkla bağlantılı spesifik büyük moleküler yapıları hedef alan ilaç molekülleri ile alakalı bir moleküler bilim olmuştur.

Büyük moleküler yapılardan birisi olan enzimler, ilaç moleküllerinin ana hedefi konumunda bulunmaktadır. Bu hal enzimlerin, hastalık sürecinde yükselen aktivitelerinin

görülmesi ve küçük molekül ağırlığındaki ilaç molekülleri tarafından inhibisyona uğramasından kaynaklanmaktadır. Ek olarak ilaç potansiyelleri olan küçük organik moleküllerin hedefleri yapısal anlamda moleküle tamamlayıcı olan özgül bağlanma cepleri içermek zorundadır. Bu bölgeler/cepler hedef moleküller için aktivite yönünden kritik öneme sahip olan bir cep olmalıdır ve ilaçla bahsi geçen ceplerin etkileşimine bağlı olarak hedef molekülün aktivitesi düşmelidir. Enzimler, ilaç molekülleri ile etkileşen hedef moleküllerinin en popüler olanıdır. Enzimlerin üç boyutlu yapılarında mevcut olan aktif bölge veya allosterik bağlanma cepleri (enzimin hacimsel büyüklüğüne göre daha küçük hacimlidir ve hidrojen bağı veya diğer etkileşimleri yapabilme potansiyeline sahip bağlanma bölgelerine özgü yönelmiş gruplar ya da atom içeren hidrofobik cebi içerirler) en uygun ceplerdir. Günümüzde kullanılan çoğu ilaçların enzim inhibitörü olduğu ve bu çalışmaların artarak devam etmesi yakın zamanda farmasötik araştırmalar için ana hedef noktası olarak kalması hiç şaşırtıcı olmayacaktır.

Klinik durumda ilacın (en uygun dozda) oral olarak uygulanması arzu edilmektedir. İlaç olarak aktivite gösteren moleküllerin bazı fizikokimyasal kıstaslara uyduğu bilinmektedir. Bu kıstas; gen, protein ve terapötik bazlı doğal ürünlerin yerine küçük molekül yapıları ilaçların tercih edilmesinin en uygun olmasına sebep olmaktadır.

İlaç olarak bir molekülün *in vivo* faaliyet göstermesi için o molekülün 500 daltondan daha küçük bir molekül kütlesine sahip olması gerekmektedir. Bunun sebebi olarak hücre membranından geçip hedef moleküle ulaşması, dağıtılması ve absorblanması ve bozunmadan kalabilmesi mümkün olabilmektedir. Bu moleküller hidrofobik olmakla birlikte, hidrojen bağı dönörü ve spesifik heteroatom içermelidirler.

### 1.3. Endüstride Enzim Kullanımı

Enzimler hayati önemlerinin yanı sıra gıda ve diğer endüstrilerde ayrıca teknoloji alanında da önem taşırlar. Örneğin; şarap, bira, meyve suyu, süt ve çikolata kaplamalı gıda sanayinde, tekstil ve kağıt endüstrilerinde, çeşitli organik maddelerin ticari preparasyonlarında kullanılır. Her ne kadar ticari enzim üretim endüstrisi, geniş bir gelişme halinde ise de, enzimlerin kimyasal bileşimleri hakkında fazla bir bilgiye sahip olunmadığı yıllarda peynir, bira fermantasyonu diğer alkollü içkilerin üretiminde de bunların kullanımı söz konusu idi. Enzimlerin bu yararlı etkilerinin yanında, gıda maddelerinin bozulma ve

saklanmalarında çeşitli sorunlar doğurduğu da bilinmektedir. Bu nedenle gıda sanayiinde enzim teknolojisi ayrı bir önem taşır.

1998 yılında enzimlerin endüstriyel pazarı 1.7 milyar dolardır. Oluşan pazarın %44'ü yiyecek % 37'si temizlik ürünleri, % 10,8'i giyim, % 5,7'si deri, % 2,5'i kağıt hamuru ve kağıt endüstride uygulama alanlarına sahiptir. Tanısal ve tedavi edici enzimler bu pazara eklenmemiştir. Endüstriyel enzim pazarı zamanla artış göstererek 2000 yılında 2.1 milyar dolara ulaşırken, günümüzde ise enzim pazarı hızla büyümeye devam etmektedir. (Barredo, 2005). Tablo 1'de endüstrinin farklı alanlarında uygulama alanlarına sahip bazı enzimler yer almaktadır (Van der Maarel vd., 2002).

Tablo 1. Endüstride kullanılan bazı enzimler

Enzim	Uygulama Alanı
$\alpha$ -amilaz	Nişasta şurupları, fermantasyon, hayvan yemleri
$\beta$ -amilaz	Maltoz şurubu
Laktaz	Süt ürünlerinden laktozun giderilmesi
İnvertaz	Şeker pancarı ve kamıştan invert şurup üretimi
Tripsin	Bebek gıdalarının önceden sindirimi
Glukoz izomeraz	Nişasta endüstrisinde şurup tatlandırıcısı
Ksilanaz	Kağıt endüstrisinde renk giderilmesi

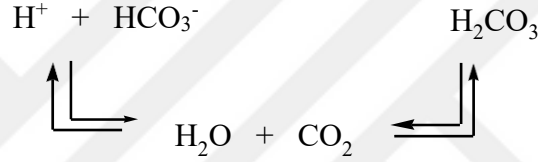
Karbonik anhidrazlar (CA) temel bir reaksiyonu katalizler: sırasıyla karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) ve bikarbonatın geri dönüşümlü hidrasyonu ve dehidrasyonu  $\text{CO}_2$  yakalama ve ayırma için mevcut yöntemler zor, pahalıdır ve  $\text{CO}_2$ 'yi atmosferden uzaklaştırmanın amacını etkili bir şekilde ihmal ederek engelleyici şekilde büyük enerji girişleri gerektirir. CA'nın  $\text{CO}_2$  üzerindeki etkinliği nedeniyle, karbon tutumu ve biyoyakıt üretimi gibi endüstriyel uygulamalar için CA'ların kullanılmasına ilgi artmaktadır. Son on yılda yapılan birçok çalışma, CA'nın  $\text{CO}_2$  yakalama uygulamalarına veya cihazlarına dahil edilmesi için çeşitli desteklerin üzerine immobilize etme çalışmalarına odaklanmıştır. Her ne kadar bu prensibin kanıtı doğrulanmış olsa da, test edilen mevcut CA'lar zorlu endüstriyel koşullara dayanmamaktadır. Büyük ölçekli genom sıralama projelerinin ortaya çıkışı, bakteriler, mikro ve makro algler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalardan yeni CA'lar aramak için ortaya çıkan birkaç çaba ile sonuçlanmıştır. CA'lar ayrıca tıbbi uygulamalarda, ilaç



verim sistemleri ve yapay akciğerlerde kullanımları için araştırılmaktadır (Gonzalez ve Fisher, 2014).

#### 1.4. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) aktif bölgesinde çinko ( $Zn^{+2}$ ) bulunduran bir metaloenzimdir.  $CO_2$  ve  $HCO_3^-$  arasındaki karşılıklı dönüşümün ivmelenmesi karbonik anhidraz tarafından sağlanır ve tersinir olan aşağıda gösterilen reaksiyonu katalizler. (Badger ve Price, 1994; Supuran ve Scozzafava, 2001).



Canlı organizmaların tüm gruplarında CA'lar bulunur. CA'lar değişkenlik göstermelerine rağmen (amino asit diziliminde, aktif bölge yapılarında) aynı reaksiyonu katalizledikleri görülür (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996; Liljas ve Laurberg 2000).

##### 1.4.1. Dağılımı ve CA Sınıfları

Günümüzde bilinmekte olan bütün CA'lar  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  CA olmak üzere altı sınıfa ayrılmışlardır. Sınıflandırma yapılırken, proteinin amino asit dizilişi, üç boyutlu yapısı, aktif bölgenin yapısını ve katalitik özellikleri esas alınmıştır (Supuran, 2016; Hewett-Emmett ve Tashian, 1996).

$\alpha$ -Sınıfı CA'lar genel olarak hayvanlarda yaygın şekilde görünmektedir. Bu sınıftaki CA genleri alglerde, birçok bakteride ve bitkilerde bulunmasına rağmen bu sınıflarda  $\beta$  sınıfı CA'lar da bulunur.  $\gamma$ -Sınıfı CA'ların birçoğu bir kısım bakteri ve arkealarda bulunurlar.  $\delta$  ve  $\zeta$ - sınıfı CA'lar yalnızca deniz diatomlarından izole edilmiştir.

$\alpha$ -Sınıfı CA'lar 16 memeli CA izoformunu barındırmaktadır. CA I-II, CA VII ve CA XII sitozolik enzimler, CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV membrana bağlı enzimler, CA VA ve CA VB mitokondriyal enzimler ve CA VI salgılanan bir izoenzimdir.

### 1.4.1.1. CA II

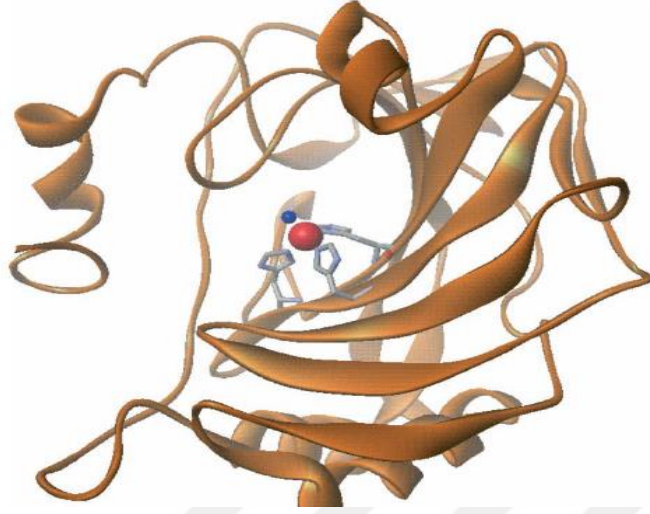
Karbobik anhidraz II (CAII), sülfonamidler ve yüksek katalitik aktivite için çok yüksek afiniteye sahip sitoplazmik bir enzimdir. İnsan vücudundaki saniyede  $10^6$  devir ile hızlı çalışan enzimdir (Lindskog S. 1997). CA II birçok dokuda bulunur (göz, böbrek, testis, beyin) ve bazı hastalıklara olası bir ilaç hedefi oluşturur (glokoma, ödem ve epilepsi). Bunlara rağmen bugüne kadar çoğunlukla kan hücrelerinde çalışmıştır (Alterio V. vd. 2012). İnsanda CA II geni 8q22 kromozomunda bulunur (Nakai H., vd. 1987). Beslenme güçlüğü, körlük, sağırlık, kemik iliği yetmezliği ve şiddetli anemi CA II ile ilişkili hastalıklardır.

Karbonik anhidraz aktivitesine etki eden çok sayıda bileşik vardır. Bunlar pratikte kullanılan ilaçlar, fizyolojik maddeler ve laboratuvarında test edilmiş kimyasal maddelerdir. Karbonik anhidrazı inhibe eden çoğu ilaç sülfonamid yapısındadır (C.Temperini vd. 2008). Bazı triazol sülfonamidler içinde antitümör aktivitesi gözlemlenmiştir (SitiRam vd. 2014).

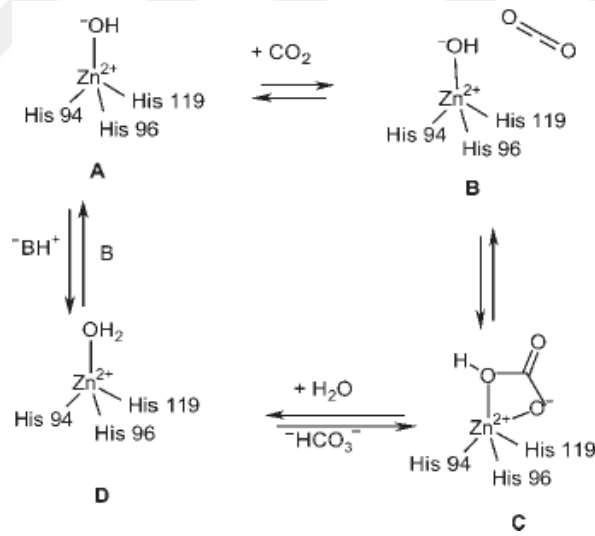
### 1.4.2. CA'nın Üç Boyutlu Yapısı ve Kataliz Mekanizması

CA'ların kataliz için Zn (II) iyonu gereklidir. X-ışını kristalografik verileri  $\alpha$ -CA için, metal iyonunun  $15 \text{ \AA}$  derinliğinde bir aktif bölge yarığının (Şekil 1) dibinde, üç histidin rezidüsü (His94, His96 ve His119) ve bir su molekülü / hidroksit iyonu tarafından koordine edildiğini göstermiştir (Supuran vd. 2002, Kim G vd. 2000 ve Briganti F. 1997).

Çinko bağlı olan su molekülü sırayla Glu106'nın karboksilat parçasına köprülenmiş olan Thr199'un hidroksil kısmı ile hidrojen bağı etkileşimlerinde bulunur. Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilikliğini artırır ve nükleofilik atak için substratı ( $\text{CO}_2$ ) uygun bir yere yönlendirir (Şekil 2). Enzimin aktif formu (Şekil 2A), Zn (II)'ye bağlı hidroksit ile bazik formdur. Bu güçlü nükleofil, çevresindeki hidrofobik cepte bağlı bulunan  $\text{CO}_2$  molekülüne saldırır (substrat bağlama bölgesi, insan izozimi CA II durumunda Val131, Val143 ve Leu198 rezidüsü içerir) (Şekil 2B). Zn(II) koordineli bikarbonat oluşumuna yol açar (Şekil 2C). Bikarbonat iyonu daha sonra bir su molekülü ile yer değiştirir ve çözelti içinde serbest bırakılır, enzim asit halini alır ve katalitik olarak aktif olmayan Zn(II)'ye koordine edilmiş su ile çözülür (Şekil 2D).

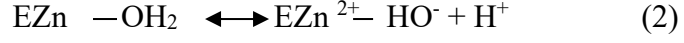
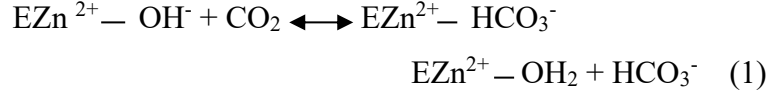


Şekil 1. Kırmızı küre; His94, His96 ve His119 tarafından koordine edilen çinko (II) iyonu ve mavi küre; dördüncü ligandında bir su molekülü/hidroksit iyonu görülür.



Şekil 2. CA'ların kataliz mekanizması

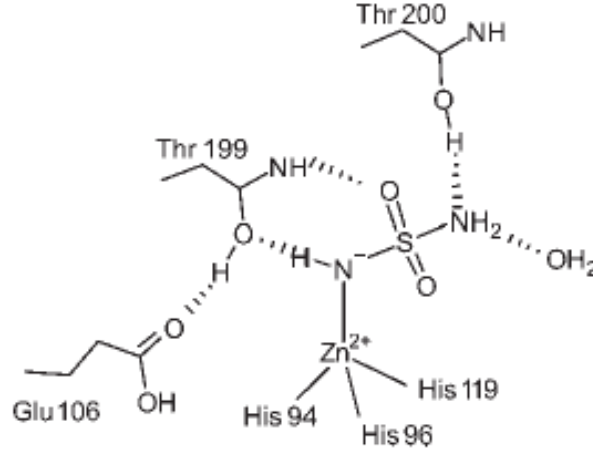
Enzimin yukarıdaki A formunu yeniden sağlayabilmek için Şekil 3'teki denklem (1-2) gerçekleşir. Katalizdeki hız sınırlayıcı adım, ikinci reaksiyondur, yani enzimin çinko-hidroksit türlerini yeniden oluşturan proton transferidir.



Şekil 3. CA kataliz denklemi

CA II, CA IV, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif izoenzimlerdeki işleme, aktif sitenin (His 64) girişine yerleştirilen bir histidin rezidüsü ve ayrıca bir histidin kümesi ile yardım edilir aktif alanın kenarından enzimin yüzeyine çıkıntı yapar, böylece çok verimli bir proton transfer işlemi sağlanır. Bu aynı zamanda CA II'nin neden bilinen en aktif enzimlerden biri olduğunu ( $k_{\text{cat}} = K_m 1,5 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  ile), difüzyon kontrolü sınırına yaklaşmakta olduğunu ve ayrıca klinik uygulamalara sahip inhibitörlerin tasarımında önemli sonuçları olduğunu da açıklar.

CA I, II ve IV izozimleri ile sülfonamid inhibitörlerinin birçok X-ışını kristalografik yapıları mevcuttur (Lindah vd, 1991; Stams vd, 1996; Kim vd, 2000). Bütün bu enzim-inhibitör komplekslerinde, deprotonlanmış sülfonamid, enzimin Zn (II) iyonuna koordine edilir ve NH grubu, sırasıyla, Glu106'nın karboksilat grubuna başka bir hidrojen bağıyla bağlanan Thr199'un O $\gamma$ 'sı ile bir hidrojen bağına katılır. SO<sub>2</sub>NH grubunun oksijen atomlarından biri de Thr199'ün NH kısmıyla direk hidrojen bağına katılır. Şekil 4'te hCA II'nin kristal yapıları bir sülfamoil kısmını (sülfonamid) içeren en basit bileşik gösterilir (Lindah vd, 1991; Stams vd, 1996). Sülfamid NHSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>'nin monoanyonunun, enzim aktif bölgesi içindeki Zn(II) iyonuna bağlandığı gösterilmiştir (Abbate, 2002). Bu yapı, bu fonksiyonel grubun (sulfonamid olanı), neden CA inhibisyonu için benzersiz özelliklere sahip olduğu konusunda bazı yakın görüşler sunmaktadır: (i) Zn(II) iyonuna koordine edilmiş negatif yüklü, büyük olasılıkla mono-protonlanmış bir azot sergilediği; (ii) eşzamanlı olarak, bu grup, bitişik Thr199'un oksijeni (O $\gamma$ 'sı) donör olarak bir hidrojen bağı oluşturur ve (iii) SO<sub>2</sub> oksijenlerinden biri ile Thr199'un NH arasında bir hidrojen bağı oluşur.



Şekil 4. X-ışını kristalografisi ile belirlenen şekilde sülfamidin (monoanyon olarak) hCA II'ye şematik bağlanması

### 1.4.3. CA Enziminin Fonksiyonları

CA'lar, temel bir fizyolojik reaksiyonu (karbon dioksit ve bikarbonat arasındaki dönüşüm) katalizlediği için ilaç keşfinde hedef olmuştur. Bu reaksiyonun, solunum atılım bölgeleri arasındaki CO<sub>2</sub>'nin taşınması, çeşitli doku ve organlarda elektrolitlerin salgılanması, pH düzenlenmesi, kemik gelişimi ve rezorpsiyonu, kalsifikasyon ve bazı metabolik biyosentetik (glukoneojenez, lipogenez ve üreajenez gibi) olaylarla ilişkisi vardır. CA'ların inhibisyonu hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde önemli yere sahiptir.

H<sup>+</sup> ve Na<sup>+</sup> değişiminin, CA aktivitesinden kaynaklı olduğu öngörülmüştür. CA'ın aktivitesinin reaksiyon ortamının iyon bileşimine ve kanın pH'sına bağlı olduğu ortaya konulmuştur. Böbrek yetmezliği ve diyabeti bulunan hastaların, hastalıklarının CA değişimleriyle alakalı olduğu bildirilmiştir. Patolojik şartlarda ve hastalıklarda insan eritrositlerinde CA II seviyesinde gözle görülür bir değişim olmazken CA I seviyesinde değişimler olduğu gözlemlenmiştir (Gambhir ve de la Zerda, 2007). Daha sonra yapılan çalışmada Stevens ve arkadaşları CA I ve II izoenzimlerinin düzeyinde diyabetli hastaların eritrositlerinde bir azalma olduğu bildirilmiştir. CA izoenzimleri obezite, glokom, ödem, osteoporoz, epilepsi ve kanser gibi birçok hastalığı tedavi etmek için hedef molekül haline gelmiştir. (Şentürk vd 2009; Çoban vd 2009; Fiore vd 2010)

Glokom hastalarının gözlerinde CA II'nin salgılandığı bulunmuştur. Dolayısıyla hastalığın yüksek göz basıncı (IOP)'nı oluşturmasında etkin rol oynadığı düşünülmektedir. IOP'ı düşürmenin yollarından biri de enzimi inhibe etmektir. Bu amaçla CA II'nin sülfonamidler tarafından inhibe edildiği bilinmektedir. (Maren, 1995; Innocenti vd, 2005).

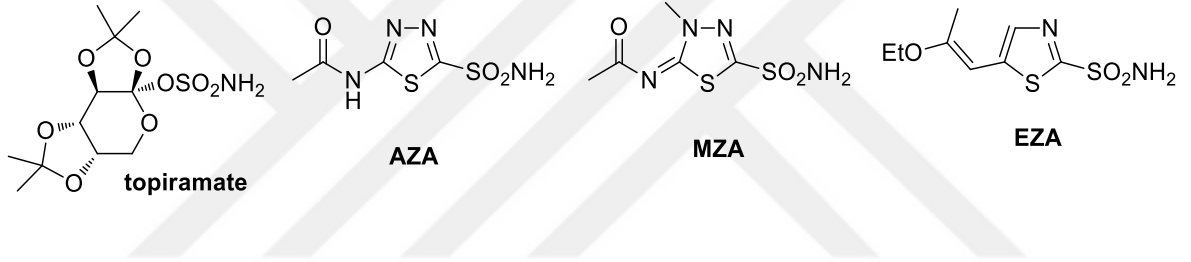
Bilindiği üzere, kolera bir gram negatif bakteri olan *Vibrio cholerae*'ın neden olduğu bir enfeksiyondur ve iyi tedavi edilmezse, ağır elektrolit kaybı ile seyreden şiddetli dehidrasyon ve hipovolemik (kan hacminin azalması) şok ile ölüme yol açmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde kirli sularla bulaşan koleranın, yılda yaklaşık 3-5 milyon kişiyi etkilediği ve bunların 100.000-130.000'inin ölümlerine sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Enfeksiyon esnasında *Vibrio cholerae* miktarının artması, karmaşık bir düzenleme basamaklarını başlatır ki bu reaksiyonlar Kolera toksini kodlayan genlerin ve diğer virulans genlerinin kopyalanmasını başlatır. Bu da bikarbonat artışı ile alkaliniteye neden olmaktadır. Jeffrey ve Basel'e göre, bir CA inhibitörü sülfonamid olan etoxzolamide, CO<sub>2</sub>'yi bikarbonata dönüştüren karbonik anhidraz enzimlerini inhibe etmekte ve böylece bikarbonat artışından kaynaklanan virulans (mikrobun kötü etkileri) artışını kontrol altına almaktadır (Alafeefy vd., 2014).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda CA'ların *in vitro* ve *in vivo* olarak birkaç tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Böylece antitümör tedavileri geliştirmek için bir ipucu olduğu gösterilmiştir.

#### 1.4.4. CA Sınıfları ve İnhibitörleri

CA enziminin inhibisyonu, antiobezite, antiglokom, antikanser, ve antikonvülsan, alanında farmakolojik alanlara sahiptir. Sülfonamidlerin CA inhibisyonunun terapötik etkilerinin ilk kez Mann ve Keilin (1940) tarafından keşfedilmesinin ardından, diğer sınıf inhibitörler de klinik anlamda kullanılmaya başlanmıştır. Bugün için klinik anlamda CA inhibitörleri glokom, epilepsi, gastroduodenal ülserler, asit-baz dengesizliği, kanser, obezite ve bazı nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, izoformlarının sayısının çokluğu (sadece insanda 15 adet), birçok organ ve dokuda yaygın bulunmaları ve mevcut ilaçların izoenzimlere karşı selektif olmayışları gibi nedenlerle (Çapkauskaite vd, 2010; Akdemir vd, 2013) bugüne kadar kullanılan CA inhibitörleri yeterince güvenli bileşikler değildir. Örneğin, Asetazolamidin (AZA), metazolamid (MZA) ve etokszolamid

(EZA) (Şekil 5) gibi ticari olarak kullanılan CA II inhibitörleri güçlü inhibitörler olmakla birlikte spesifik değildirler. Bu bileşikler sadece CA II enzimlerini değil, diğer izoenzimleri de inhibe etmekte ve bunun sonucu olarak da uyuşukluk, karıncalanma, depresyon, yorgunluk, kilo kaybı, gastro-intestinal rahatsızlıklar, metabolik asidoz, miyop gibi çeşitli yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bir diğer CA II inhibitörü, topiramate (Şekil 5) oldukça zayıf bir aktiviteye sahiptir. Bu durum araştırmacıları yeni CA inhibitörlerinin keşfi çalışmalarına yöneltmektedir (Aditama vd, 2015). Kimyasal olarak bakıldığında ise, çoğu CA inhibitörü bir primer sulfonamid grubu içermekle birlikte, yapılarında yer alan (hetero)halka(lar) bakımından üniform bir yapının bulunmadığı görülmektedir (Kasımoğulları vd, 2010).



Şekil 5. Asetazolamidin (AZA), metazolamid (MZA), etokszolamid (EZA) ve topiramate molekülleri

Yakın zamana kadar, yalnızca sulfonamidlerin CA'lar için yüksek afiniteye sahip olduğu bilinmekteydi. Bazı yeni veriler, CA inhibitörlerinin (CAI'ler) başka birçok bileşik türünden tasarlanabileceğini göstermektedir. Etki mekanizmasına bağlı olarak 5 farklı CA inhibitörü (CA I) sınıfı bilinmektedir.

Birinci sınıf; aktif bölgenin iki değerli metal iyonunu şelatlayan bileşikler yani çinko bağlayıcılarıdır (Supuran, 2017). Bu etkileşim, Zn<sup>2+</sup> atomu ile su molekülü/hidroksit iyonu arasındaki koordinasyonu kesintiye uğratar ve sonuç olarak enzimatik aktiviteyi bloke eder. Bu, sulfonamidlere ve bunların izosterlerine (sülfamatlar veya sülfamitler) ait olan en önemli inhibitör sınıfıdır.

Sulfonamidler en çok çalışılan CAI'lerdir (Supuran vd., 2015) (Şekil 6-1). Bu sınıf birçok bileşik diüretik (furosemide, indapamide, thiazides, vs) veya antitümör (pazopanib) ilaç olarak kullanılmakla birlikte glokom, obezite ve sara gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (Alafeefy vd., 2016; Khloya vd., 2015). Bu nedenle primer sulfonamid

grubu içeren aromatik veya hetero aromatik bileşikler yeni CA inhibitörü aktivitesine sahip ilaçların keşfi amacıyla yoğun ilgi gören ve üzerinde çalışılan bir grubu oluşturmaktadır. Ayrıca, pirazol halkasının da celecoxib gibi çok sayıda CA inhibitörlerinin yapısında yer alan çok özel ve önemli bir farmakofor grup olduğu bilinmektedir (Khloya vd., 2015).

İkinci sınıf ise çinko ile koordine edilen su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan(fenoller ve poliaminler gibi) bileşiklerdir (Şekil 6-2) (Supuran , 2016, Karioti vd., 2016).

Doğal fenoller, difenoller ve salisilatların ve ayrıca, sentetik bileşikler içinde kafeik asit, felurik asit ve *p*-kumarik asit gibi dopaminerjik bileşiklerin hCA I ve hCA II sitosolik enzimlerine karşı aktiviteleri incelenerek iyi sonuçlar elde edilmiştir (Maresca vd., 2015).

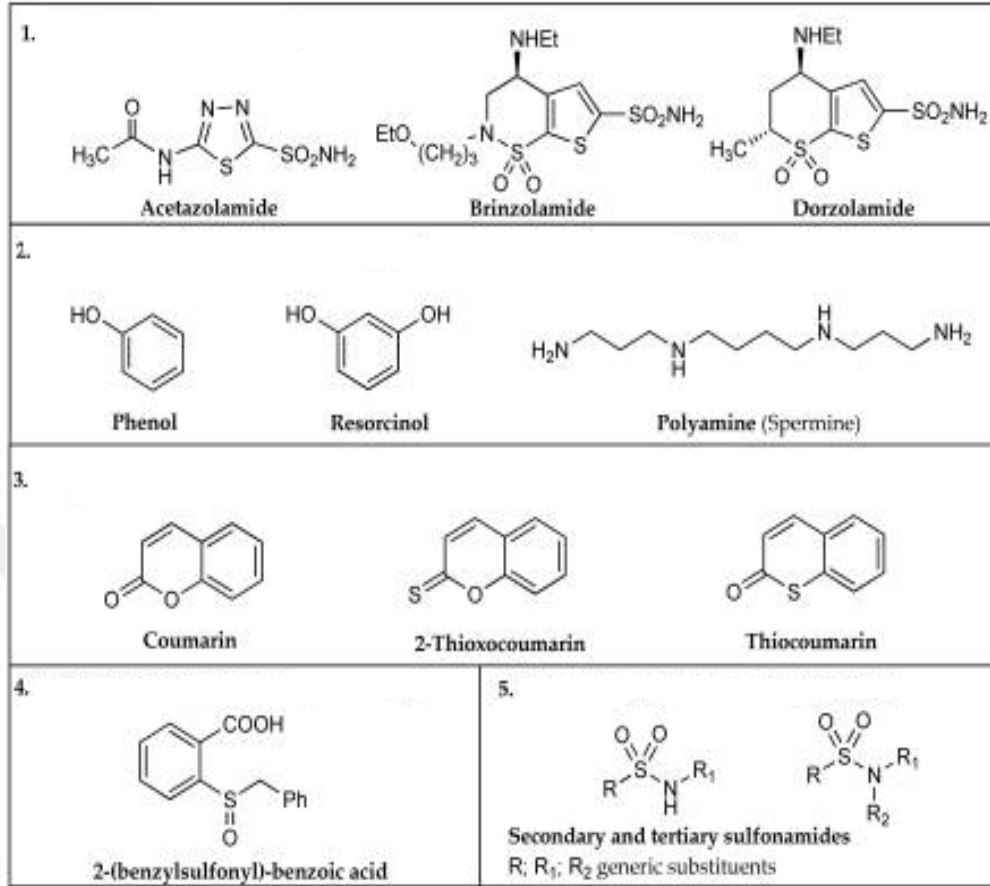
Üçüncü sınıf; aktif alanın girişini kapatan bileşikler (kumarinler ve izoserleri) dir (Şekil 6-3) (Maresca vd., 2010).

Kumarinler ve sülfokumarinler ise, bugüne kadar bilinen CA inhibitörleri içinde (sülfonamidler, sülfamat, ditiyokarbamatlar, ksantenler, poliamidler ve fenoller) izoform selektifliği en yüksek olan bileşikleridir. Bu özellik, enzimin aktif bölgesine bağlandıktan sonra kumarin/sülfokumarinlerin, hidroksi-sinnamik asitler/2-hidroksifenil-x-etenilsulfonik asitlere dönüşmelerinden ileri gelmektedir. Oluşan bu asitler, CA aktivatör bağlanma bölgesine bağlanmak suretiyle enzimin aktif bölge girişini tıkamak suretiyle enzimi inhibe etmektedir. Bazı fenolik asitlerin bütün CA I–XIV izoformlarına karşı etkili oldukları bilinmektedir (Maresca vd., 2015). Kumarinler (2-kromenonlar), tiyokumarinler, 2-tioksokumarinler, kumarin/laktonoksimleri ve kumarinlerin izomerleri olan flavonlar (4-kromenonlar) CA enzimleri için ön ilaç inhibitörleri olarak yeni keşfedilmiştir. (Balboni vd., 2012; Carta vd., 2012; Tanc vd., 2013; Wagner vd., 2010).

Dördüncü sınıf; 2- (benzilsülfonil) benzoik asit gibi aktif bölgeye bağlanan bileşiklerdir (Supuran, 2016) (Şekil 6-4).

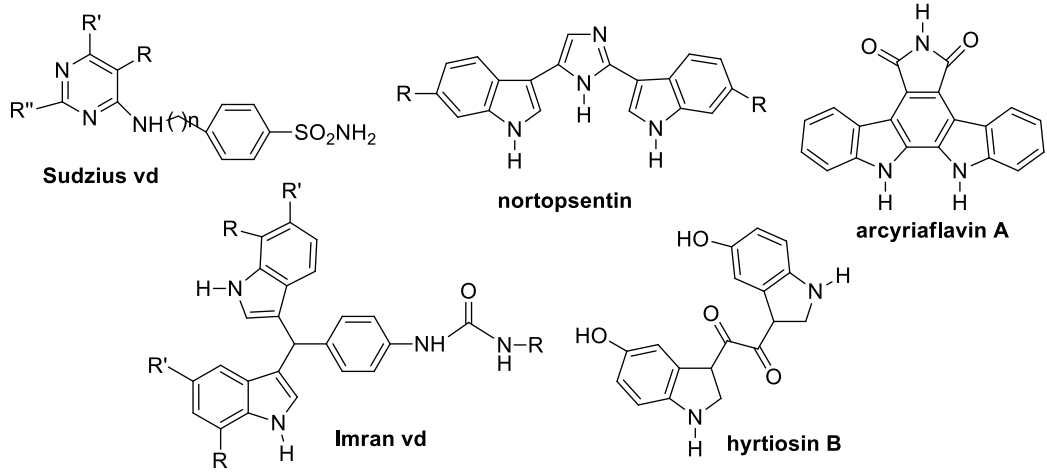
Beşinci sınıf CAI'ler ise (ikincil/üçüncül sülfonamidler, imatinib, vb. gibi) bilinen bir mekanizma olmadan hareket ederler (Supuran vd., 2015) (Şekil 6-5).





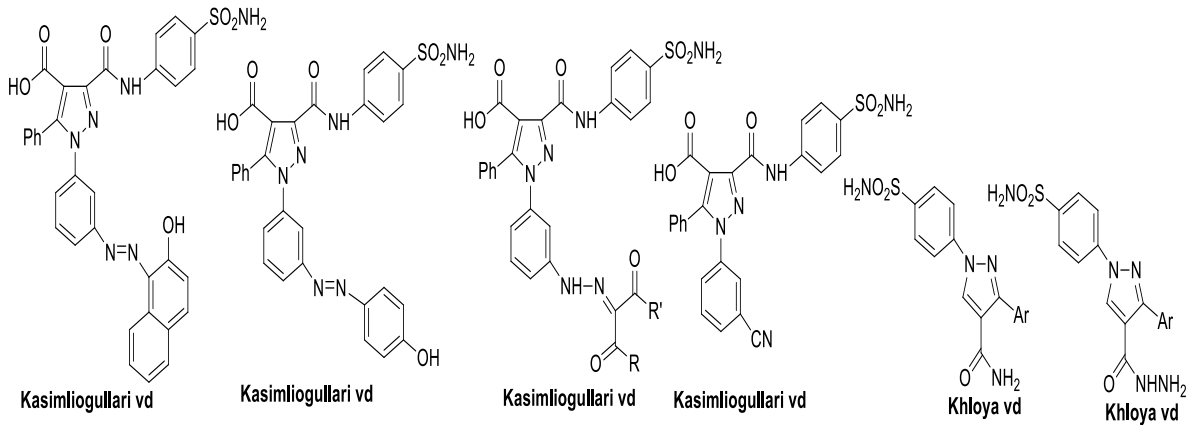
Şekil 6. 1) Çinko bağlayıcılar 2) Çinko koordineli su molekülü/hidroksi iyonuna bağlanan bileşikler 3) Aktif alanın girişini oluşturan bileşikler 4) Aktif bölgeden bağlanan bileşikler 5) CAI bilinen mekanizma olmadan hareket edenler

Heterohalka içeren sülfonamidler içinde pirimidinil benzensülfonamidler, selektif CA I, CA II, CA VII ve CA XII inhibitörleri olarak Sūdžius ve grubu tarafından bildirilmiştir (Sūdžius vd., 2010). Biyolojik aktivite gösteren doğal ürünlerin yapısında yer alan bir diğer önemli heterohalka da kuşkusuz indol halkasıdır. Bir CA inhibitörü olan nortopsentin yanında diğer doğal ürünler, arcyriaflavin A ve hyrtiosin B araştırma gruplarının üzerinde çalıştığı bileşiklerdir. CA inhibitörleri olarak bisindolilmetan bileşikleri ise Imran ve grubu tarafından sentez edilmiştir (Imran vd., 2015) (Şekil 7).



Şekil 7. Pirimidinil benzen sülfonamidler ve yeni indol halkaları

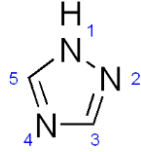
hCA İnhibisyonu gösteren bileşikler arasında pirazol türevleri de özel bir öneme sahiptir. Pirazol türevlerinin farmasötik kimya ve tarım alanlarında değişik uygulamaları bulunmaktadır ve bu bileşiklerin anti hCA aktiviteleri yanında antibakteriyel, antiinflamator, antiobezite, antidepresan, antikoagülan ve sitotoksit aktiviteleri de bildirilmiştir (Balseven vd., 2013). Kasımoğulları ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada, anti hCA aktivitesi gösteren, benzensülfonamid birimi de içeren pirazol türevleri sentez edilmiştir. Pirazol halkası içeren bir diğer grup benzensülfonamidler Khloya ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir ki bu bileşiklerde bir amid veya hidrazid fonksiyonunun varlığı da dikkati çekmektedir (Khloya vd., 2014) (Şekil 8).



Şekil 8. Priazol türevleri

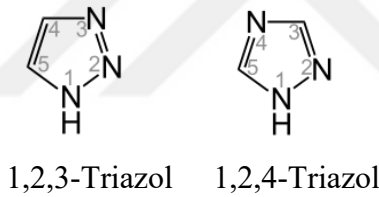
### 1.5. Triazollerin Yapısı ve Biyolojik Etkileri

Triazoller beşli halkada üç azot atomu ve iki adet karbon atomu içeren bileşiklerdir (Şekil 9) (Kharb vd., 2011).



Şekil 9. 1,2,4-Triazol halkası

Triazollerin 1,2,3-triazoller ve 1,2,4-triazoller olarak üzere iki tane izomeri vardır (Şekil10) (Ozimiński vd., 2003).



Şekil 10. Triazol izomerleri

Triazoller antifungal, antioksidan, antibakteriyel, antikonvülsan ve antitümör gibi ilaçlar olarak bulunmaktadır. Hastalıkların tedavisini umut olabilmek için Wilkinson vd. (2007, 2008) glikoziltriazol benzen sulfonamid molekülleri sentezlemiş ve karbonik anhidraz inhibisyonu üzerine etkisini incelemiştir. Azol halkaları içinde 1,2,4-triazol halkası, sergilediği değişik biyoaktivitelerden dolayı uzun zamandır araştırmacıların dikkatini çekmektedir ve bu birimi içeren ve antimikrobial, antitüberküler, analgesik, anti-inflammatör, anti-konvülsan, antiviral ve antidepresan aktivite gösteren çok sayıda ilaç bilinmektedir (Al-Masoudi vd., 2006; Siddiquia vd., 2011; SitaRam vd., 2014). Günümüzde ticari olarak satılan Fluconazole ve Itraconazole gibi ilaçlar da 1,2,4-triazol türevleridir. (Al-Majidi ve Saeed, 2013; Lima-Neto vd., 2012; Jamkhandi ve Disouza, 2013).

## 1.6. İlaç Keşfinde Yeni Yaklaşımlar

90'lı yılların başında kimya, fizik ve biyoloji bilimleri alanları ilaç keşfi çalışmalarının ilerlemesi için birlikte kullanılmıştır. Bu birliktelik önceki raslantı modeline nazaran, artık bilinçli olarak hastalıklara yönelik tedavi arayışları devam etmektedir. 2. Dünya savaşı esnasında antibiyotiklerin keşfi bu yaklaşımın en büyük örneklerinin başında gelmektedir. Bu bilgiler ışığında DNA'nın yapısının daha iyi anlaşılabilmesi yeni gelişmelere öncülük etmiştir. 90'lı yılların son kısmında artık kimya ve farmakolojinin iş birliği sayesinde kimyasallar, reseptör ve ligandların keşfi ve günümüzde kullanılan serotonin ve histamin antagonistleri keşfi yapılmıştır. Yine bu dönemde bilgisayar teknolojisi ve genetik bilimi iş birlikteliği başlamıştır. Bu olumlu birliktelik kanserle mücadelenin başlamasına öncülük etmiştir.

Biyolojik öneme sahip organik bileşiklerin sentezinde çevre dostu “yeşil kimya” tekniklerinin kullanımı en önemli yaklaşımlardan biri haline gelmiştir (Azizi vd., 2015; Majumder vd., 2014). Tek kap çok bileşenli reaksiyonlar üç veya daha fazla birimin tek bir operasyon ile, başka bir deyişle tek kap içinde birleştirildiği reaksiyonlar olarak kabul edilmektedir (Shaabani vd., 2016). Çok bileşenli tek kap reaksiyonlar özellikleri iyileştirilmiş biyoaktif bileşiklerin sentezine olanak sağladığı için organik kimya, medisin kimya ve kombinatoriyal (bütünleştirici) kimya araştırmalarının önemli bir ilgi alanını oluşturmaktadır. Tek kap çok bileşenli reaksiyonlarının geleneksel tip sentezlerle karşılaştırıldıklarında, esnek, ekonomik, zaman ve enerji tasarruflu ve yüksek verimli olmaları gibi bazı üstünlükleri bildirilmiştir (Yamuna vd., 2011; Majumder vd., 2014; Dongare vd., 2016). Yeni ilaç geliştirme çalışmalarında kombinatoriyal kimyanın başarılı sonuçlar vermesi, heterosiklik tek kap çok bileşenli metodolojiler ve çevre dostu yöntemlerin geliştirilmesine büyük ölçüde bağlıdır (Dongare vd., 2016). Bugün için, çok bileşenli bir reaksiyonu, stokiometrik oranlarda kullanılan toksik katalizörler, toksik çözücü içeren ortamlar olmaksızın ve/veya pahalı saflaştırma teknikleri kullanılmaksızın katalitik bir “tek basamaklı” reaksiyon ile gerçekleştirmek “*sanatı*”, modern organik kimyanın olduğu kadar “*yeşil kimya*”nın da önemli hedeflerinden biri haline gelmiştir (Ranu vd., 2000).

Mikrodalga ışınlandırma yönteminin, tek kap çok bileşenli reaksiyon tekniği ile kombine kullanılmasının, bilimsel ve yeşil kimya açısından özel bir önemi bulunmaktadır. Bu durum reaksiyon süresini ve kullanılan enerjiyi bir hayli azaltmakta ve farmasötik açıdan

önemli ve geniş bir kimyasal yapı çeşitliliği ve etki spektrumuna sahip yeni bileşiklerin geliştirilmesi için ekonomik bir yol sağlamaktadır (Mathew vd., 2007; Tala vd., 2015).

Son yıllarda ultrasonik ışınlama yöntemi de sentetik bakımdan önemli reaksiyonların hızlandırılması amacıyla kullanılan bir diğer teknik olarak ortaya çıkmıştır. Bilimsel çevrelerce bir yeşil kimya tekniği olarak değerlendirilen ultrasonik sentez yöntemi de belli avantajlara sahip olduğu şeklinde değerlendirilmektedir. Bu avantajlar; reaksiyon veriminde önemli miktarlarda iyileşme, reaksiyonun yürüyüşünde istenen modifikasyonların yapılabilmesi, ürün oluşumunda büyük bir selektivite ve saf ürün oluşumu, kolay uygulanabilirlik, az miktarda çözücü kullanımı ve enerji tasarrufu, reaksiyon süresinin önemli derecede azalması ve minimum miktarda yan ürün oluşumu olarak kabul edilmektedir (Shi vd., 2015; Naeimi ve Shaabani, 2017; Nikpassand vd., 2016).

Günümüzde, biyolojik hedefe ait bilgilere dayanarak, yeni ilaç moleküllerinin tasarlandığı ilaç geliştirme yöntemi olan akılcı ilaç tasarımı yöntemi kullanılmaktadır. Yeni ilaç moleküllerine ulaşmak için önemli bilgisayar yöntemleri ve yazılımları kullanılmaktadır.

### **1.6.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları**

Moleküler modelleme, ilgilenilen belirli bir proteine bağlanan ve iki veya daha fazla molekül arasında oluşan moleküller arası kompleksin yapısını tahmin etmek için kullanılan bir ligandın "en uygun" yönelimini tanımlayan bir optimizasyon problemi olarak tanımlanabilir. En ilginç vaka, ilaçlardaki uygulamaları nedeniyle protein ligand etkileşimidir. Ligand, proteinin bağlanma bölgeleriyle etkileşime giren küçük bir moleküldür. Bağlamanın meydana gelebileceği birkaç olası karşılıklı uyum vardır. Bunlar genellikle bağlanma modları olarak adlandırılır (Vijesh vd., 2010). Modern ilaç tasarımında, moleküler modelleme, ilaç-reseptör etkileşiminin anlaşılması için rutin olarak kullanılır. Moleküler modelleme, ilaç reseptörü etkileşimleri hakkında yararlı bilgiler sağlar ve küçük molekül ilaç adaylarının afinitesini ve aktivitesini tahmin etmek amacıyla protein hedeflerine bağlanma oryantasyonunu tahmin etmek için sıklıkla kullanılır.

Bu modelleme yaklaşımını baz alarak sentezden önce ilaç hakkında bilgiye sahip olarak, ilaç için istenilen özellikler belirlenip, sonrasında bu özellikler yardımıyla uygun sentezler gerçekleştirilir. Bunun yanı sıra bilgisayar ekranında döndürme yapılarak molekülü

değişik açılardan görebilir, geometrileri ve izometrik yapıları belirlenebilir, enerjileri hesaplanabilir, MO diyagramları elde edilebilir.

### 1.6.2. ADME Özellikleri

Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon (ADME) özellikleri, bileşiklerin hedef proteinine ulaşma ve vücuttan kolayca elimine edilme yeteneğini açıklar. İlaç tasarımına yönelik hesaplamalı yaklaşım, çeşitli bileşiklerin moleküler analizlere tabi tutulma maliyetini ve süresini azaltmak için büyük ölçüde yardımcı olur. Lipinski'nin beş kuralı (ROF), doğada olduğu gibi bir bileşiğin doğasında olduğu gibi kabul edilmesi gereken bazı kriterleri içerir; bu kriter, 500 'den (<500) daha düşük bir molekül ağırlığı, 5'e eşit veya daha az hidrojen bağ donörleri, 10'a eşit veya daha az hidrojen bağı alıcıları ve 5'ten (<5) düşük oktanol su katsayısı (logP)dir. Bu nedenle, bu kural ile uyumlu olan bileşikler, doğada ilaç benzeri olarak kabul edilir. LADME, ADMET veya LADMET kullanılarak toksidite de göz önünde bulundurulur (David vd., 2018).

### 1.6.3. Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkisi (QSAR)

Kemometriklerin uygulandığı Kantitatif Yapı-Etki İlişkilerine (Quantitative Structure-Activity Relationships) kısaca QSAR denir. QSAR yaklaşımı ile kimyasal yapı niteliklerinin (moleküler nitelikler (descriptors)) biyolojik aktivite arasındaki ilişkisi, fiziko-kimyasal özellikleri arasındaki ilişkisi (QSPR = Quantitative Structure Property Relationships) ve kimyasalların çevresel ve toksikolojik davranışlarının irdelenmesi yapılabilmektedir

İlk olarak, fiziksel organik kimyanın mantıksal uzantısı olarak kavramsallaştırılan, QSAR modellemesi, nispeten basit regresyon yöntemleri kullanarak uygulamada küçük serilerdeki bileşiklere kadar geniş bir çeşitlilik göstermektedir ve çok çeşitli istatistiksel ve makine öğrenme teknikleri de kullanılarak binlerce farklı moleküler yapı içeren çok büyük veri setlerinin mümkün olabilmektedir. QSAR modelleri, kimyasalların, malzemelerin ve insan sağlığı nanomalzemeleri ve ekolojik sistemler üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için geniş bir uygulama alanı bulunur.

### 1.7. Literatür Özeti

CA'nın keşfinden bu zamana kadar (1932) tam 86 yıl geçmiştir CA ilk önce omurgalıların eritrositlerde keşfedilmiştir (Brinkman vd., 1932). CA kısa süre sonra 1933'te Meldrum ve Roughton tarafından eritrositlerden izole edildi. 1940'da çinkonun bir ortak kofaktör olduğu keşfedildikten sonra, CA ilk tanınan metaloenzim oldu (Keilin ve Mann 1940). Aynı zamanda, sülfanilamidin, farmakolojik incelemelere ve sonuçta CA inhibitörlerinin glokom tedavisi için önemli olarak keşfedilmesine yol açan enzim inhibitörü olduğu sonucuna varılmıştır (Mann ve Keilin 1940; Maren 1995 ve Khalifah 2003).

Lindskog, çinko iyonunu kobalt ile değiştirdiğinde enzimin aktivitesinin etkilenmediğini tespit ettiğinde, enzime olan ilgi de kazanılmış oldu (Lindskog ve Malström, 1962). Bu, metallerin oksidasyonu ile ilgili birçok çalışmaya ve enzimin aktivitesinin yakındaki grupların iyonlaşmasına bağlı olduğu teorilerine yol açtı (Whitney vd., 1967;; Appleton ve Sarkar 1974; Shinar ve Navon, 1974). İnsan eritrositleri, 1970'lerde CA-I (Andersson vd., 1972 ve Lin ve Deutsch 1973) ve CA-II'nin ilk amino asit sekanslarını izole etmek ve elde etmek için kullanıldı (Henderson vd., 1973 ve Lin ve Deutsch 1973). John Edsall, insan eritrosit CA'nın kinetiği üzerine kapsamlı çalışmalar yaptı ve ayrıca ilk yarışmalı inhibitör imidazolü keşfetti (Edsall 1968 ve Khalifah 2003).

Edita ve arkadaşları bir dizi tiazol süstitüe benzen sülfonamid bileşikleri sentezlemiş, 12 insan CA izozimi üzerine inhibisyonunu çalışmış ve sentezledikleri gruplardan birkaçının antikanser hedefi olan CA IX'e seçicilik gösterdiğini bildirmiştir (Edita vd., 2018)

Azol halkaları içinde 1,2,4-triazol halkası içeren güçlü antitümör bileşikler de bildirilmiştir (SitaRam vd., 2014). SitaRam ve grubu ise yaptıkları bir çalışmada, tümör bağlantılı CA inhibitörleri olarak triazol içeren benzensulfonamidler elde etmişlerdir. Triazol içeren sulfonamidler, Carta ve grubu tarafından da CA inhibitörleri olarak elde edilmiştir (Carta vd., 2016). Chandak ve grubu, tümör oluşumu ile ilgili CA'ların selektif inhibisyonuna yol açan inhibitörlerin sentezi amacıyla, benzensulfonamid ve kumarin halkalarına ilaveten pirazol, imidazol ve/veya 1,3-tiyazol halka(lar)sı içeren yeni hibrit bileşikler elde etmişlerdir (Chandak vd., 2016). Safak ve çalışma arkadaşları bir dizi 1,2,4-triazol-5-on bileşimini çevreci sentez tekniği olan tek kap çok bileşenli reaksiyon tekniği ile sentezleyip, karbonik anhidraz üzerine inhibisyonunu, antimikrobial, antitumor gibi farklı biyolojik aktiviteler sergileme potansiyelini, moleküler modelleme tekniği kullanarak

molekölün en iyi bağlanma pozisyonunu bularak aynı zamanda ADME çalışmasıyla da ilaç potansiyelini ortaya koymuştur (Akin Ş., vd., 2018).

### 1.8. Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi

Bu çalışmada KTÜ, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı araştırmacıları tarafından sentezlenmiş olan bazı organik bileşiklerin (triazol türevi) endüstriyel ve klinik öneme sahip karbonik anhidraz enzimi için inhibisyon potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu hususlar göz önüne alındığında çalışmadaki temel amaçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Ticari olarak satın alınan sığır serum karbonik anhidrazın optimum çalışma şartlarının tespit edilmesi ve enzime ait kinetik büyüklüklerin ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) tespit edilmesi,
2. İncelenen organik moleküllerin (triazol türevleri) reaksiyon karışımında deneysel biyokimyasal kinetik çalışmaların tekrarlanmasıyla birlikte herhangi bir CA inhibisyonuna sebebiyet verip vermediklerinin belirlenmesi ve eğer inhibisyon söz konusuysa incelenen moleküller için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerlerinin belirlenmesi,
3. Karbonik anhidrazı en etkili bir şekilde inhibe eden molekülün varlığında inhibisyon türünün belirlenmesi,
4. Bu organik moleküllerin moleküler modelleme çalışmalarıyla, karbonik anhidraza ne derecede bağlandığının enerji hesaplamalarıyla ortaya konulup, deneysel çalışmalarla teorik çalışmaların birlikte değerlendirilmesi,
5. En etkili inhibisyona sahip olan molekülün ADME çalışmasıyla ilaç olabilme etkinliğinin belirlenmesi,
6. İnhibisyona sebebiyet veren organik moleküllerin alternatif ilaç aday molekülleri olarak endüstride ve farmasötik kimya alanlarında kullanılmak üzere biyoteknolojiye kazandırılması.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Yapılan çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzim Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan Enzim ve Kimyasallar

Kimyasalın Adı / Enzim	Marka ve kodu
Sığır Eritrosit Karbonik Anhidraz(bCA)	Sigma, C3934
Sülfonilamid	Sigma, 46874
<i>p</i> -Nitrofenil asetat ( <i>p</i> -NPA)	Sigma, N8130
Etanol	Sigma, 32221
DMSO	Sigma, S0481

#### 2.1.1. Enzim, Tampon ve Substrat Çözeltileri

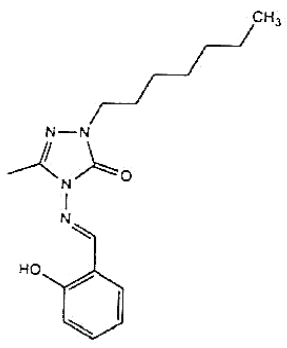
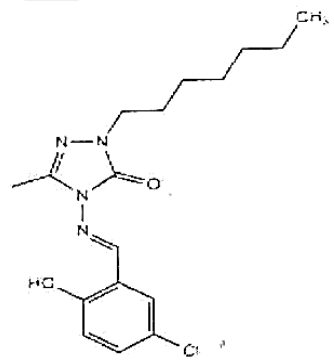
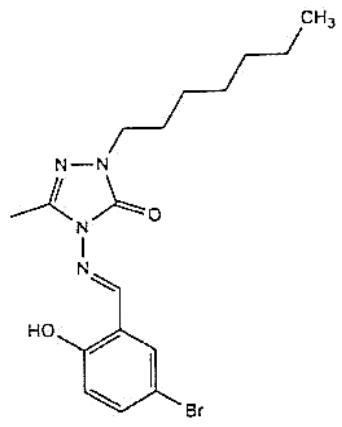
• 50 mM, pH 7,4 Tris-SO<sub>4</sub> tamponu: 6,055 g Tris yaklaşık 950 mL saf suda çözüldükten sonra pH 7,4 oluncaya kadar 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile titre edildi ve çözeltinin hacmi saf suyla 1 L’ye tamamlandı.

• *p*-Nitrofenil Asetat (*p*-NPA) Çözeltisi: Çözelti için 27,2 mg *p*-NPA tartılarak, 1 mL asetonda çözüldü. Hızlıca karıştırılmakta olan 49 mL saf suyun içerisine yavaşça ilave edildi. *p*-NPA çözeltisi her seferinde taze hazırlandı. Bu substrat çözeltisinin konsantrasyonu 3 mM olmakla birlikte daha derişik hazırlamak *p*-NPA’nın çözünürlük sınırlamasından dolayı mümkün olmamaktadır.

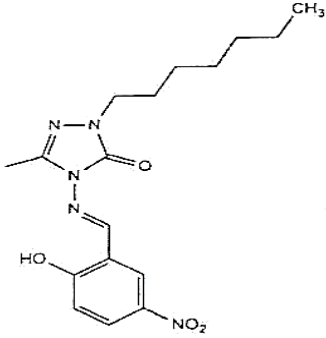
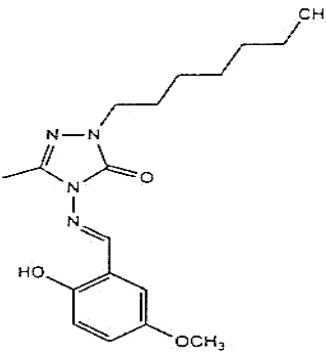
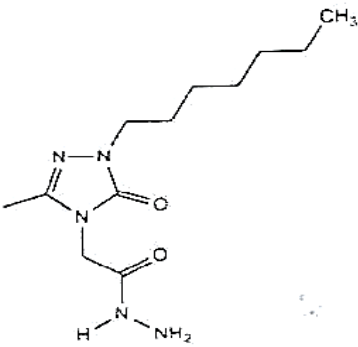
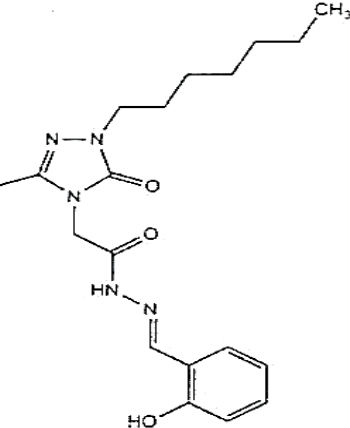
• Karbonik Anhidraz (CA) Çözeltisi: 1 mg karbonik anhidraz tartılıp, önceden hazırlanmış olan 1 mL Tris-SO<sub>4</sub> tamponunda (50 mM, pH 7,4) çözüldü. Çözelti stoğu 1 mg/mL dir.

### 2.1.2. Çalışmada Kullanılan İnhibitör Moleküller

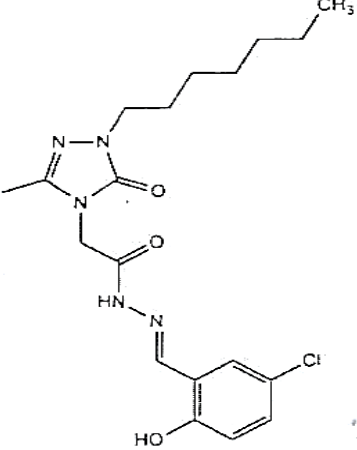
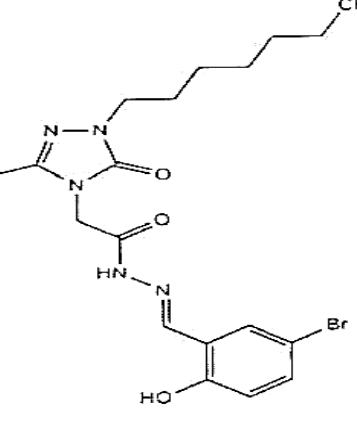
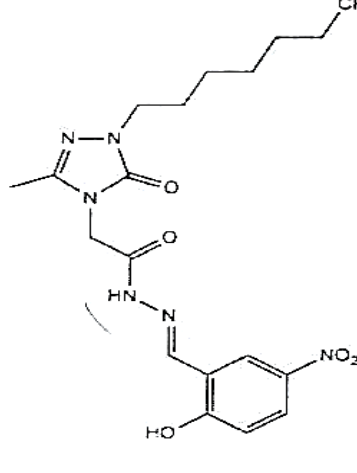
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan İnhibitör Molekülleri

Numarası	Formülü	Formülü
3a	4-[[2-Hidroksifenil)metilen]amino]-5-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-tirazol-3-on	
3b	4-[[5-Kloro-2-hidroksifenil)metilen]amino]-5-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-tirazol-3-on	
3c	4-[[5-Bromo-2-hidroksifenil)metilen]amino]-5-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-tirazol-3-on	

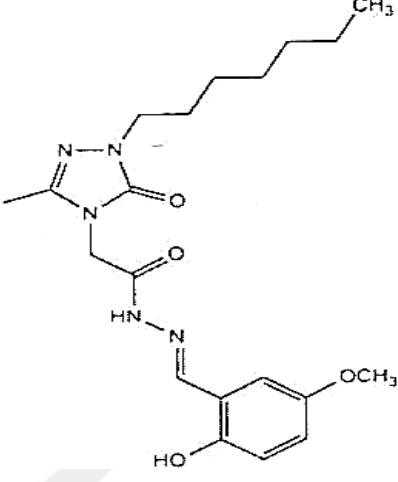
Tablo 3'ün devamı

3d	4-[[2-Hidroksi-5-nitrofenil)metilen]amino]-5-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-tirazol-3-on	
3e	4-[[2-Hidroksi-5-metoksifenil)metilen]amino]-5-metil-2,4-dihidro-3H-1,2,4-tirazol-3-on	
6	2-(1-Heptil-3-metil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il)asetohidrazit	
7a	2-(1-Heptil-3-metil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il)-N'-[(2-hidroksifenil)metiliden]asetohidrazit	

Tablo 3'ün devamı

7b	2-(1-Heptil-3-metil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il)-N'-[(5-kloro-2-hidroksifenil)metiliden]asetohidrazit	
7c	2-(1-Heptil-3-metil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il)-N'-[(5-bromo-2-hidroksifenil)metiliden]asetohidrazit	
7d	2-(1-Heptil-3-metil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il)-N'-[(2-hidroksi-5-nitrofenil)metiliden]asetohidrazit	

Tablo 3'ün devamı

7e	2-(1-Heptil-3-metil-5-okso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il)-N'-[(2-hidroksi-5-metoksifenil)metiliden]asetohidrazit	
----	--	--

### 2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 4'te verilmiştir.

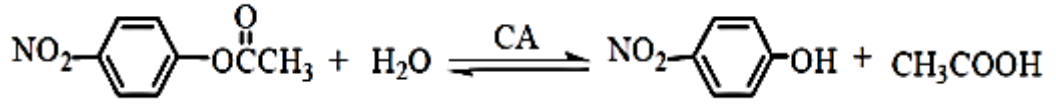
Tablo 4. Kullanılan Cihazların Listesi

Cihaz İsmi	Marka	Model
pH metre	Inolab	WTW pH 720
Destile Su Cihazı	Sartorius	Arium 611UV
Spektrofotometre	Perkin Elmer	Lambda 25
Buzdolabı	Profilo	BD4303ANFE
Terazi	Ohaus	Pioneer
Buz Makinesi	Hoshizaki	FM-80EE
Derin Dondurucu	Regal	RDD-1280

## 2.2. bCA Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu

### 2.2.1. CA (Esteraz) Aktivitesi Tayini

CA aktivitesi Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan esteraz aktivitesi yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemin prensibi, CA enziminin, substratı olarak kullanılan *p*-NPA'yı 348 nm dalga boyunda absorpsiyon veren *p*-nitrofenolat veya *p*-nitrofenol'e hidroliz etmesi esasına dayanır. Oluşan *p*-nitrofenolat veya *p*-nitrofenolün ikisi de 348 nm dalga boyunda aynı absorbansa sahiptir. Bu sebeple fenol grubundaki elektrofilin (H<sup>+</sup>) hidrolize olmaması ölçümü etkilemez (Armstrong vd 1996; Verporte ve Mehta 1967). Reaksiyon denklemi ve aktivite tayin yöntemi aşağıdaki gibidir.



150 µL enzim çözeltisi (50 mM, pH 7,4 Tris-SO<sub>4</sub> tamponunda), 500 µL Tris-SO<sub>4</sub> tamponu (50 mM, pH 7,4), 100 µL saf su ve 750 µL *p*-nitrofenil asetat (*p*-NPA, 3 mM stok çözeltisi) küvet içerisine pipetlenerek reaksiyon başlatıldı. Karışım lag fazı için oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi. Daha sonrasında spektrofotometre 348 nm dalga boyuna ayarlanarak karışımın 9 dakika boyunca köre karşı absorbansı izlendi. Bir ünite enzim aktivitesi, oda sıcaklığında (25 °C) 1 dakikada açığa çıkan 1 µmol *p*-nitrofenol olarak verildi. Tayin yönteminde kullanılan çözeltiler ve miktarları tabloda gösterilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. bCA Aktivitesinin Tayini İçin Reaksiyon Karışımı

Reaktifler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (50 mM, pH 7,4)	650	500
Saf su	100	100
Karbonik anhidraz çözeltisi (1 mg/mL)	---	150
<i>p</i> -NPA (3 mM)	750	750

### 2.2.2. Enzim Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi

bCA'nın optimum konsantrasyonu belirlenirken sırasıyla *p*-NPA (1,5 mM nihai), tris tamponu (50 mM, pH 7,4) ve enzimin nihai konsantrasyonu 1-37,5 µg/mL skalasından olacak şekilde 2.2.1'de bahsedildiği üzere bir dizi aktivite tayini yapıldı. Hesaplanan aktivite değerleri ile enzim konsantrasyonuna karşı grafik çizildi. Daha sonraki çalışmalar, bu grafikten tayin edilen ve ilk hız ölçümlerinin sağlıklı bir şekilde yapılabileceği uygun bir enzim konsantrasyonunda gerçekleştirildi (Paul vd., 1991).

### 2.2.3. Substrat Konsantrasyonunun Aktivite Üzerine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun bCA aktivitesi üzerine etkisini gözlemlemek için, sabit enzim konsantrasyonunda (5 µg/mL nihai) sıcaklık (25 °C) ve pH (7,4) sabit tutularak, bir seri farklı substrat konsantrasyonları (*p*-NPA nihai konsantrasyonu 0,2-2,5 mM aralığında) içeren reaksiyon karışımları hazırlanarak aktivite tayinleri yapıldı. Sonuçlar nezdinde hız değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve CA için *p*-NPA mevcudiyetinde  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri tayin edildi (Lineweaver ve Burk, 1934).

### 2.2.4. Sıcaklığın Aktivite Üzerine Etkisi

bCA enzim aktivitesinin optimum olduğu sıcaklık değerini belirlemek amacıyla önceden belirlenen substrat ve enzim konsantrasyonları varlığında ve pH 7,4'de, 10-70 °C sıcaklık skalasında 10 °C sıcaklık farkı olacak şekilde bir dizi reaksiyon hazırlanarak 2.2.1'de bahsedildiği üzere aktivite tayinleri yapıldı. Daha sonra elde edilen veriler ışığında sıcaklık-%bağıl aktivite grafikleri çizildi ve enzim aktivitesi için optimum sıcaklık değerleri belirlendi (Dincer vd., 2002). Bundan sonraki çalışmalar belirlenen optimum sıcaklık değerinde gerçekleştirildi.

### 2.2.5. pH'nın Aktivite Üzerine Etkisi

bCA enziminin optimum pH'sını belirlemek için reaksiyon karışımı içerisine önceki çalışmalar sonucunda belirlenen konsantrasyonlarda substrat ve enzim (her bir reaksiyon karışımında sabit tutularak) ilave edildi. Optimum sıcaklık değerinde reaksiyon karışımına önceden hazırlanmış olan pH 5,0 için 50 mM asetat tamponu, pH 6,0-7,0 için 50 mM fosfat

tamponu, pH 7,4 için 50 mM tris-SO<sub>4</sub> tamponu ve pH 8,0-9,0 için 50 mM tris-HCl tamponları eklenerek 2.2.1’de anlatıldığı gibi enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar ile pH- %bağıl aktivite grafiği çizildi ve optimum pH değeri belirlendi (Colak vd., 2005). Bundan sonraki çalışmalar tayin edilmiş olan optimum pH değerinde yapıldı.

### 2.3. İnhibisyon Çalışmaları

#### 2.3.1. Organik Moleküllerin Sığır Serum Karbonik Anhidraz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sığır serum karbonik anhidraz (bCA) aktivitesi yukarıda bahsedildiği şekilde optimize edildikten sonra 3a-e, 6, 7a-e moleküllerinin bCA inhibisyon potansiyelleri incelendi. İnhibisyon çalışmaları için organik moleküllerin stok çözeltileri DMSO:etanol (1:1) çözücü çifti içerisinde hazırlandı. Reaksiyon karışımı sırasıyla, tampon, bCA çözeltisi (nihai 5 µg/mL) ve inhibitör çözeltisi (reaksiyon karışımlarındaki nihai konsantrasyonları olacak şekilde; 3b, 3c, 3d, 6 ve 7d için 0-50 µM, 3a için 0-5 µM, 3e için 0-15 µM, 7a için 0-5000 µM, 7b için 0-100 µM, 7c için 0-200 µM ve 7e için 0-1500 µM) Tablo 6’da verilen miktarlarda, karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika ön inkübasyon yapıldı (Supuran, 2003). Daha sonra *p*-NPA (substrat) yukarıda belirtilen konsantrasyonda reaksiyon karışımına belirtilen hacimde eklendi. Bundan sonraki işlemler 2.2.1’de bahsedildiği gibi yapıldı. Kontrol karışımına inhibitör çözücüsü (ön inkübasyon karışımındaki inhibitör çözeltisi yerine) konuldu. Literatürde belirtildiği gibi enzimler organik çözücüler varlığında inhibe olabilmektedir (Copeland, 2005). Bu nedenle inhibisyon çalışmalarındaki kontrol karışımlarında çözücünün inhibisyon etkisi de dikkate alınarak reaksiyon ve kontrol karışımları hazırlandı ve organik çözücünün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu %1-2’i aşmayacak şekilde ayarlandı. Organik moleküller için ayrı ayrı [inhibitör]-%bağıl aktivite grafiği çizildi ve *IC*<sub>50</sub> değerleri belirlendi.



Tablo 6. bCA Çalışması İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Reaktifler	Kontrol ( $\mu\text{L}$ )	Numune ( $\mu\text{L}$ )
Tris-SO <sub>4</sub> Tamponu	550	550
bCA Çözeltisi	150	150
İnhibitör Çözeltisi	---	50
İnhibitör Çözücüsü	50	---
<i>p</i> -NPA Çözeltisi	750	750

### 2.3.2. İnhibisyon Türünün Belirlenmesi

İnhibitör moleküllerinin 2.3.1’de bahsedilen şekilde  $IC_{50}$  değeri bulundu ve bu moleküllerden  $IC_{50}$  değeri en düşük olarak tespit edilen inhibitör molekülü varlığında (7c molekülü) inhibisyonun türü ve  $K_i$  değeri hesaplandı. Çalışmalar optimum şartlar altında gerçekleştirildi.

Bu çalışmada 7c molekülünün yokluğunda ve iki değişik konsantrasyonunda (15  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$ ) yukarıda ifade edildiği şekilde aktivite tayini yapıldı. Elde edilen verilerden Michealis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. İnhibitör yokluğunda ve inhibitör mevcudiyetinde  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri bulunduktan sonra bu kinetik değerlerin değişimi gözlemlenerek inhibisyon türü belirlendi.  $K_i$  değeri matematiksel olarak hesaplandı. 0,2-1,5  $K_m$  aralığındaki substrat ve %18-67 inhibitör (I) konsantrasyonları seçilerek çalışma yapıldı.

## 2.4. İn Siliko Çalışmalar

### 2.4.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları

İnhibitör moleküllerinin enzime bağlanma özelliklerini tayin etmek için doking çalışmaları yapıldı. Organik moleküllerin enzim aktif bölgesine (ceplere) bağlanma enerjileri tespit edildi ve bu bağlanma enerjilerinin inhibisyon çalışmaları ile uyumluluğu belirlendi. Çalışmada kullanılan organik moleküllerin (Tablo 5) optimizasyon çalışmaları Spartan 16 programı ile yapıldı. Optimizasyon yöntemi olarak konforamasyonel dağılım ile moleküller mekanikler/MMFF, denge geometrisi ile yarı ampirik/PM6 ve yoğunluk

fonksiyonları/M06-2X/6-31G\*\* kullanıldı. Bileşiklerin doking çalışmasında hedef reseptör olarak seçilen sığır eritrosit karbonik anhidraz II'nin kristal formu, Protein Veri Bankası (Protein Data Bank , [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) web sitesinden PDB formatında (1V9E) elde edildi ve kristal formu literatürden bulundu (Satto vd., 2004) Enzim, Autodock Tools-1.5.6 ile saflaştırıldı ve daha sonra organik bileşiklerin enzim aktif bölgesindeki ligand-protein etkileşimleri, Autodock Vina 1.1.2 kullanılarak incelendi. Organik moleküllerin bağlanma enerjileri hesaplandı ve inhibitör potansiyelleri teorik olarak izlendi. Reseptör ve ligandlar arasındaki etkileşimler Discovery Studio 4.5 Client programı kullanılarak araştırıldı ve izlendi.

#### **2.4.2. ADME Çalışması**

ADME çalışmaları için iki farklı web sitesi ([www.molsoft.com/mprop](http://www.molsoft.com/mprop), [www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)) kullanıldı. ADME çalışmaları için önce siteye girilip uygun işlem adımları seçilerek moleküllerin çizimi yapıldı ve ADME özellikleri hesaplandı. Böylece moleküllerin ilaç benzerlikleri ortaya konuldu. Molinspiration online hesaplama kiti kullanılarak % ABS (yüzde absorpsiyon), TPSA (topolojik polar yüzeyi alanı), n-ROTB (dönen bağların sayısı), MV (moleküler hacim), MW (moleküler ağırlık), miLog (bileşiğin, su ve n-oktanol arasında dağılım katsayısının logaritması), n-ON akseptörü (hidrojen bağı akseptörü sayısı), n-OHND donörleri (hidrojen bağı donörü sayısı) hesaplandı (URL-2). Yüzde absorpsiyon (%ABS),  $\%ABS=109-(0.345 \times TPSA)$  eşitliği kullanılarak hesaplandı (Zhao vd., 2002).

#### **2.5. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler excel programı kullanılarak yapıldı ve sonuçlar standart sapma olarak sunuldu.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sığır Serum Karbonik Anhidrazın (bCA) Optimizasyonu

Çalışmada kullanılan organik moleküllerin ticari olarak satın alınan sığır serum karbonik anhidraz (bCA) aktivitesi üzerine inhibisyon potansiyellerini ortaya koymak amacıyla yapılan inhibisyon çalışmalarına başlamadan önce enzim aktivitesi literatüre uygun olarak belirlendi ve optimize edildi. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 7’de sunulmaktadır. İnhibisyon çalışmalarındaki reaksiyon karışımlarının  $K_m$  değerindeki substrat konsantrasyonunda hazırlanması gerektiğinden (Copeland, 2005) enzim için optimum çalışma şartlarının belirlenmesi yanında  $K_m$  değerinin de belirlenmesi önemlidir. Ancak bCA için Lineweaver-Burk eğrisinden hesaplanan  $K_m$  değeri (2,07 mM) substratın reaksiyon karışımındaki çözünürlüğü nedeniyle sınırlayıcı olduğundan inhibisyon çalışmaları 1,5 mM *p*-nitrofenilasetat (*p*-NPA) varlığında gerçekleştirilmiştir (Göçer, 2014).

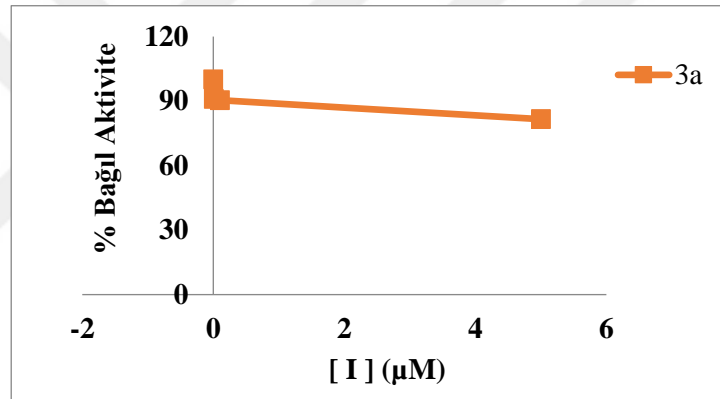
Tablo 7. bCA Aktivitesinin Optimizasyonu

Opt. pH	Opt. sıcaklık	Enzim konsantrasyonu	$K_m$
7,4	25 °C	5 µg/mL	2,07 mM

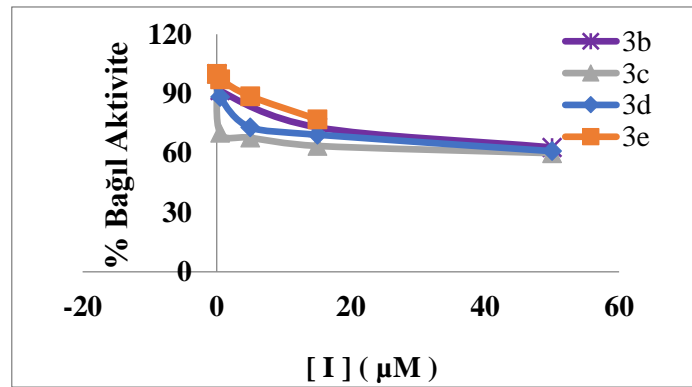
#### 3.2. bCA İnhibisyonu

bCA inhibisyonu çalışmaları için 3a-e, 6 ve 7a-e molekülleri ve referans inhibitör molekül olarak da sülfonilamid kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları için öncelikle organik moleküllerin DMSO-etanol (1:1) karışımı içerisinde çözeltileri hazırlandı. Organik moleküllerin DMSO:etanol karışımındaki çözünürlük farklılıkları ve organik moleküllerin çözeltilerinin oldukça fazla tampon içeren (sulu ortam) reaksiyon ortamına eklenmesi sonucu gözlenen çökme eğilimleri, hangi organik molekülün hangi konsantrasyona kadar çalışmada kullanılabileceğinin belirlenmesinde etkili oldu. Dolayısıyla çalışmada kullanılan organik moleküllerin bu şekildeki gibi farklı davranış profili sergilemeleri bCA için yapılan inhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör organik moleküllerin konsantrasyon aralığının da farklı olmasına neden oldu (Şekil 7-12). Bu gözlemler ışığında ve her bir inhibitör molekülünün farklı konsantrasyonu varlığında ayrı ayrı bCA aktivite tayin deneyleri yapıldı.

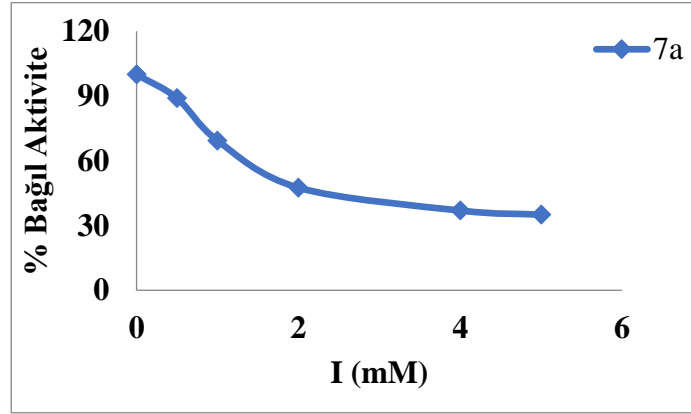
Her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı %Bağıl Aktivite grafiği çizildi ve bağıl aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu  $IC_{50}$  değeri olarak belirlendi (Tablo 8). Dolayısıyla bu çalışmada sentezlenen moleküllerin bCA inhibisyonu potansiyelleri,  $IC_{50}$  değerleri göz önünde bulundurularak değerlendirildi.  $IC_{50}$  değeri en küçük olan molekül bCA inhibisyon potansiyeli açısından en etkili molekül olacağından bu çalışmada ele alınan moleküller arasında bCA inhibitör potansiyeli en yüksek olan molekülün 7c (60,8  $\mu$ M) olduğu belirlendi. Ayrıca, çalışılan tüm organik moleküllerin reaksiyon karışımlarında ulaşılabilen en yüksek konsantrasyonlarında %18-67 aralığında bCA'ı inhibe ettiği gözlenmiştir (Tablo 8). Çalışmada referans inhibitör molekül olarak sülfonilamid kullanılmış ve  $IC_{50}$  değeri 3  $\mu$ M olarak belirlenmiştir.



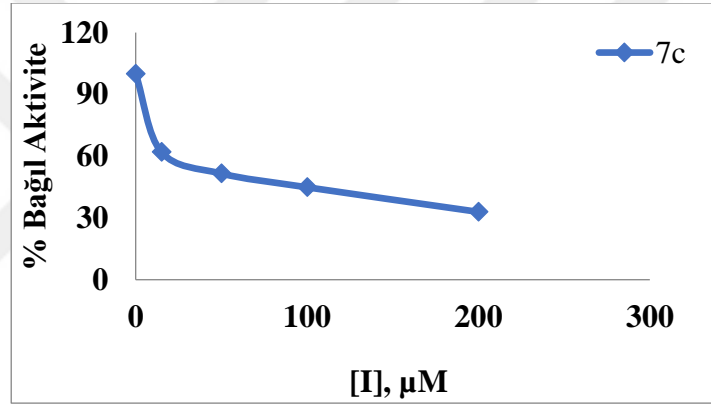
Şekil 11. 3a molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi



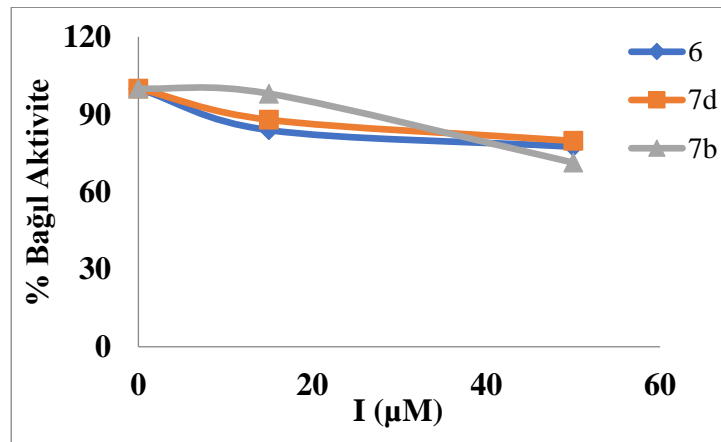
Şekil 12. 3b-3e moleküllerinin bCA aktivitesi üzerine etkisi



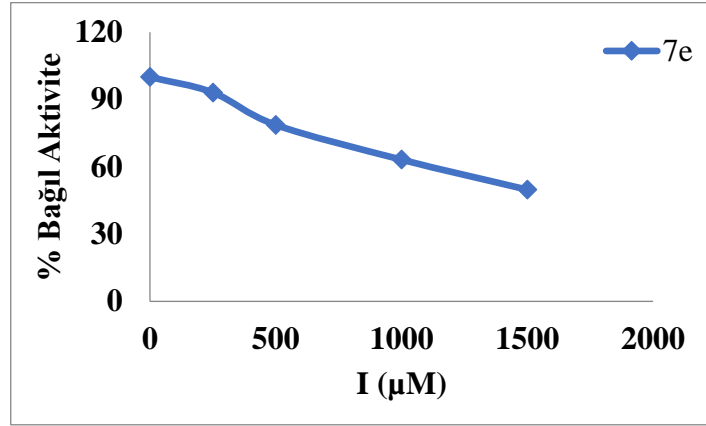
Şekil 13. 7a molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 14. 7c molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 15. 6, 7b ve 7d moleküllerinin bCA aktivitesi üzerine etkisi

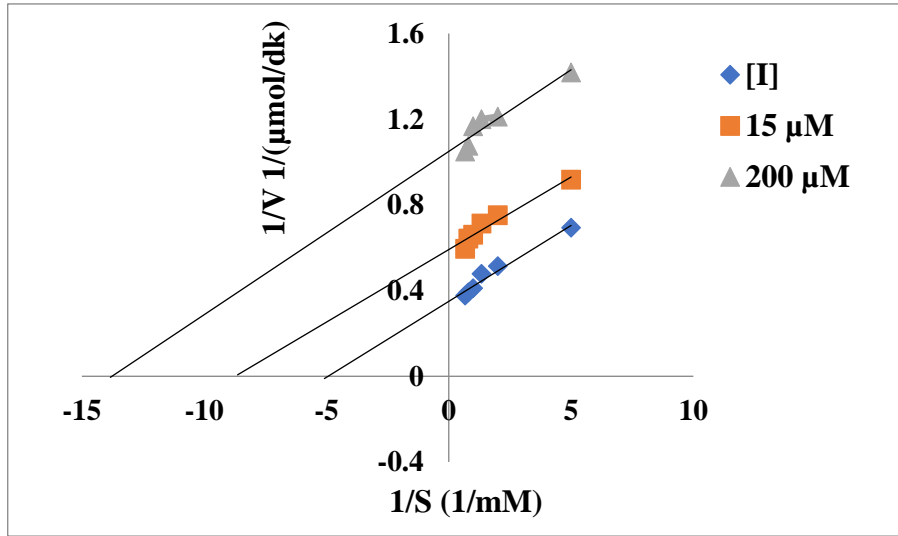


Şekil 16. 7e molekülünün bCA aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 8. İnhibitör Moleküllerinin bCA Aktivitesi Üzerine Etkisi

İnhibitör Bileşikler	Maksimum [I] µM	İnhibisyon %	IC <sub>50</sub> , µM
3a	5	18,41±0,01	≥5
3b	50	37,16±0,8	≥50
3c	50	41,09±1,02	≥50
3d	50	39,05±0,58	≥50
3e	15	22,97±0,20	≥15
6	50	22,53±0,19	≥50
7a	5000	64,97±0,05	2050
7b	100	28,66±0,11	≥100
7c	200	67,07 ±0,69	60,8
7d	50	20,26±0,74	≥50
7e	1500	49,80±0,07	≥1500
Sulfonilamid	10	93 ±0,24	3

Daha sonra  $IC_{50}$  değeri en küçük olan (çalışılan inhibitör aday moleküller arasında bCA inhibisyonu açısından en etkili olduğu belirlenen molekül) 7c molekülü için inhibisyon mekanizması ve  $K_i$  değeri belirlendi. Bunun için gereken çalışma 2.3.2.de anlatıldığı şekilde yapıldı. Buna göre 7c molekülü varlığında bCA inhibisyon türü yarı yarışmalı ve bu moleküle ait  $K_i$  değeri ise  $60.67 \pm 0.54$  mM olarak belirlendi.



Şekil 17. 7c bileşiği varlığında bCA inhibisyon türünün belirlenmesi

Tablo 9. 7c molekülü varlığında bCA inhibisyon türünün belirlenmesi ve  $K_i$  değeri

[I], ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{\text{maks}}$ ( $\mu\text{mol/dk}$ )	İnhibisyon Türü	Ortalama $K_i$ (mM)
0	0.20	2.86		
15	0.11	1.60	Yarı Yarışmalı	$60.67 \pm 0.54$
200	0.07	0.95		

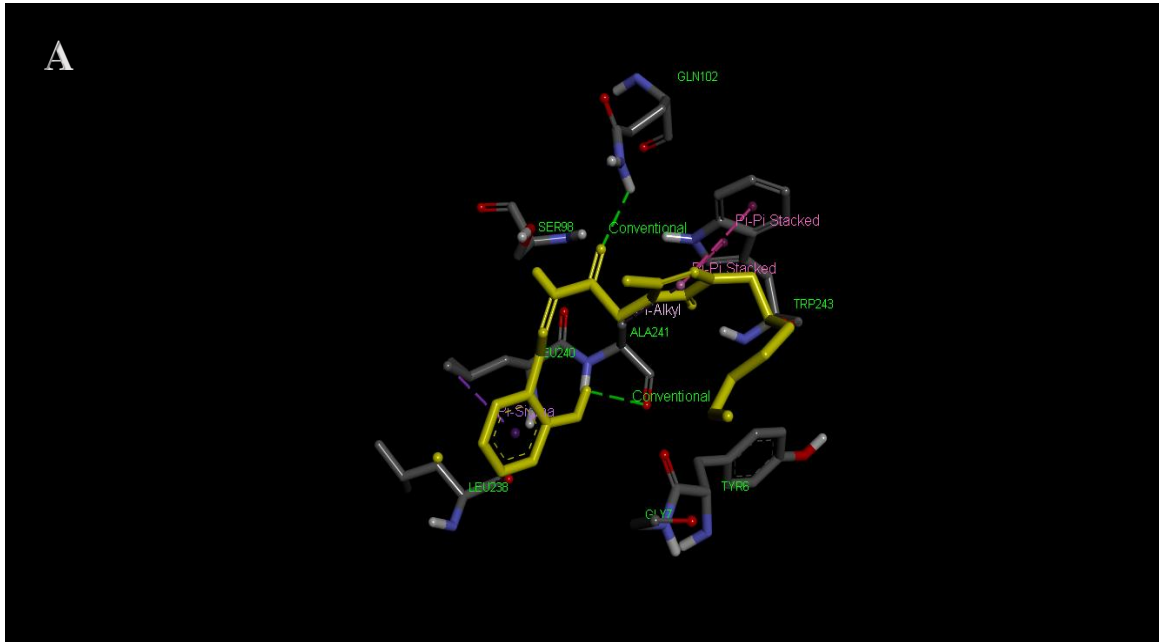
### 3.3. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Moleküler modelleme çalışmaları 2.4.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Buradan elde edilen teorik sonuçlara göre, bağlanma enerjisi en düşük olan 7d molekülünün enzimin aktif bölgesine daha güçlü bir afiniteyle bağlandığı söylenebilir (Tablo 11). Ancak yapılan *in vitro* inhibisyon denemelerinde ise bu molekülün çözünürlük problemlerinden dolayı  $IC_{50}$  değerinin belirlenemediği ve ayrıca bCA ile aktif bölge dışında (yarı yarışmalı bir mekanizmayla inhibe ettiği belirlendiği için) etkileşim yaparak diğerlerine göre daha güçlü bir inhibisyona sebep olan (en düşük  $IC_{50}$  değeri) molekülün 7c olduğu tespit edildi (Tablo 8). Keza teorik sonuçlar aynı zamanda 7c molekülünün çalışılan 11 molekül içerisinde enzime bağlanma ilgisinin (-6,5) en iyi dört molekülden biri olduğunu göstermektedir. 7c molekülünün bCA'nın bağlanma bölgesindeki aminoasitlerle etkileşimi ve bu esnada yaptığı

zayıf etkileşimler Şekil 14’de görülmektedir. Burada Gln102, Leu240, Ala241 ve Trp243 birimlerinin önemli rol oynadığı ve bu aminoasitlerin molekülün farklı atom ya da gruplarıyla pi-alkil, pi-pi, hidrojen bağları ve pi-sigma etkileşimleri yaptığı gözlenmiştir.

Tablo 10. İnhibitör Moleküllerin bCA’ya *in silico* Bağlanma Afiniteleri

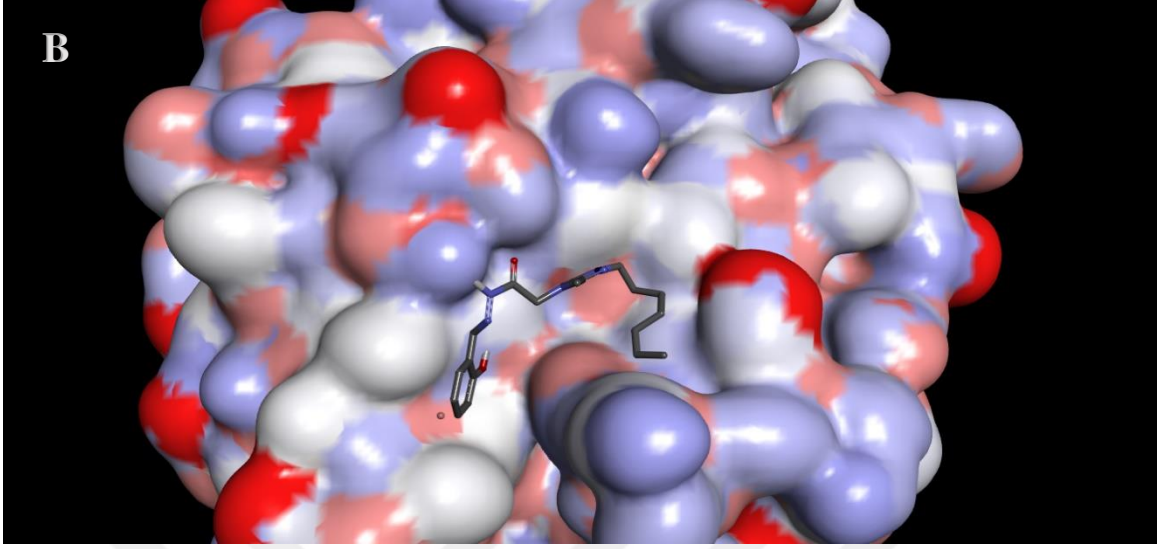
İnhibitör Molekül	$\Delta G$ (kcal/mol)
3a	-5.6
3b	-6.1
3c	-6.6
3d	-6.9
3e	-6.2
6	-6.1
7a	-6.5
7b	-6.2
7c	-6.5
7d	-7.0
7e	-6.3



Şekil 18. 7c molekülünün sığır eritrosit bCA’nın bağlanma cebindeki yaklaşık konformasyonu A) bileşik atomlarının amino asit birimleri ile çeşitli etkileşimlerini gösteren mikro ortam B) genel görünüm



Şekil 18'in devamı



### 3.4. ADME Çalışmaları

Moleküllerin ADME özelliklerini belirleme çalışmaları 2.4.2.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Özellikleri incelenen bütün moleküllerin TPSA, MW, milog P, n-ON akseptör ve n-OHNH donör özellikleri açısından ilaç aday molekül olarak oldukça potansiyel oldukları görülmektedir. BCA inhibitörü olarak ele alınan tüm bileşiklerin %58,17-84,02 arasında değişen iyi bir % absorpsiyon (% ABS) özelliğine sahip olduğu gözlenirken bu çalışmada sahip olduğu potansiyel nedeniyle yoğunlaşılacak 7c molekülünün de %73,98 ile oldukça iyi absorpsiyon gösterdiği belirlendi (Tablo 10). Ayrıca belirtmelidir ki ADME çalışması sonuçları, 7c molekülünün bCA'nın inhibisyonuyla sağlanacak birtakım hastalıkların tedavisinde iyi bir ilaç aday molekülü olabilme potansiyelini güçlendirmektedir.

Tablo 11. Sentezlenen organik bileşiklerin farmakokinetik özellikleri

Entry	% ABS	TPSA (Å <sup>2</sup> )	n-ROTB	MV	MW	miLog P	n-ON acceptors	n-OHNH donors	Nviolations
<b>Rule</b>	–	–	–	–	≤500	≤5	< 10	< 5	≤1
<b>3a</b>	84.02	72.42	6	272.62	288.35	2.58	6	1	0
<b>3b</b>	84.02	72.42	6	286.16	322.80	3.23	6	1	0
<b>3c</b>	84.02	72.42	6	290.51	367.25	3.36	6	1	0
<b>3d</b>	68.20	118.25	7	295.95	333.35	2.51	9	1	0
<b>3e</b>	80.83	81.66	7	298.17	318.38	2.61	7	1	0
<b>6</b>	76.24	94.95	6	229.41	241.29	-1.14	7	3	0
<b>7a</b>	73.98	101.52	10	354.41	373.46	3.23	8	2	0
<b>7b</b>	73.98	101.52	10	367.95	407.90	3.88	8	2	0
<b>7c</b>	73.98	101.52	8	338.69	424.30	3.00	8	2	0
<b>7d</b>	58.17	147.34	9	344.14	390.40	2.15	11	2	1
<b>7e</b>	77.70	110.75	9	346.35	375.43	2.25	9	2	0
<b>Sulfani lamide</b>	79.26	86.19	1	138.05	172.21	-0.29	4	4	0

%ABS: Yüzde absorpsiyon, TPSA: Topolojik polar yüzeyi alanı, n-ROTB: dönen bağların sayısı, MV: Moleküller hacim, MW: Moleküller ağırlık, miLog: Bileşimin, su ve n-oktanol arasında dağılım katsayısının logaritması, n-ON: Hidrojen bağı akseptörü sayısı, n-OHNH: hidrojen bağı donörü sayısı

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Enzimler, ilaç molekülleri ile etkileşen hedef moleküllerinin en popüler olanıdır. Bu durum, hastalık sürecinde enzimlerin yüksek aktivitelerinin görülmesi ve küçük molekül ağırlıklı ilaç molekülleri tarafından inhibisyona uğramasından kaynaklanmaktadır.

Günümüzde biyolojik olarak etki gösteren ilaçların takriben yarısının enzim inhibitörü olduğu bilinmektedir. Enzim inhibisyon stratejisi farmakolojik araştırma alanında son yıllarda ana odak noktası olmakla beraber hayati bir önem arz etmektedir. (Copeland, 2005).

Yeni ilaç keşfi, medisinal kimya, farmasötik kimya, organik kimya ve biyokimya alanlarının ortak çalışmalarıyla mümkün olmaktadır. Bu bağlamda ilaç molekülünün belirlenmesi, organik bileşiğin (küçük molekül kütleli) sentezi ve bu moleküllerin ilaç etkinliklerinin araştırmasını zorunlu kılmaktadır. Akademik çalışmalar yapılan laboratuvarlarda ve ilaç şirketlerinin Ar-Ge laboratuvarlarında geniş çaplı bileşik kütüphanesi oluşturulmakla beraber bu moleküller için *in vitro* biyokimyasal kinetik çalışmalar yapılarak enzim-inhibitör etkileşimleri incelenmektedir (Copeland 2005).

Biyolojik olarak etki gösteren ilaçların birçoğunun yapısında oksadiazol, triazol ve tiyadiazol gibi beş üyeli heterosiklik halka bulunmaktadır. Bu halkalar heteroatomlarının konumlarına göre çeşitli izomerlere sahiptirler. Bu izomerler arasında biyolojik olarak en efektif olanları 1,3,4-tiyadiazol, 1,3,4-oksadiazol ve 1,2,4-triazol türevleridir. Beş üyeli heterosiklik halka bulunduran bileşikler, özellikle antikanser başta olmakla birlikte antifungal, anti-HIV, antibakteriyal, antiinflamatuvar, diüretik, antidepresan, analjezik ve antitüberküloz gibi geniş biyolojik aktivite yelpazesine sahiptirler (Modzelewska ve Kalabun., 1999; Kauffman ve Carver., 1997; Küçükgüzel vd., 2004; Bekircan ve Gümrükcüoğlu., 2005; Crance vd., 2003; Gülerman vd., 1997; Akin vd., 2019; Todoulou vd., 1994). Azol halkaları içerisinde 1,2,4-triazol halkasının, değişik biyoaktivitelere sahip olduğu, endüstriyel ve klinik önem arz eden bazı enzimlerin inhibisyonuna sebep olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Al Masoudi vd., 2006; Siddiqua vd., 2011; Bele ve Singhui 2011). 1,2,4-triazol halkalarının Schiff ve Mannich bazı türevlerinin kolay bir şekilde sentezlenebilmeleri ve farklı uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olabilmeleri bu beş üyeli heterosiklik yapıların son yıllarda kimya ve biyoloji alanında popüler olmasına neden olmuştur (Haijan vd.,1998; Karthikeyan vd.,2006). Bu sebeple, yapmış olduğumuz çalışmada Akın vd. (2019) tarafından yeni sentezlenen 1,2,4-triazol bileşik türevleri sığır serum karbonik anhidraz (bCA) inhibisyon potansiyelleri açısından

incelenmiştir. Ayrıca en etkili bulunan molekül varlığında inhibisyon türü ve  $K_i$  değeri deneysel olarak belirlenmiş, ADME ve moleküler docking çalışmalarıyla da triazol bileşiklerinin ilaç olabilme ve inhibisyon potansiyelleri teorik olarak irdelenmiştir.

Ticari olarak satın alınan bCA enziminin aktivitesi literatüre uygun olarak belirlendi. bCA aktivitesinin optimizasyonu çalışmalarında, optimum pH (7,4), optimum sıcaklık (25 °C) ve inhibisyon çalışmalarında reaksiyon karışımına ilave edilmesi gereken nihai enzim (5 µg/mL) ve substrat miktarları (nihai 1,5 mM) belirlendi. Her bir moleküle ait  $IC_{50}$  değerini belirlemek için inhibitör konsantrasyonları-%bağıl aktiviteye karşı grafiğe geçirildi.  $IC_{50}$  değeri belirlenebilen ve/veya değeri en küçük olan inhibitör molekülü (çalışılan inhibitör aday moleküller arasında bCA inhibisyonu açısından en etkili olduğu belirlenen molekül) varlığında inhibisyon türü ve  $K_i$  değeri hesaplandı.

Yeni sentezlenmiş olan triazol bileşiklerinin organik çözücüdeki çözünürlükleri, çözücünün inhibisyona sebep olma potansiyeli ve büyük oranda tampon içeren (sulu ortam) reaksiyon karışımında organik moleküllerin çökme eğilimleri çalışılan moleküllerin hangi konsantrasyon aralığında çalışmalarda kullanılabileceğinin belirlenmesinde etken olmuştur. Tüm bu kıstaslar göz önünde bulundurularak başlanılan inhibisyon çalışmalarında moleküller DMSO-etanol karışımı içerisinde hazırlandı. Organik çözücünün reaksiyon karışımındaki son konsantrasyonu %1'i aşmayacak şekilde ayarlandı (Copeland 2005). Bu nedenle inhibisyon çalışmalarındaki kontrol karışımlarında çözücünün inhibisyon etkisi de dikkate alınarak reaksiyon ve kontrol karışımları hazırlandı. Organik moleküllerin belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri reaksiyon ortamına dahil olduğunda çökmeler olduğu gözlenmiştir. Kullanılan organik moleküllerin her birinin davranışında farklılık olmasından dolayı CA için yapılan inhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör bileşiklerinin konsantrasyon aralığı da farklı olmuştur (Şekil 7-12).

Bu veriler ışığında bCA inhisyon çalışmaları Tablo 2'de verilen 3a-e, 6, 7a-7e molekülleri ve *p*-NPA (nihai konsantrasyonu 1,5 mM) substratı varlığında yapılmıştır. İnhibitör çözeltisi reaksiyon karışımlarındaki nihai konsantrasyonları olacak şekilde; 3b, 3c, 3d, 6 ve 7d için 0-50 µM, 3a için 0-5 µM, 3e için 0-15 µM, 7a için 0-5000 µM, 7b için 0-100 µM, 7c için 0-200 µM ve 7e için 0-1500 µM olacak şekilde reaksiyon karışımlarına ilave edildi. Bu çalışmada ele alınan moleküller arasında bCA inhibitör potansiyeli en yüksek olan molekülün 7c (60,8 µM olarak  $IC_{50}$  değeri en küçük olan molekül) olduğu belirlendi. Ayrıca, çalışılan tüm organik moleküllerin, reaksiyon karışımlarında ulaşılabilen en yüksek konsantrasyonlarında, %18-67 aralığında bCA aktivitesini inhibe ettiği

gözlendi (Tablo 8). Çalışmada referans inhibitör molekül olarak sülfonilamid kullanılmış ve  $IC_{50}$  değeri 3  $\mu$ M olarak belirlenmiştir.

Saad vd. (2015) 2-substitüe kinazolin-4-(3H)- bileşiklerinin bazı türevlerini sentezledi ve bu bileşiklerin CA II inhibisyon potansiyellerini inceledi. Yapılan bu çalışmada inhibisyon potansiyeli açısından en etkili bulunanlar Bileşik 1, 21 ve 22 olup,  $IC_{50}$  değerleri sırasıyla 108,30 $\pm$ 0,93  $\mu$ M, 191,93 $\pm$ 2,72  $\mu$ M ve 61,33 $\pm$ 2,38  $\mu$ M olarak bildirildi. Başka bir çalışmada Khan vd. (2011) bir dizi Schiff bazı tiyazol bileşiği sentezledi ve CA inhibisyon potansiyellerini inceledi. Bu moleküller için  $IC_{50}$  değerleri 69,49 $\pm$ 4,07  $\mu$ M ile 435,46 $\pm$ 9,9  $\mu$ M arasında değişmektedir. Al-Rashida vd. (2014) ise çalışmalarında bazı sülfü ilaçlarının 2,4-dikloro-1,3,5-triazin türevlerinin sentezlenmesinden sonra, sıgır sitozolik karbonik anhidraz izozimi II kullanarak CA inhibisyonu belirlemiştir. Bu moleküller için  $IC_{50}$  değerleri 1,49 $\pm$ 0,006  $\mu$ M ile 105,3 $\pm$ 0,16  $\mu$ M arasındadır. Bir diğer çalışmada Celik vd. (2014) 1,4 dihidropirimidinon süstitüe diaril üre ve tiyoüre türevlerini, insan karbonik anhidraz II (hCAII)'nin aktivitesine karşı değerlendirdiler. hCA II aktivitesi tüm bileşikler tarafından inhibe edildi. Bileşiklerin  $IC_{50}$  değerleri 63,09-169,71  $\mu$ M arasında değiştiği gözlemlendi. İncelenen bileşikler arasında en iyi hCA II inhibitörü 4 (triflouro süstitüe) fenil türevidir. Elde edilen sonuçlar ve yapılan literatür araştırması neticesinde bu çalışmada CA inhibisyonu açısından oldukça etkili bulunan 7c molekülünün ilaç aday molekül olarak daha ileri araştırmalara tabii tutulması gerektiği speküle edilebilir.

7c molekülü için bCA inhibisyon türünü ve  $K_i$  değerini (60.67  $\pm$  0.54 mM) belirlemek amacıyla substrat (*p*-NPA) konsantrasyonu aralığında (0,2-5  $K_m$ ), inhibitörün yokluğunda (7c) ve 15 ile 200  $\mu$ M konsantrasyonlarında (%25-70 inhibisyona sebep olan iki farklı inhibitör konsantrasyonu varlığında) bir seri aktivite tayinleri yapıldı ve 1/[S]-1/V grafikleri çizildi. İnhibitör yokluğunda  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri 0,201 mM ve 2,86  $\mu$ mol/dak olarak tayin edildi. 7c'nin 15  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M konsantrasyonlarında ise  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri sırasıyla 0,11 mM ve 1,60  $\mu$ mol/dak, 0,07 mM ve 0,95  $\mu$ mol/dak olarak belirlendi (Tablo 9). Bu veriler ışığında hem  $K_m$  hem de  $V_{maks}$  değerinin azaldığı belirlenmiş olup, 7c molekülünün unkompetitif (yarı yarışmalı) bir şekilde CA'yı inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu sonuca göre 7c molekülünün aktif bölge dışında bir bağlanma bölgesinde enzimle etkileşim yaparak inhibisyona neden olduğu ve  $K_i$  değerinin ise 60,67  $\pm$  0,54 mM olarak tespit edilmiştir. Carta vd. (2016) suda çözünürlüğü artırılmış yeni floresan sülfonamid moleküllerinin karbonik anhidraz üzerine inhibisyonunu incelemişlerdir. Yeni türevlerin hCA II'ye karşı etkili inhibitörler olduğu ve bu moleküllere ait  $K_i$  değerlerinin 366-127 nM aralığında olduğu

belirtilmiştir. Almajan vd.(2008) tarafından yeni sentezlenen bazı merkaptto-1,3,4 oksadiazol ve merkaptto-1,2,4 triazol türevleri, CA II inhibitörü olarak incelenmiştir. Bileşikler iyi inhibitör özelliği göstermiştir ve  $K_i$  değerlerinin 0,63-31  $\mu$ M aralığında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Fidan vd. (1966) tarafından bazı yeni glisin ve fenilalanin sulfonamid türevleri, insan sitozolik CA I ve II'ye karşı CA inhibitörleri olarak incelenmiştir. G 1-4 ve P1-4 molekülleri iyi inhibisyon etkisi göstermiştir.  $K_i$  değerleri, hCA I için 14,66–155  $\mu$ M ve hCA II için sırasıyla 18,31–143,8  $\mu$ M'dir. Bir başka çalışmada Huyut (2014) bazı flavonoid ve fenolik bileşiklerin karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine *in vitro* kinetik incelemeler yapmıştır. Bileşikler arasından Araşidonoil Dopamin, Callistephin, 2,4,6-Trihidroksibenzaldehit, 3,4-Dihidroksi-5-metoksibenzoik asit için  $K_i$  değerleri sırasıyla 75,25  $\mu$ M, 352,40  $\mu$ M, 0,354 mM, 1,51 mM ve inhibisyon türleri unkompetetif (yarı yarışmalı), nonkompetetif (yarışmasız), nonkompetetif ve yine nonkompetetif olarak belirlenmiştir.

CA enzimi için yapılan moleküler docking çalışmalarında inhibitör moleküllerin her biri için enzimin aktif bölgesine bağlanma enerjileri hesaplandı. Prensibe göre en düşük bağlanma enerjisine sahip olan molekülün enzimle en iyi etkileşim yapan ve inhibisyona sebebiyet veren en potansiyel bileşik olarak ifade edilmektedir. Elde edilen verilerden de anlaşılacağı üzere hem deneysel olarak hem de teorik olarak yapılan çalışmalar büyük oranda örtüşmektedir. Deneysel olarak yapılan çalışmada elde edilen verilere göre inhibisyon türü unkompetetif (yarı yarışmalı) olarak belirlenmiştir ve teorik sonuçlar aynı zamanda 7c molekülünün çalışılan 11 molekül içerisinde enzime bağlanma ilgisinin (-6,5 kcal) en iyi dört molekülden biri olduğunu göstermektedir.

Her bir molekül için ayrı ayrı yapılan ADME çalışmalarında incelenen moleküllerin birer ilaç adayı olup olamayacakları incelenmiştir (Tablo 11). Çalışılan bütün organik moleküllerin ilaç olma potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hem teorik hem de deneysel olarak yapılan tüm çalışmaların sonucundan anlaşılacağı üzere 7c'nin bCA'nın inhibisyonuyla sağlanacak bir takım hastalıkların tedavisinde iyi bir ilaç aday molekülü olabilme potansiyeline mevcuttur.

## 5. ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar neticesinde elde edilen bulgular değerlendirildiğinde aşağıda maddeler halinde sunulan önerilerin ileriki çalışmalar için dikkate değer olduğu söylenebilir.

1. Organik bileşiklerin suda çözünür formları (tuzları) sentezlenerek deneysel olarak molekülün çözünürlüğünden kaynaklanacak problemler giderilebilir.
2. Enzimin aktif bölge ve bağlanma bölgesinin topolojisi ile buradaki kritik aminoasitlerin bilgisi kullanılarak yeni inhibitör molekülleri dizayn edilebilir, sentezlenebilir ve bu moleküllerin bCA inhibisyon potansiyelleri incelenebilir
3. bCA inhibisyonu açısından oldukça etkili bulunan 7c molekülünün ilaç olabilme potansiyelini ortaya koymak adına daha detaylı çalışmalar yapılabilir.



## 6. KAYNAKLAR

- Abbate, F., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Orioli, P., Stubbs, M.T. ve Klebe, G., 2002. Nonaromatic sulfonamide group as an ideal anchor for potent human carbonic anhydrase inhibitors: role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design, Journal Medicine Chemistry, 45, 3583–3587.
- Aditama R., Mujahidin D., Syah M.Y. ve Hertadi R., 2015. Docking and Molecular Dynamics Simulation of Carbonic Anhydrase II inhibitors from phenolic and flavonoid group, International Symposium on Applied Chemistry, 16, 357-364.
- Akdemir A, Güzel-Akdemir O, Scozzafava A, Capasso C. ve Supuran CT., 2013. Inhibition of tumor-associated human carbonic anhydrase isozymes IX and XII by a new class of substituted-phenylacetamido aromatic sulfonamides, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 21, 17, 5228-32.
- Akin S., Ayaloglu H., Gultekin E., Colak A, Bekircan O. ve Akatin Y.M., 2019. Synthesis of 1,2,4 triazole-5-on derivatives and determination of carbonic anhydrase II isoenzyme inhibition effects. Bioorganic Chemistry, 83, 170-179.
- Alafeefy AM., Ceruso M., Al-Jaber NA., Parkkila S., Vermelho AB. ve Supuran CT., 2014. A new class of quinazoline-sulfonamides acting as efficient inhibitors against the  $\alpha$ -carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*, Journal Enzyme Inhibition Medicine Chemistry, 581-585.
- Al-Majidi, S. M. ve Saeed, Z. S., 2013. Synthesis ve Characterization of Some New 1,2,3-Triazole, Amic Acids, Imides, and Isoimides from Ethyl-p-aminobenzoate and Study Their Biological Activity, Al-Nahrain Journal of Science, 16, 2, 59-69.
- Al-Masoudi I. A., Al-Soud Y. A, Al-Salihi N. J. ve Al-Masoudi N. A., 2006. 1,2,4-Triazoles: Synthetic approaches and pharmacological importance, Chemistry of Heterocyclic Compounds, 42, 11, 37.
- Al-Rashida M., Hussai, M. Hamayoun, A. Altaf ve J. Iqbal, 2014. Sulfa Drugs as Inhibitors of Carbonic Anhydrase: New Targets for the Old Durgs, BioMed Research International, 9-10.
- Alterio, V., Di Fiore, A. ve D'Ambrosio, K., 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms, Chemical Reviews, 112, 4421-4468.
- Amtul Z, Siddiqui RA ve Choudhury MI., 2002. Chemistry and mechanism of urease inhibition, Current Medicinal Chemistry, 9, 1323-48.
- Andersson, B., Nyman, P., ve Strid, L., 1972. Amino Acid Sequence of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase B, Biochem Biophys Res Commun, 48, 670.



- Armstrong, J. M., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. ve Edsal, J. T., 1966. "Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, Journal of Biological Chemistry, 214, 5137-5149.
- Appleton, D., ve Sarkar, B., 1974. The Activity-Related Ionization in Carbonic Anhydrase, Proceedings of the National Academy of Sciences, 71, 1686.
- Atasagungil, M., 1965. Enzimler, Güzel İstanbul Matbaası, 3s.
- Azizi N. ve Alipour M. 2015. Eco-efficiency and scalable synthesis of bisamides in deep eutectic solvent, Journal of Molecular Liquids, 206, 268-271.
- Badger, M. R. ve Price, G. D., 1994. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 45, 369-392.
- Balboni G, Congiu C, Onnis V, Maresca A, Scozzafava A, Winum J, Maietti A. ve Supuran C.T., 2012. Flavones and structurally related 4-chromenones inhibit carbonic anhydrases by a different mechanism of action compared to coumarins, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 3063-3066.
- Balseven H., İşgör M.M., Mert S., Alım Z., Beydemir Ş., Ok S.ve Kasımoğulları R., 2013. Facile synthesis and characterization of novel pyrazole-sulfonamides and their inhibition effects on human carbonic anhydrase isoenzymes, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 21, 21-27.
- Barredo J.L., Methods in Biotechnology and Microbial enzymes and biotransformations. 1-27. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005.
- Benjamin, S. ve Pandey, A., 2000. Panorama of lipases in bioindustry, Biotechnology International Journal, 5, 11-13.
- Bekircan, O. ve Gümrükçüoğlu, N., 2005. Synthesis of some 3,5-diphenyl-4H-1,2,4triazole derivatives as antitumor agents, Indian Journal of Chemistry, 44, 2107-2113.
- Bele, D. ve Singhvi, İ., 2011. A review on 1,2,4-triazole, Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research, 1, 88-100.
- Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P. ve Scozzafava, A., 1997. Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations Form the Interaction of Isozymes I and II with Histamine, Biochemistry, 36, 10384-10392.
- Brinkman, R., Margaria, R., Meldrum, N. U. ve Roughton, F. J. W., 1932. The CO<sub>2</sub> catalyst present in blood, The Journal of Physiology, 75, 3-4.
- Čapkauskaitė e., Baranauskienė L., Golovenko D., Manakova E., Grazulis S. ve Matulis D. 2010. Indapamide-like benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, and XIII, Bioorganic Medicine Chemistry, 1, 18, 21, 7357-64.

- Carta, F., Temperini, C. ve Innocenti, A., 2010. Polyamines Inhibit Carbonic Anhydrases by Anchoring to the Zinc-Coordinated Water Molecule, Journal of Medicinal Chemistry, 53,5511- 22.
- Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A. ve Supuran, C.T., 2012. Novel coumarins and 2-thioxo-coumarins as inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 20, 2266-2273.
- Chandak N, Ceruso M, Supuran CT. ve Sharma P.K., 2016. Novel sulfonamide bearing coumarin scaffolds as selective inhibitors of tumor associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII, Bioorganic Medicinal Chemistry, 2882-2886.
- Chauhan, PS., Puri, N. ve Sharma, P., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications, Applied Microbiology Biotechnology,93, 1817-1830.
- Colak, A., Ozen, A., Dincer, B. ve Ayaz, F.A., 2005. Diphenolase from two cultivars of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) fruits at early stage of maturation, Food Chemistry, 90, 801- 807.
- Copeland, R. A., Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, A John Wiley & Sons, Inc. Publication. New Jersey 2005
- Copeland, R. A., Enzymes: a practical Introduction to structure, mechanism, and data analysis (Second Edition), A John Wiley & Sons, Inc. Publication New York, 2000.
- Crance, J.M., Scaramozzino, N., Jouan, A. ve Garin, D., 2003. Interferon, ribavirin, 6azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses, Antiviral Research, 58, 73-79.
- Çoban, T.A., Beydemir, Gülçin, Ğ., Ekinci, D., Innocenti, A., Vullo, D. ve T. Supuran, C., 2009. Sildenafil is a strong activator of mammalian carbonic anhydrase isoforms I-XIV, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, 5791-5795.
- David T.I., Adelakun NS. ve Omotuyi O.I., 2018. Molecular docking analysis of phyto-constituents from *Cannabis sativa* with pFDHFR, Bio information, 574–579.
- Dincer, B., Colak, A., Aydın, N., Kadioglu, A. ve Güner, S., 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L. Rosacea), Food Chemistry, 77, 1-7.
- Dongare B.S., Chavan H.V., Balina P.S, Katır Y.B, Kotmale A.S. ve Bandgar B.P., 2016. A catalyst- and solvent-free multicomponent synthesis of 7-azagrame analogues via a Mannich type reaction, Chinese Chemical Letters, 99-103.
- Edita Č., Zubrienė A., Paketurytė V., Timm T.D, Tumkevičius S. ve Matulis D., 2018. Thiazole-substituted benzenesulfonamides as inhibitors of 12 human carbonic anhydrases, Bioorganic Chemistry, 534-541.

- Edsall, J., Henkate, P. ve Guidotti, G., 1968. Catalysis of the Hydrolysis of 1-Fluoro-2,4 Dinitrobenzene by Carbonic Anhydrase, Journal of Biological Chemistry, 243-244.
- Fidan İ., R.E. Salmas, M. Arslan, M. Şenturk, S. Durdagi, D. Ekinci, E. Şenturk, S. Coşgun ve C.T. Supuran, 2015. Carbonic anhydrase inhibitors: Design, synthesis, kinetic, docking and molecular dynamics analysis of novel glycine and phenylalanine sulfonamide derivatives, Bioorganic Medicinal Chemistry, 23 .7353–7358.
- Fiore, D.A., Truppo, E., T. Supuran, C., Alterio, V., Dathan, N., Bootorabi, F., Monti, S.M. ve Simone, G.D., 2010. Crystal structure of the C183S/C217S mutant of human CA VII in complex with acetazolamide, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 20, 5023-5026.
- Gambhir SS. ve de la Zerda A., 2007. Drug delivery: keeping tabs on nanocarriers. Nature Nanotechnology, 745-6.
- Gohlke H ve Klebe G., (2002). Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors, Angewandte Chemie, 2644–76.
- González J.M. ve Fisher S.Z., 2014. Carbonic Anhydrases in Industrial Applications. In: Frost S., McKenna R. (eds) Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications, Subcellular Biochemistry, 75-76.
- Göçer, H. Sinefrin ve fenilefrin: Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2014.
- Gülberman, N., Rollas, S., Kiraz, M., Ekinci, A.C. ve Vidin, A., 1997. Evaluation of antimycobacterial and anticonvulsant activities of new 1-(4-fluorobenzoyl)-4-substitutedthiosemicarbazide and 5-(4-fluorophenyl)-4-substituted-2,4-dihydro-3H1,2,4-triazole-3- thione derivatives, Farmaco, 691-695.
- Haijian, S., Zhongyi, W. ve Haoxina, S., 1998. Study on the intramolecular Mannichreaction of 4-amino-3-aryl-2,3-dihydrogen-5-mercapto-1,2,4-triazoles, Synthetic Communications, 3973-3982.
- Henderson, L., Henriksson, D., ve Nyman, P. 1973. Amino Acid Sequence of Human Erythrocyte Anhydrase C, Biochemical Biophysical Research Communications, 52, 1388.
- Hewett-Emmett, D. ve Tashian R.E., 1996. Functional Diversity, Conservation and Convergence in the Evolution of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -Carbonic Anhydrase Gene Families, Molecular Phylogenetic and Evolution, 50-77.

- Huyut Z., Bazı Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi ve İnsan Eritrositlerinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz I VE II İzoenzimleri Üzerine *in vitro*, Rat Eritrositleri Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine *in vivo* Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2014.
- Imran S., Taha M., Ismail NH., Fayyaz S., Khan KM. ve Choudhary MI., 2015. Synthesis, biological evaluation, and docking studies of novel thiourea derivatives of bisindolylmethane as carbonic anhydrase II inhibitor, Bioorganic Chemistry, 83-93.
- Innocenti, A., Firnges, M.A., Antel, J., Wurl, M., Scozzafava, A. ve Supuran, C.T., 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the membranebound human and bovine isozymes IV with sulfonamides, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 15, 1149–1154.
- Jamkhandi, C. ve Disouza, J. I., 2013. Evaluation of antioxidant activity for some benzotriazole substituted with N-phenylacetamide and acetylcarbamic acid derivatives, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 249-253.
- Kaufman, C.A. ve Carver, P.L., 1997. Antifunals in the 1990s. Current status and future developments., Drugs, 539-5549.
- Karthikeyan, M.S., Prasad, D.J., Poojary, B., Subrahmanya Bhat, K., Holla, B.S. ve Kumari, N.S., 2006. Synthesis and biological activity of Schiff and Mannich bases bearing 2,4-dichloro-5-fluorophenyl moiety, Bioorganic Medicinal Chemistry, 14, 7482.
- Karioti A., Carta F. ve Supuran CT., 2016. Phenols and Polyphenols as Carbonic Anhydrase Inhibitors, Molecules, 21-22.
- Kasımoğulları R, Bülbül M, Arslan BS ve Gökçe B. 2010. Synthesis, characterization and antiglaucoma activity of some novel pyrazole derivatives of 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide, European Journal Medicinal Chemistry, 4769-73.
- Kim, G., Selengut, J. ve Levine, R.L. 2000. Carbonic anhydrase III: the phosphatase activity is extrinsic, Archives Biochemistry Biophysics, 334–340.
- Kharb, R., Sharma, P. C. ve Yar, M. S., 2011, Pharmacological significance of triazolescaffold, Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 1-21.
- Khan K.M., A. Karim, S. Saied, N. Ambreen, M. Saleem, A. Aryn, S. Perveen, A. Ahmad, P. Kosikowska ve L. Berlicki, 2011. Expert Opinion Therapeutic. Patents, 945–957.
- Khloya P., Ceruso M, Ram S, Supuran CT. ve Sharma P.K., 2015. Sulfonamide bearing pyrazolylpyrazolines as potent inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII, Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters, 3208-3222.

- Küçükgülzel, İ., Küçükgülzel, Ş.G., Rollas, S., Ötük-Saniş, G., Özdemir, O., Bayrak, İ., Altuğ, T. ve Stables, J.P., 2004. Synthesis of some 3-(arylalkylthio)-4-alkyl/aryl-5(4-aminophenyl)-4H-1,2,4-triazole derivatives and their anticonvulsant activity II, Farmoca, 893-901.
- Liljas, A. ve Laurberg, M., 2000. A Wheel Invented Three Times. The Molecular Structures of the Three Carbonic Anhydrases, EMBO Reports, 16-17.
- Lima-Neto, R. G., Cavalcante, N. N., Srivastava, R. M., Mendonça Junior, F. J., Wanderley, A. G., Neves, R. P. ve dos Anjos, J. V., 2012, Synthesis of 1,2, 3-triazole derivatives and in vitro antifungal evaluation on Candida strains, Molecules, 5882-5892.
- Lin, K., ve Deutsch, H. 1974. Human Carbonic Anhydrases. XII. The Complete Primary Structure of the C Isozyme, Journal Biological Chemistry, 249, 2329.
- Lin, K., ve Deutsch, H., 1973. Human Carbonic Anhydrases. XI. The Complete Primary Structure of Carbonic Anhydrase B, Journal Biological Chemistry, 248-250.
- Lindahl, M., Vidgren, J., Eriksson, E., Habash, J., Harrop, S., Helliwell, J. ve Liljas, A., 1992. The sensitivity of the synchrotron Laue method to small structural changes: binding studies of human carbonic anhydrase II(HCAII), Acta Crystallographia Section B, 281-285.
- Lindskog, M. ve Walker, N.. In: Botre`, F., Gros, G. ve Storey, B.T., Crystallographic studies of carbonic anhydrase inhibition. In Carbonic Anhydrase From Biochemistry and Genetics to Physiology and Clinical Medicine. Botrè F, Gros G, Storey BT, New York, 1991.
- Lindskog S.ve Malmstrom B.G.,1962. Metal binding and catalytic activity in bovine carbonic anhydrase, Journal of Biological Chemistry, 1129-37.
- Lindskog S., 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase., Pharmacology Therapeutics,1-20.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The determination of enzyme dissociation constant, Journal of American Chemical Society, 658-661.
- Majumder S., Borah P. ve Bhuyan P.J., 2014. An efficient and regioselective one-pot multi-component synthesis of pyrimido[4,5-d]pyrimidine derivatives in water, Tetrahedron Letters, 1168-1170.
- Mann, T. ve Keilin, D., 1940. Sulphanilamide as a Specific Carbonic Anhydrase Inhibitor, Nature, 164-165.
- Maren, T.H., 1995, The development of topical carbonic anhydrase inhibitors, Journal of Glaucoma, 49-62.

- Maresca A. ve Supuran C.T. 2010. Coumarins incorporating hydroxy- and chloro-moieties selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 4511-4514.
- Maresca A., Temperini C., Pochet L., Masereel B., Scozzafava A. ve Supuran C.T. 2015. Correction to Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins, Journal of Medicinal Chemistry, 5689-5814.
- Mathew, L.K., Sengupta, S., Kawakami, A., Andreasen, E.A., Löhr, C.V., Loynes, C.A., Renshaw, S.A., Peterson, R.T., ve Tanguay, R.L., 2007. Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics, The Journal of biological chemistry, 35202-35210.
- Modzelewska, B. ve Kalabun, J., 1999. Synthesis and biological action of 5-oxo-1,2,4-triazine derivatives, Pharmazie, 503-511.
- Naeimi H. ve Shaabani RU., 2017. Itrasound promoted facile one pot synthesis of triazole derivatives catalyzed by functionalized graphene oxide Cu(I) complex under mild conditions, Ultrasonics Sonochemistry, 34, 246-254
- Nakai H., Orita K., Sakagami K., Morisaki F., Takasu S., Miichi N., Morisue M., Saito S. ve Higaki K., 1987. A new secured technique for suprahepatic vena caval anastomosis in porcine liver transplantation, Hiroshima Journal of Medicine Sciences, 383-385.
- Nikpassand M., Fekri L.Z. ve Farokhian P., 2016. An efficient and green synthesis of novel benzoxazole under ultrasound irradiation, Ultrasonics Sonochemistry, 341-345.
- Ozimiński, W. P., Dobrowolski, J. C. ve Mazurek, A. P., 2003. DFT studies on tautomerism of C5-substituted 1, 2, 3-triazoles, Journal of molecular structure, 697-704.
- Ranu C.B., Hajra A. ve Jana U., 2000. Microwave-assisted simple synthesis of quinolines from anilines and alkyl vinyl ketones on the surface of silica gel in the presence of indium(III) chloride, Tetrahedron Letters, 531-533.
- Saad S.M., M. Saleem, S. Perveen, M.T. Alam, K.M. Khan ve M.I. Choudhary, 2015. Synthesis and biological potential assessment of 2-substituted quinazolin-4(3H)-ones as inhibitors of phosphodiesterase-I and carbonic anhydrase-II, Medicine Chemistry, 11 336-341.
- Saravanamuthu A., Vickers TJ., Bond CS., Peterson MR., Hunter WN. ve Fairlamb AH., 2004. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: a template for drug design, The Journal of biological chemistry, 279-284.

- Satto C., Ledda A., Potapov P., Schryvers D. ve Janssens JF., 2001. Phase transformations and precipitation in amorphous Ti50Ni25Cu25 ribbons. Intermetallics, 9, 5, 395-401.
- Scapin G, 2006. Structural biology and drug discovery. Current Pharmaceutical Design, 2087-97.
- Shaabani A., Sepahvand H. ve Nejad M.K., 2016. A re-engineering approach: synthesis of pyrazolo[1,2-*a*]pyrazoles and pyrano[2,3-*c*]pyrazoles via an isocyanide-based four component reaction under solvent-free conditions. Tetrahedron Letters, 57, 13, 1435-1437.
- Shi G., Shi B., Wang Q. ve Li G., 2015. Syntheses, structures and thermal properties of four manganese coordination polymers from imidazole-based multi-carboxylates, Polyhedron, 137-146.
- Shinar, H., ve Navon, G. 1974 The Formation and Properties of Cobalt (III) Carbonic Anhydrase, Biochim Biophys Acta , 334-471.
- Siddiqui AA, Mishra R, Shaharyar M, Husain A, Rashid M ve Pal P., 2011 Triazole incorporated pyridazinones as a new class of antihypertensive agents: design, synthesis and in vivo screening, Bioorganic Medicine Chemistry, 21,3,1023-26.
- SitaRam, Ceruso M, Khloya P, Supuran CT ve Sharma PK., 2014. 4-Functionalized 1,3-diarylpyrazoles bearing 6-aminosulfonylbenzothiazole moiety as potent inhibitors of carbonic anhydrase isoforms hCA I, II, IX and XII, Bioorganic Medicine Chemistry, 22,24,6945-52.
- Stams, T., Nair, S.K., Okuyama, T., Waheed, A., Sly, W.S. ve Christianson, D.W., 1996. Crystal structure of the secretory form of membrane-associated human carbonic anhydrase IV at 2.8-Å resolution, Proceedings of the National Academy of Sciences, 13589-13594.
- Stevens MJ., Obrosova IG., Van Huysen C., Fathallah L., Cao XC. ve Greene DA., 2002. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense, FASEB Journal, 16,123-125.
- Supuran C. T., 2016. Structure and Function of Carbonic Anhydrases, Biochemical Journal, 473, 2023-2032.
- Supuran C.T., ve Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Supuran C.T., 2002. Investigal Drugs 5, 1075-1079.
- Supuran CT., ve Capasso C. 2015. The η-class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents, Expert Opinion on Therapeutic Targets ,19:551-63

- Supuran C.T., 2017. Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. Expert Opinion Drug Discovery ,12:61–88
- Şentürk, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve T. Supuran, C., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocytes isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, 3207-3211.
- Tala R.S., Schnell S.M. ve Haskell-Luevano C., 2015. Microwave-assisted solid-phase synthesis of side-chain to side-chain lactam-bridge cyclic peptides, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters., 5708-571115.
- Tanc, M., Carta, F., Bozdağ, M., Scozzafava, A. ve Supuran, C.T., 2013. 7-Substituted sulfocoumarins are isoform-selective, potent carbonic anhydrase II inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry ,21, 4502-4510.
- Temperini C, Cecchi A, Scozzafava A ve Supuran C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors. Comparison of chlorthalidone, indapamide, trichloromethiazide, and furosemide X-ray crystal structures in adducts with isozyme II, when several water molecules make the difference, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 3, 1214-21.
- Todolou, O.G., Papadaki-Valiraki, A.E., İkedo, S. ve Clercq, E.D., 1994. Synthesis and antiviral activity of some new 1H-1,2,4-triazole derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 29,611-620.
- URL-1, [http://www.enzymeassociation.org/wpcontent/uploads/2013/09/benefits\\_paper.pdf](http://www.enzymeassociation.org/wpcontent/uploads/2013/09/benefits_paper.pdf). 2013.
- URL-2, <https://www.molinspiration.com/>. 1986
- Van Der Maarel M.J.E.C., Van Der Veen B., Uidehaag J.C.M., Leembius H. ve Dijkhuizen L., 2002. Properties and Applications of Starch Converting Enzymes of the  $\alpha$ -amylase Family, Journal of Biotechnology, 94, 137-155.
- Verpoorte, J.A., Mehta S. ve Edsall J.T, 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Vijesh M.A ., Isloor M.A., Telkar S., T. Arulmoli. ve Fun H-K., 2013. Molecular docking studies of some new imidazole derivatives for antimicrobial properties, Arabian Journal of Chemistry, 6, 2, 197-204.
- Wagner J., Avvaru B.S., Robbins A.H., Scozzafava A, Supuran C.T. ve McKenna R., 2010. Coumarinyl-substituted sulfonamides strongly inhibit several human carbonic anhydrase isoforms: solution and crystallographic investigations, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 4873-4878.
- Whitney, P., 1974. Affinity Chromatography of Carbonic Anhydrase, Anal Biochem 57, 467.



- Wilkinson BL., Bornaghi LF., Houston TA., Innocenti A., Vullo D., Supuran BT. ve Paulsen SA., 2007. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of isozymes I, II, and IX with triazole-linked O-glycosides of benzene sulfonamides. Journal of Medicinal Chemistry, 50, 1651-7.
- Wilkinson BL., Innocenti A., Vullo D., Supuran CT ve Paulsen SA., 2008. Inhibition of carbonic anhydrases with glycosyltriazole benzene sulfonamides, Journal of Medicinal Chemistry, 1945-53.
- Yamuna E, Zeller M, Karnam. ve Prasad R.J., 2011. InCl<sub>3</sub>-catalyzed four-component reaction: a novel synthesis of N-carbazolyl dihydropyridines, Tetrahedron Letters, 6805-6808.
- Zhao Y., Abraham M.H., Lee J., Hersey A., Luscombe N.C., Beck G., Sherborne B. ve Cooper I., 2002. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies, Pharmaceutical Research, 1446–1457.

## ÖZGEÇMİŞ

04.03.1990 yılında Kocaeli'nde doğdu. İlk ve orta öğrenimini 60.Yıl İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Neşet Yalçın (Y.D.L) Lisesi'nde tamamladı. 2009 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2014 yılında bu bölümden kimyager unvanı alarak mezun oldu. 2015 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

