T.C.

ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMASÖTİK BİLİMLER ANABİLİM DALI

İNDOL TÜREVİ SCHİFF BAZI BİLEŞİKLERİNİN İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ VE ASETİLKOLİNESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİ MEKANİZMALARI

Ebru AKMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Esra Dilek

ERZİNCAN

2021

Bu tez Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından TSA-2020-663 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak yazılan bu tezde bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin barındırdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını beyan ederim.

Ebru AKMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL SAYFASI iii
TEZ BEYANI iv
İÇİNDEKİLER v
TEŞEKKÜR vii
KISALTMALAR viii
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÖZET xi
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Enzimler 2
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması 4
2.2. Karbonik Anhidraz 6
2.2.1. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları 8
2.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri 9
2.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Biyolojik Fonksiyonları 12
2.2.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesi 14
2.2.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 14
2.3. Kolinesterazlar 16
2.3.1. Asetilkolinesteraz Enzimi 17
2.3.1.1. Asetilkolinesterazın Yapısı ve Mekanizması 18
2.3.1.2. Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu 19
2.3.1.3. Asetilkolinesteraz Aktivitesi 20
2.3.1.4. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri 21
3. MATERYAL ve METOT 23
3.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar 23
3.2. İnsan Kanından hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Saflaştırılması İle İlgili Çalışmalar 23

3.2.1. İnsan Kanından hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler 23
3.3. İnsan Eritrositlerinde CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin Saflaştırma Çalışmaları 24
3.3.1. CA Enzim Hemolizatının Hazırlanması 24
3.4. CA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasıyla İlgili Çalışmalar 24
3.5. CA Enzim Aktivitesi Tayini 26
3.5.1. Esteraz Aktivitesi 26
3.6. Protein Tayini 28
3.6.1. Kalitatif Protein Tayini 28
3.6.2. Kantitatif Protein Tayini 28
3.7. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar 28
3.8. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Tayini 29
3.8.1. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler 29
3.8.2. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi 29
3.9. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerinde Yapılan Kinetik Çalışmalar 30
3.9.1. IC_{50} Değerlerinin Bulunması ile İlgili Çalışmalar 30
3.9.2. Ki Değerlerinin Bulunması ve İnhibisyon Türlerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar 30
3.9.3. Çalışmada Faydalanılan İnhibitör Bileşikler 31
4. BULGULAR 35
4.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (CA-I ve CA-II) ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları 35
4.2. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları 39
5. TARTIŞMA 42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 46
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 55

KISALTMALAR

AAZ	**:**	Asetazolamid
ACh	**:**	Asetilkolin
AChE	**:**	Asetilkolinesteraz
BChE	**:**	Butirilkolinesteraz
BRZ	**:**	Brinzolamid
CA	**:**	Karbonik anhidraz
CO_2	**:**	Karbondioksit
Cys	**:**	Sistein
DCP	**:**	Diklorofenamid
DZA	**:**	Dorzolamid
EZA	**:**	Ethoksozolamid
H_2O	**:**	Su
HCO_3^-	**:**	Hidrojen karbonat
His	**:**	Histidin
HMG CoA	**:**	Hidroksimetilglutaril-koenzim A
IUB	**:**	Uluslararası Biyokimya Birliği
NH_3	**:**	Amonyak
OH^-	**:**	Hidroksil iyonu
THA	**:**	Tetrahidro Aminoakridin
Zn^{+2}	**:**	Çinko iyonu

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No Sayfa No

Tablo 3.1. Karbonik anhidraz enzim aktivite tayin yönteminde kullanılan küvet içeriği ve madde miktarları 27

Tablo 3.2. Asetilkolinesteraz enzim aktivite tayin yöntemi için kullanılan küvet içeriği ve miktarları 30

Tablo 3.3. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin adlandırılmaları ve kodları. 34

Tablo 4.1. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin (1a-1t) hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için belirlenen IC_{50} ve K_i değerleri 39

Tablo 4.2. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin (1a-1t) AChE için belirlenen IC_{50} ve K_i değerleri..... 41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No Sayfa No
Şekil 2.1. CA-II'a ait üç boyutlu kristal yapı 7
Şekil 2.2. CA-II'in polipeptit yapısı 7
Şekil 2.3. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. 12
Şekil 2.4. CA'nın CO_2 hidratasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterilişi. 13
Şekil 2.5. Van der Waals etkileşimli sülfonamid türevleri. 15
Şekil 2.6. Sülfonamid sınıfına ait olan bazı bileşiklerin kimyasal formülleri. 16
Şekil 2.7. Asetilkolinin yapısı 18
Şekil 2.8. Asetilkolinesterazın asetat ve kolin oluşturan kataliz reaksiyonu 18
Şekil 2.9. Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu. 20
Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm şeması 26
Şekil 3.2. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin kimyasal gösterimi 31
Şekil 4.1. 1 k bileşiğin hCA-I izoenzimi üzerinde esteraz aktivitesine etkisi 35
Şekil 4.2. 1k bileşiğinin hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği 36
Şekil 4.3. 1 p bileşiğin hCA-I izoenzimi üzerinde esteraz aktivitesine etkisi 36
Şekil 4.4. 1p bileşiğinin hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği 37
Şekil 4.5. 1 p bileşiğin hCA- II izoenzimi üzerinde esteraz aktivitesine etkisi 37
Şekil 4.6. 1p bileşiğinin hCA-II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği 38
Şekil 4.7. 1s molekülünün AChE enzimi için çizilen IC_{50} grafiği 40
Şekil 4.8. 1s molekünün AChE enzimi için çizilen Lineweaver-burk grafiği 40

ÖZET

İndol Türevi Schiff Bazı Bileşiklerinin İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Ve Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerine Etki Mekanizmaları

Giriş ve Amaç: Enzimler canlı sistemlerdeki metabolizmayı oluşturan tüm biyokimyasal reaksiyonlarda görev yapan biyolojik katalizörlerdir. Bu tez çalışmasında İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin insan eritrositleri karbonik anhidraz I (hCA-I) ve II (hCA-II) izoenzimleri ve asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri üzerine in vitro inhibisyon etkileri araştırıldı.

Materyal ve Metot: Bu amaçla öncelikle hCA-I ve hCA-II izoenzimleri CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B-L-Tirozin- sülfonamid afinite kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. İzoenzimlerin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi. Saflaştırma işlemlerinden sonra hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerinde indol türevi schiff bazı bileşiklerinin inhibisyon etkileri esteraz aktivite metodu ile araştırıldı ve bu bileşiklerin her iki izoenzim için IC_{50}, K_i değerleri ve inhibisyon tipleri belirlendi. Çalışmamızda ayrıca indol türevi schiff bazı bileşiklerinin AChE aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. Her bir bileşik için IC_{50}, K_i değerleri hesaplandı ve inhibisyon tipleri belirlendi.

Bulgular: Çalışmada IC_{50} ve K_i değerleri hCA-I izoenzimi için sırasıyla 38.50-231.05 nM ve 36.18 ± 3.07- 224.29 ± 5.78 nM aralığında olduğu belirlendi. Aynı parametreler hCA-II izoenzimi için sırasıyla 33.01-216.28 nM ve 31.30 ± 2.63-201.64 ± 7.25 nM aralığında hesaplandı. İndol türevi Schiff bazı bileşiklerinin AChE için IC_{50} ve K_i değerleri sırasıyla 31.84- 135.90 nM ve 6,82 ± 0,72 - 110,30 ± 9,26 nM aralığında olduğu belirlendi.

Sonuç: İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin hCA-I, hCA-II ve AChE enzimlerini önemli ölçüde inhibe ettiği gözlendi.

Anahtar Kelimeler: Asetilkolinesteraz, indol türevi, inhibisyon, karbonik anhidraz

ABSTRACT

Mechanisms of Effect of Indole Derivative Schiff Base Some Compounds on Human Carbonic Anhydrase Isoenzymes and Acetylcholinesterase Enzyme

Introduction and Aim: Enzymes are biological catalysts that serve in all biochemical reactions that make up the metabolism in living systems. Carbonic anhydrase (E.C.4.2.1.1) was obtained from human erythrocytes, while acetylcholine esterase (AChE, acetylcholine acetylhydrolase, EC 3.1.1.7) was readily obtained. As the first step of the study, its *in vitro* effects on carbonic anhydrase isoenzyme I and II (hCA-I and hCA-II) were investigated.

Material and Method: First, hCA-I and hCA-II isoenzymes were purified using Sepharose-4B-L-Tyrosine-sulfinamide affinity column chromatography. To determine the purity of the enzymes, SDS-PAGE was performed. After purification, the inhibition effects of indole derivative Schiff base compounds on hCA-I and hCA-II enzoenzymes were examined and K_i and IC_{50} values were calculated. In our study, the inhibitory effects of indole-derived schiff base compounds on AChE activity were also investigated. In the inhibition studies of AChE, activity was measured according to the Ellman method. IC_{50} and K_i values were calculated for each substance.

Results: In the study, IC_{50} and K_i values were determined to be in the range of 38.50-231.05 nM and 36.18 ± 3.07-224.29 ± 5.78 nM for hCA-I isoenzyme, respectively. The same parameters were calculated in the range of 33.01-216.28 nM and 31.30 ± 2.63-201.64 ± 7.25 nM for the hCA-II isoenzyme. The IC_{50} and Ki values for AChE of indole derivative Schiff base compounds were determined to be in the range of 31.84 - 135.90 nM and 6.82 ± 0.72 - 110.30 ± 9.26 nM.

Conclusions: It was observed that indole derivative Schiff base compounds inhibited hCA-I, hCA-II and AChE enzymes significantly.

Keywords: Acetylcholinesterase, indole derivative, inhibition, carbonic anhydrase

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı metabolizmalarına ait sistemlerde gerçekleşen kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesine aracılık eden katalizörler olarak bilinir. Canlı hücreler tarafından sentezlenen enzimler reaksiyonları yan ürün oluşturmadan çok yüksek verimle gerçekleştirirler. Enzimler aktivasyon enerjisini düşürürler ve reaksiyon hızını arttırırlar. Reaksiyon denge sabitlerini ve sistemin termodinamik özelliklerini reaksiyon süresi boyunca değiştirmezler.

Biyokimyanın ilgilendiği en önemli konulardan biri olan enzimler sağlık alanı için oldukça büyük önem taşımakla birlikte kimya endüstrisi, ziraat ve gıda sanayi alanlarında önemli yere sahiptir. Enzimler denilen biyolojik katalizörlerin yapı ve fonksiyonları birçok bilimsel çalışma ve gelişen teknoloji ile detaylı olarak aydınlatılmaya devam etmektedir.

Bu tezde, enzimlerle ilgili genel bilgi verilirken, karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz enzimlerinin genel özelliklerinden ve aktivitelerinden bahsedilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Canlı organizmada yan ürün oluşturmadan reaksiyon süresini kısaltan ve reaksiyon verimini yüzde yüze ulaştıran biyolojik katalizörlere enzim adı verilir (1). Enzim terimin ilk olarak 1878 yılında Kuhne tarafından kullanılmıştır daha sonra 1897 yılında ise Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimleri ekstrakte ettiğini belirtmiştir (2).

Molekül ağırlığı 12.000 Da'dan 1.000.000 Da'a kadar farklılık gösteren protein yapısındaki organik bileşikler enzim olarak adlandırılmaktadır. Enzimlerin bir kısmı aktif hale geçmek için çinko, demir, mangan gibi metalik iyonları kullanırken, bir kısmı ise kompleks yapıdaki organik koenzimlerden faydalanırlar. Bu enzimler holoenzim olarak adlandırılırken protein yapılarına ise apoenzim veya apoprotein denilmektedir. Prostetik grup; enzime kovalent olarak bağlanan koenzim veya metal iyonlarıdır. Aldehitler, elektron, nikotinamid, pirofosfat, açil grupları, tiamin, gibi fonksiyonel grupların geçici taşıyıcısı görevini yapan koenzim içeren holoenzimler (koenzim A) reaksiyonların katalizlenmesinde önemli rol almaktadırlar. Koenzimler diyetle vücuda giriş yapan vitaminler tarafından meydana getirilmektedir (3). Proteinler bazı organizmalarda özel olarak bulunurken, bazı hücre türlerinde ise çok geniş yelpazede çeşitlilik gösterebilir. Proteinlerin, belirli şartlarda (sıcaklık, pH aralığı) aktivite göstermesi, proteinlerin doku veya hücrelerden izolasyonunu zorlaştırmaktadır.

Bahsedilen zorluklara rağmen sayısızca protein günümüze kadar saflaştırılabilmiştir. Kısmen saflaştırılmış olan enzim sayısı binin üzerinde iken saf kristal halde elde edilen enzim sayısı iki yüzden fazladır. Enzim aktiviteleri,

proteinlerin belirli parametrelerden (yüzey gerilimi, üç boyutlu molekül yapısı, ortamın pH'sı, sıcaklık vb.) etkilenmesiyle, çok kısa zaman içerisinde değişebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı enzim izolasyon deneyleri oldukça dikkat gerektiren çalışmalardır. İzolasyon işlemi enzimlerin;

1. Molekül ağırlığı,
2. Adsorbsiyon ve elektriksel yük farklılıkları
3. Çözünürlüğü esasına göre gerçekleştirilir (1).

Proteinlerin saflaştırılmasında en sık faydalanılan yöntem bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olan afinite kromatografisidir. Bu yöntem spesifik ligand temeline dayanmaktadır. Bazı proteinler afinite kromatografisini kullanarak tek adımda yüzlerce proteinin bulunduğu karışımlardan ayırt edilebilirler. İzole edilecek protein, kovalent bağla kolon dolgu maddesine tutunur. Sefadeks, selüloz, biojel ve sefaroz sabit faz türleri dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır.

Ligand izole edilecek protein için özel olmalı ve tersinir bağlanmalıdır. Küçük ligandların bağlı bulunduğu adsorbanlar, sterik engelden kaynaklanan düşük ayırma yeteneği gösterirler. Bu durumda uzantı kolu, kolay ve yüksek verimli izolasyon için ligand-matriks arasına bağlanıp kullanılır (1). Enzimlerin etkileşime girdiği maddeye substrat denir. Substratlar enzimlerle etkileşime geçtikten sonra ürünler meydana gelir, sonunda enzim sonuç ürününden ayrılır. Enzimlerin üç boyutlu yapılarında reaksiyon anında değişiklikler meydana gelir ancak reaksiyon bittiğinde eski üç boyutlu yapısını kazanırlar. Enzimler hem reaksiyon hızlarını artırır hem de metabolik yolaklarda meydana gelen önemli biyolojik reaksiyonların ortalama hızını düzenlerler.

Günümüzde çoğu saf halde elde edilmiş kinetik özellikleri incelenen 200'e yakın enzim tanımlanması yapılmış olup 200 enzimden fazlası da kristallendirilmiştir.

Fakat yapılan çalışmalar daha tespit edilememiş birçok enzim varlığını göstermektedir (1).

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Önceleri bileşik adlarına –az eki eklenerek enzimler sınıflandırılmıştır. Örneğin, arginaz arginini parçalayarak ornitin ve üreye, üreaz ise üreyi amonyak ve karbondioksite dönüştürmektedir. Fosfataz fosfat esterlerini hidrolizleyen enzimler olarak bilinmektedir. Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) verilen örnekler çoğu enzimlerin fonksiyonları hakkında yeterli bilgi vermediği ve aynı zamanda birçok yeni enzim ortaya çıktığı için sistematik bir sınıflandırmaya ihtiyaç duymuştur (1).

Bu amaçla enzimler katalizledikleri reaksiyon ve ilgili substratların özellikleri göz önüne alınarak sınıflandırılmışlardır. Sistematik isimlendirme şu niteliklere sahiplerdir;

a- Enzimler ve katalizlerdikleri reaksiyonlar 6 farklı gruptan oluşmaktadır. Bu gruplar ise 4-13 arası gruplara bölünmüştür.

b- Enzim ismi iki bölümden oluşur. İlk bölümü substrat(lar) a ait iken, ikincisi ise kataliznenen reaksiyon türünün sonuna "–az" eki getirilerek grup veya alt grup adı meydana getirilir. Substratların arasına iki nokta eklenerek isim oluşturulur.

c- Reaksiyon yapısı için açıklayıcı ibareler gerektiğinde, bu ifadeler parantez içine alınarak ismin son kısmında yazılabilir. Örneğin, L- Malat + $NADP^+$ ↔ Pirüvat + CO_2 + NADPH + H^+ reaksiyonunda enzimin L- malat: $NADP^+$ oksidoredüktaz (dekarboksile eden) olarak isimlendirmesi ile reaksiyonun dekarboksilasyon reaksiyonu olduğu anlaşılmaktadır.

d- Enzimlerin her birine sistematik bir kod numarası verilmiştir. Kod E.C. harflerini takip eden dört rakam tarafından oluşmaktadır. İlk rakam enzim ait grubu

gösterirken, ikinci ve üçüncü rakam alt gruba işaret eder. Son rakam, ilk üç rakamı benzer olan enzimler içindeki sıralamayı düzenler. Örneğin, E.C.2.7.1.1. koduna ait 2 numarası enzimin transferaz enzimi olduğunu işaret ederken; 7 numarası transfer ettiği grubun fosfat grubu olduğunu; 1 numarası fosfatın alkol grubuna taşındığını ve son 1 numarası ise bu transferi yerine getiren enzimler içinde bu enzimin ilk sırada yer aldığını işaret etmektedir. Sınıflandırılması yapılan bu enzimin geleneksel adı ise, ATP: D-heksoz 6- fosfotransferaz enzimidir.

Enzimler 6 ana gruba ayrılmışlardır.

1.Oksidoredüktazlar: Redoks reaksiyonlarının katalizlenmesini sağlayan enzimler oksidoredüktaz grubuna girerler. İndirgenme ve yükseltgenme olaylarını katalizleyen enzimleri kapsar.

2. Transferazlar: Hidrojen grubu dışında kalan diğer grupların iki substrat arasında taşınmasını katalizler.

3. Hidrolazlar: Suyu kullanarak çeşitli fonksiyonel gruplarına ait bağların hidrolizini katalizleyen enzim sınıfıdır.

4.Liyazlar: Fonksiyonel grupların substratlardan uzaklaştırıp çift bağları meydana getiren hidrolazlardan farklı bir mekanizma ile çalışan reaksiyonları katalizlerler.

5. İzomerazlar: İzomerleri yapısal (optik, yapısal veya geometrik) olarak birbirine dönüştürerek yeniden düzenlenmesini katalizleyen enzimlerdir. Bu grupta en çok bilinen enzimler rasemaz, mutaz ve epimeraz enzimleridir.

6. Ligazlar: İki molekülün bağlanmasında kullanılan enerjinin ATP ve GTP'de bulunan fosfat bağının koparılması ile elde edildiği reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

Genetik çalışmalar sonucu biyokimyasal reaksiyonların fazlalığının ortaya çıkarılması keşfedilmeyen enzim sayısının da çok olduğunun kanıtıdır. Çünkü hücrelerde gerçekleşen her reaksiyonda enzimler rol almaktadır. Protein özellikli enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve canlılığını kaybeden hücrelerde etkisini yitirmez.

Enzimlerin katalizleme yeteneği turnover sayısı olarak adlandırılmaktadır. Turnover sayısı bir mol enzimin birim zamanda ürüne dönüştürebildiği substratın mol sayısı olarak tanımlanmaktadır. Enzim ve substrat konsantrasyonu, inhibitor ve aktivatörlerin mevcudiyeti, iyonik şiddet, pH ve sıcaklık enzim aktivitesine etki eden faktörlerdendir (1–3).

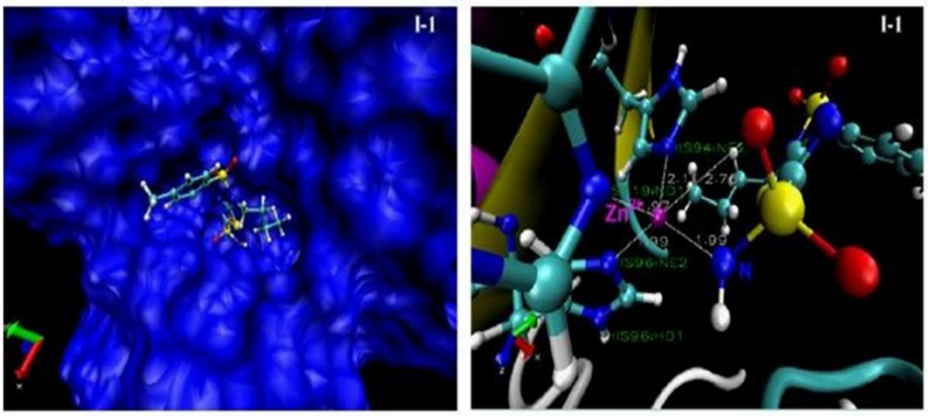
2.2. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (CA) enzimi ilk kez yapılan çalışmalar sonucu 1933 yılında eritrositlerde bulunmuştur. Ardından 1940'larda CA'nın böbrekte keşfi ile enzimin üzerindeki ilgi ürenin asidifikasyonuna ve böbreğe yönelmiştir. 1935 yılında çıkarılan ilk CA derlemesi birçok organda CA mevcudiyeti hakkında önemli bilgiler sunmuştur. 1935'ten sonra ise çeşitli CA izoenzimleri karaciğer ve kasta bulunduğu belirlenirken ve aynı zamanda en az on altı farklı CA izoenzimi vücutta tespit edilmiştir (4).

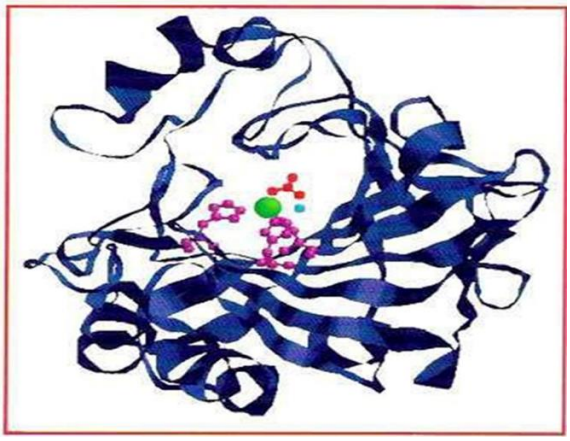
CA aktivitesi sığır eritrositlerinden 1960'daki ilk saflaştırılmasından sonra 1961 yılında insan eritrositlerinden yapılan saflaştırma ile iki adet CA formu tespit edilmiştir. Bunlar düşük aktivite ve fazla miktarda bulunan enzim ile düşük miktarlarda ve yüksek aktiviteye sahip CA-II ve CA-I olarak adlandırılan enzimlerdir (Şekil 2.1).

1970'lerin başında CAI ve CAII enzimlerine ait amino asit dizileri (5,6), 1972 (7) ve 1975 (8) yıllarında ise X-ray kristal yapıları rapor edilmiştir (9). Ayrıca yapılan

farklı çalışmalar ise CA'ın kinetik analizinin esteraz aktivitesi ile belirlenebileceğini göstermiştir (10).



Şekil 2.1. CA-II'a ait üç boyutlu kristal yapı



Şekil 2.2. CA-II'in polipeptit yapısı

CA enzimi, yapısında Zn^{+2} iyonu içerir ve CO_2'nin dönüşümlü hidrasyonunu katalizler (11) ve bu enzim bakteri, yüksek bitkiler, algler, omurgalı-omurgasız birçok farklı organizmanın yapısında mevcuttur. CA, hücre içinde CO_2'in hidrasyonu/HCO_3^-

'ın dehidrasyonu reaksiyonlarını katalize eder. $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3$, fakat H_2CO_3 kendiliğinden; $H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$ şeklinde iyonlarına ayrışmaktadır.

CA turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biridir ve enzimi meydana getiren protein zincirinin küreye benzer mavi şeritler halinde kıvrılmasıyla hücrede bulunur. Yapısında aktif merkez adı verilen cepler bulunur. Bu aktif merkezin yapısındaki bir su molekülünden proton ayrılarak hidroksit (OH^-) iyonunu meydana getirilir. Proton, enzimin baz rolüne bürünen kısmı tarafından koparılır. Çünkü yapıda bulunan bu proton fazla asidik olmamasına rağmen aktif merkezde bulunan çinko ile suya ait oksijen arasındaki Lewis asit baz etkileşmesi toplam yük dağılımını değiştirmektedir. Böylece oksijen atomu üzerinde pozitif yük meydana gelerek suya ait protonlar daha asidik hale gelmektedir. Diğer taraftan oluşan OH^- iyonu aktif merkezde bulunan karbondioksit ile reaksiyona girerek HCO_3^- (hidrojen karbonat veya bikarbonat) meydana getirir. CA'ın yapısında aktif merkezlerdeki HCO_3^- kırmızı, Zn^{+2} yeşil, H_2O ise mavi ile gösterilmiştir (Şekil 2.2). H_2O'nun protonlarından biri molekülden ayrıldığında OH^- meydana gelir. OH^- aktif merkezde bulunan karbon dioksit ile reaksiyona girerek HCO_3^- oluşturur (12).

2.2.1. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

CA enzimleri families, α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η-, ve θ- üzere beş gruptan meydana gelmektedir ve bu beş enzim arasında önemli farklılıklar yoktur. Benzer olan özellik ise tamamında çinko iyonu vardır ve katalitik fonksiyonu gerçekleştirebilirler (13).

Üç boyutlu yapılardan birincisi α-CA'dır. Bu yapıdaki enzim tipine sahip enzimler; insan CA-I ve CA-II izoenzimleri, sığır CA-III, sıçan CA-V ve *E. Coli* CA enzimleridir. Bu enzimin aktif bölgesi koni biçiminde ve oyuk şeklinde geniş bir alana yayılmıştır. Bu enzimde bulunan çinko bu oyuğun alt kısmı ile yakın konumdadır. Dört

ligand gibi su veya hidroksit ile bir tetrahedral yapıda His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Dört ligand; indirekt ligandın hidrojen bağı kullanarak diğer gruplarla bağ kurması sonucu meydana gelmiştir (13,14).

İndirekt ligandların ve metal iyonlu ligandların α-CA amino asit dizilişleri sabit yapıdadır. Zn^{+2} ligandlı indirekt ligandların ve17 amino asitli direkt bütün amino asit dizilişleri çok sıkıdır. β-CA'nın yapısı ise net bir şekilde açıklanamamakla birlikte alt ünitenin oktamer yapıya sahip olduğu belirlenmiştir. γ-CA, *M. thermophila'*dan sentezlenen bir yapı olduğu çalışmalarla belli olmuştur ve bu trimetrik molekül, α-CA'daki mevcut katlanma yapılarından tamamen farklı katlanmalara sahiptir. Bu bölge kalıtsal bölge olarak tanımlanmaktadır. Mevcut her bir ünite, her dönüşteki üç kısa iplikçiğin β-heliks yapısının yedi kez dönüşüyle oluşmaktadır. Bu yapının sonucunda yan yana üç adet yassı β-şeridi ve üçgen yapısında paralel kısımlar heliks yapıyı oluşturmuştur. Zn iyonları ise alt ünitelerde mevcuttur ve His-81, His-122 ve His-117 ile ligand oluşturur. H_2O sayesinde bükülme sağlanarak, tetrahedral yapı meydana getirilir (14,15).

2.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Aynı canlı türüne ait benzer kimyasal reaksiyonu hızlandıran, fiziksel ve kimyasal özellikleri farklı olan enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin ilgileri inhibitörlere, substratlara ve kofaktörlere karşı birbirinden farklıdır. Amino asit sayısında, sırasında, elektroforetik hareketliliklerinde ve izoelektrik pH değerinde görülen farklılıklar izoenzimlerin özelliklerindendir. İzoenzimler bir hücrenin subsellüler fraksiyonlarında yerleşmiş olabildiği gibi, farklı dokularda da sınırlandırılmış olabilmektedir (1).

Hayvanlar âlemindeki canlılarda bulunan karbonik anhidraza ait 16 izoenzim mevcuttur. Bu izoenzimlerin, bir tanesi salgısal (CA VI), iki tanesi mitokondriyal (CA-VA, VB), üç tanesi nonkatalitiktir (CA-VIII, X, XI), dört tanesi membrana bağlı (CA-IV, IX, XII ve XIV), beş tanesi sitoplazmiktir (CA-I, II, III, VII ve XIII) (4,13). İnsanda mevcut olan faklı yapıdaki izoenzimlerin gen yapıları belirlenmiş olup ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterildiği tespit edilmiştir. Bu dokular; pankreas, göz lensi, kaslar, akciğer, böbrek, gastrik mukoza, tükrük bezleri, sinir miyelin kılıfı, prostat olarak örnek verilebilir. Bu sayılan örneklerin çoğundan karbonik anhidraz enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır (16). hCA-I ve hCA-II izoenzimleri, insan kanındaki eritrosit hücrelerinden izole edilmektedir.

Karbonik anhidrazın bu izoenzimlerinin başlıca görevi, solunum olayında görev almaktır. Karbonik anhidraz doku ve akciğer pulmoner kapillerde meydana gelen $CO_2 \leftrightarrow HCO_3^-$'dönüşüm reaksiyonlarını katalizler. hCA-II izoenzimi CA'nın en çok araştırılan formu ve oda sıcaklığında 106 s^{-1} turnover sayısına sahiptir. hCA-I'e göre daha az miktarda bulunan hCA-II izoenzimi insan eritrositlerinden izole edilmektedir (16).

Göz lensi, kornea gibi dokularda bulunan CA-II izoenzimi glokom hastalığı tedavisinde kullanılırken, böbrek korteksinde bulunanlar ise sodyum ve suyun geri emilimini sağlamaktadır. CA-II noksanlığında; böbrek taşı oluşumu, kemik dokusu ve beyinde kireçlenme gerçekleşmektedir. Bu dokular için CA-II izoenzimi oldukça önemlidir (17). İskelet kasında CA olarak hCA-III izoenzimi tespit edilmiş ve laktat \ laktik asit dengesinde oldukça önemli bir göreve sahiptir. Kırmızı kas dokusuna zayıf bağlı olarak bulunan CA-III enzimi, karbondioksitin doku kapilerine difüze olmasını

sağlar (18) ve bu dokuya zayıf bağlı olduğu için büyük oranda çözünebilir bir proteindir. Ayrıca hCA-III enzimi yağ dokusunda yüksek konsantrasyon da bulunmaktadır ve fosfataz aktivitesine de sahiptir (19). hCA-IV izoenzimi de böbrek, kornea, silyer epitelyum, göz lensi, epitel hücreleri ve akciğerde kapiler hücrelerinde bulunmaktadır. hCA-IV ve hCA-VI izoenzimleri, iki sinyal sekans izoenzimleridir ve sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasında görev aldığı bilinmektedir. Son dönemde, üre sentezinin sülfonamid inhibitörlerinin kullanımı ile azaltıldığı belirlenmiştir. hCA-IV'ün, sitrik asit yolağında bulunan CO_2'yi kaynak olarak kullanıp HCO_3^- iyonunu sitrülin sentezi için temin etmesinden dolayı üre devrinde önemli role sahip olması, bu durumu açıklamaktadır (20). Tükrük bezinden izole edilen hCA-VI izoenzimi tükürüğün pH dengesini sağlarken, hCA-VII izoenzimi ise tükrükte bikarbonat salgılanmasında rol almaktadır (21). CA-VIII enzimi de lağım faresinin beynin dokusundan elde edilen bir cDNA veritabanında bulunmuştur. CA-IX ise insan serviks kanser hücrelerinde eksprese edilmiş ve tümöre bağlı antijen olarak sınıflandırılmıştır.

CA-X izoenziminin talamus, böbrek, beyin, serebral korteks, hippokampus, hipofiz bezi, pankreas, böbrek, karaciğer, tükrük bezi spinal kort ve yumurtalıkta mevcut olduğu belirlenmiştir. CA-XI izoenzimi, güçlü bir sinyal iletiminde ve sinyal uyumunda rol oynadığı bilinmektedir. Beyinde kuvvetli bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir ve pankreatik kanser hücresinde güçlü sinyaller belirlenmiştir.

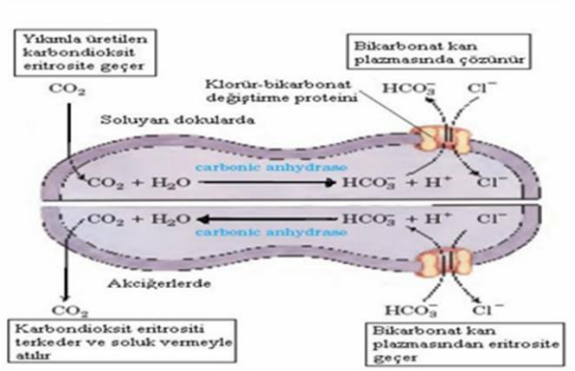
CA-XIII izoenzimi, sinidirim sistemi dokularından (testis, tükrük, uterus, ince bağırsak, böbrek ve kolon) saflaştırılmıştır ve CA-I, II ve III sitozolik enzimlerine benzeyen globüler moleküldür. Yapılan çalışmalarda insanların ince bağırsak, kolon, dalak, timus, testis, prostat, yumurtalık dokularında farelerin ise; iskelet kası, akciğer,

dalak, beyin, böbrek, kalp ve testislerde pozitif sinyaller elde edilmiştir (22). CA-XIV izoenzimi ilk olarak fare böbreğinde tanımlanmıştır. Ratlar üzerinde yapılan çalışmalar CA-XIV mRNA ekspresyonunun sırasıyla en çok böbrek, kalp, beyin, karaciğerde ve iskelet kasında bulunduğunu göstermiştir. Düşük katalitik aktiviteye sahip CA-XV ise kimyasal olarak CA-IV'ya benzemektedir (23).

2.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Biyolojik Fonksiyonları

Karbondioksit ve bikarbonatın birbirlerine dönüşümleri canlı metabolizması için oldukça önemlidir (3). Hücre içine ve hücre dışına kolay geçebilen CO_2 'in aksine HCO_3^- lipitlerde tam olarak çözünmediği için hücre membranından geçemez. Bundan dolayı gereken durumlarda HCO_3^-'ın hücre içine transferi ve CO_2'nin de burada kalabilmesi için bu reaksiyon meydana gelmektedir (Şekil 2.3) (3).

Reaksiyonun fizyolojik pH'da enzimsiz meydana gelmesi uzun süre alacak iken CA'nın katalizi sonucu reaksiyon daha kısa sürede gerçekleşmiştir (3).

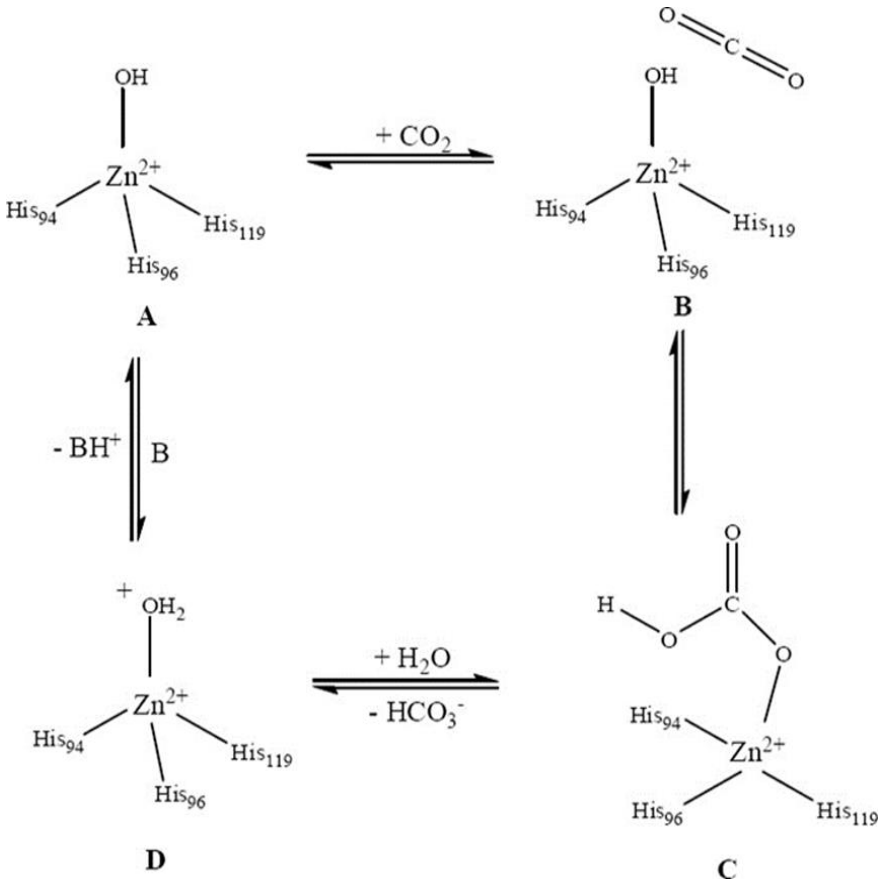


Şekil 2.3. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi

CA'ın bitkilerde pH değişimlerinden kaynaklanabilecek denatürasyonlardan bitkiyi korur ve kloroplastik pH'ların düzenlenmesinde rol alır. Karbonik anhidrazın, lipojenez olayında aldığı rolün yanı sıra piruvat karboksilaz ve karbamoil fosfat

sentetaz-I enzimlerine bikarbonat iyonu sağladığı, glukoneojenez ve üre devrinde de etkin olduğu tahmin edilmektedir (24).

CA'ın yapısında Zn^{+2} ve OH^- iyonlarını içermesi enzime katalitik etki kazandırmıştır. CA bir OH^- iyonu, bir Zn^{+2} iyonu ve üç histidin ile bağ yapmıştır. CA, yapısındaki OH^- iyonun'dan dolayı CO_2 molekülü ile etkileşir ve Zn^{2+}'a bağlanan HCO_3^-'ü oluşturur (Şekil 2.4). Bu reaksiyon sonucu CO_2'in HCO_3^- iyonuna dönüşümü gerçekleşmiş olur (25).



Şekil 2.4. CA'nın CO_2 hidratasyon reaksiyonunun şematik olarak gösterilişi

2.2.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

CA izoenziminin bikarbonatın dehidratasyonu ve esterlerin hidrolizi gibi görevleri, CO_2'nin hidratasyonunu da belirler.

$$H_2O + CO_2 \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$$

Yukarıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi, ya karbondioksit gazı harcanmakta ya da oluşmaktadır. Oluşan veya harcanan CO_2 gazının, manometrik yolla teşhisi yapılabilir. Fakat manometrik metodunun dezavantajları arasında reaksiyon pH'sının değişkenlik göstermesi, CO_2'in sudaki çözünürlüğünün az olması yer almaktadır. Ayrıca ortamdaki H^+ konsantrasyonu azalmakta veya çoğalmaktadır (22).

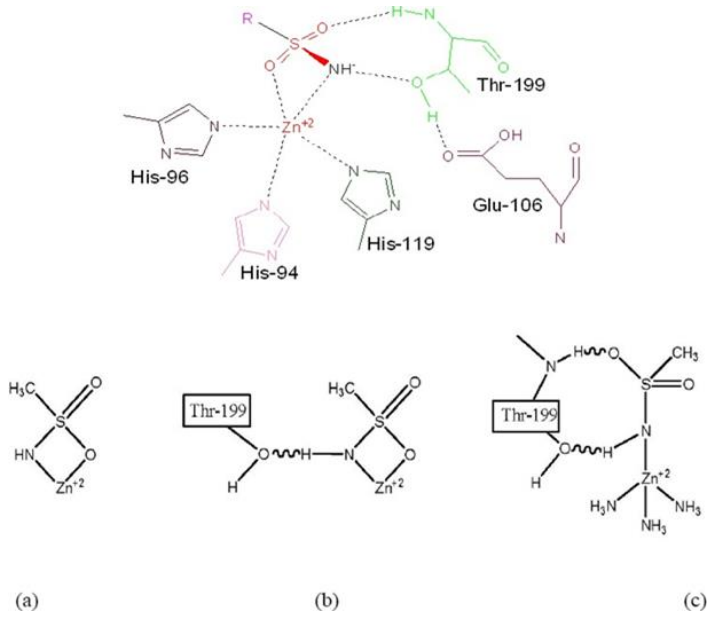
İkinci olarak, ortamın H^+ derişiminin azalması ve artması için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle bulunabilir. Ancak metodun kısa süreli uygulanabilirliği bir avantaj olsa da, pH'ın değişiklik göstermesi, suda CO_2'in düşük çözünürlüğü ve indikatörün inhibisyon etkisi dezavantaja yol açmaktadır. Bu dezavantajları minimize edebilmek için spektrofotometre ile aktivite ölçümü yapılmaktadır (22). Wilbur - Anderson metodu izolasyon esnasında aktivite ölçümleri için kullanılmaktadır. Wilbur - Anderson metodunda; CO_2 hidratasyonu esnasında pH'nın 8.2'den 6.3'e düşmesi için geçen süre bulunmaktadır (22).

2.2.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki başlık altında toplanmıştır. Bunlardan ilki inorganik anyon ve katyonlar ikincisi ise organik inhibitörlerdir. Karbonik anhidraz enzimini inhibe edenler genellikle tek değerli olan anyonlardır. Bu anyon serileri; asetik asit, azit, bisülfit, brom, hidrojen sülfür siyanür, tiyosiyanat, nitratlardır (11). Son dönemde gerçekleştirilen araştırmalarda aromatik ve heteroaromatik

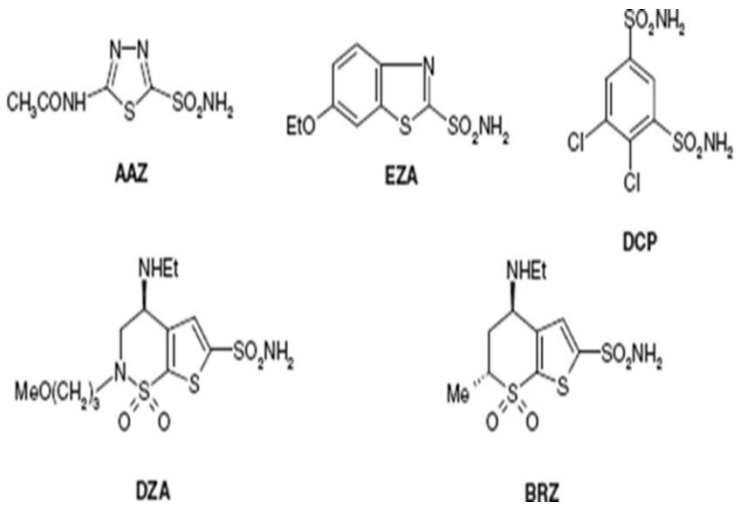
sülfonamidlerin en etkili CA inhibitörü olduğu belirlenmiştir (11). Sülfonamidlerin basit yollarla iyonik hale dönüşmeleri dikkat çeken en önemli özelliklerindendir (11).

p-aminobenzensülfonamid maddesinin türevi olan sülfanilamid, benzolamid, etoksizolamid, metazolamid, ve klorozolamid bileşikleri sülfonomid sınıfına aitlerdir ve CA'da farklı yollarla etki gösterirler. Asetozolamid ve azid, CA'ları inhibe etme özelliğine sahiptir ve bu enzimin CO_2 hidrasyon aktivitesini inhibe ederler (11). Sülfonamidler yapısında $-SO_2NH_2$ veya $-SO_2NH(OH)$ grubu barındıran inhibitörlerdir. Sülfonamidler ilk başta azot atomu sayesinde enzimdeki metal iyonuna (aktif bölge) iyonik bağla tutunurlar. Son olarak da enzim inhibitör bağı hidrofobik etkileşimlerle sağlanmış olur. Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını anlamak için enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjileri ve yapı aktivite ilişkileri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar, sülfonomid türevlerinin farklı K_i değerlerine sahip olmasının altında, farklı düzeyde Van der Waals etkileşmeleri ile enzim-substrat bağının gerçekleşmesini göstermektedir. (Şekil 2.5) (11).



Şekil 2.5. Van der Waals etkileşimli sülfonamid türevleri

CA inhibitörleri olan sülfonamidler, uzun senelerdir diüretik ve antiglokom ilaçları olarak kullanılmaktadır. Klinik çalışmalarda kullanılan sülfonamid ya da sülfamat sınıfından birçok ilaç mevcuttur. Asetazolamid, Ethoksozolamid, Diklorofenamid, Dorzolamid ve Brinzolamid inhibitörleri diüretik olarak, epilepsi, glokom, obezite tedavilerinde, ağrı kesici ve antibakteriyel olarak birçok alanda kullanılır (26). Sülfonamid sınıfından bazı bileşiklerin kimyasal formülleri ise Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Sülfonamid sınıfına ait olan bazı bileşiklerin kimyasal formülleri

2.3. Kolinesterazlar

Kolinesterazlar bilhassa asetilkolin ve bütirilkoline olan ilgileri sebebiyle ikiye ayrılır. (AChE, EC 3.1.1.7, BChE, EC 3.1.1.8). AChE ve butirilkolinesterazı (BChE) birbirinden ayıran önemli özellikte yüksek substrat konsantrasyonlarında BChE aktivite gösterirken AChE'ın inhibe olmasıdır. Enzimlerin farklı düzeyde seçici inhibisyonları bir diğer ayırıcı parametredir. 1,5-bis (4-allildimetilaminopropilpentan-3-on-dibromür) AChE'yi seçici olarak inhibe ederken, tetraizopropil pirofosforamid (iso-OMPA) ve 10-(2-dietilaminopropil)-fenotiyazid (etopropazin) BChE'yi inhibe

ederler. BChE ve AChE sırayla 3. ve 7. kromozomlarda kodlanarak aminoasit dizi içeriklerinde benzerlik gösterirler (26–28).

AChE, sinir sistemindeki sinapslar arasındaki transeferde görev alan asetilkolin bileşiğini hidroliz eden enzimdir. Bu enzim genel olarak kas ve beyin sinirlerinin sinapslarında bulunur. İlk kez kimyasal yapısı X-ışını ile J.L. Sussman tarafından 1991 yılında yılında keşfi yapılmıştır (27).

Karaciğerde sentezlenerek dolaşıma katılan Serum BChE süksinilkolinin hidrolizinde görev almaktadır.

AChE ve BChE enzimleri Alzheimer hastalığında oldukça önemli görevleri olan enzimlerdir. Hastalığa neden olan sebepler şuan için tam olarak bulunmasa da, asetilkolinin miktarı azaldıkça Alzheimer'ın şiddetlenmesinin bu enzimlerle bağlantılı olduğu bulunmuştur. Alzheimer tedavisinde tercih edilen ilk yöntem sinaptik aralıkta daha uzun süreli asetilkolin varlığını sağlamaktır. Bu sebeple kolinesteraz enzim inhibitörleri tercih edilmektedir (29).

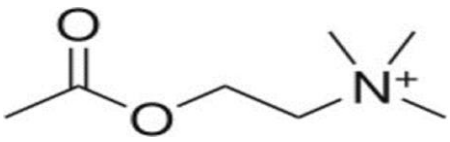
2.3.1. Asetilkolinesteraz Enzimi

AChE enzimi vücutta merkezi ve periferal dokularda, adrenerjik ve kolinerjik dokularda, sinir ve kas dokularında, eritrositlerde ve plasental dokularda bulunan bir enzimdir. Bu enzim sinaptik boşluklarda bulunan asetilkolini asetat ve koline parçalayıp inaktive eder. İlk olarak 1914 yılında İngiliz bilim insanı Henry Hallet Dale tarafından tanımlamıştır. Avustralyalı bilim insanı Otto Lewi ise 1921 yılında kurbağa kalpleri ile yaptığı çalışmalar sonucu asetilkolinin nörotransmitter olduğunu doğrulamıştır. Bu buluş sayesinde bilim insanları 1936'da Nobel Ödülü almışlardır. Asetilkolinin, Parkinson ve Alzheimer hastalıklarının metabolizmasında etkili olduğu bulunmuştur (30).

Nöromuskular kavşakta ve kolinerjik beyin sinapslarında bulunan AChE karboksilesteraz ailesi hidrolaz grubu enzimlerindendir. Asetilkolini hidrolize eden AChE organofosfat türevlerinin (pestisitve sinir gazı) birincil inhibisyon hedeflerindendir (31).

2.3.1.1. Asetilkolinesterazın Yapısı ve Mekanizması

AChE karaciğerde sentezlenir ve ilk kez 1938 yılında elektrik balığından (*Torpedo marmoneta)* saflaştırılmıştır. Yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinen AChE enzimi saniyede yaklaşık 25.000 asetilkolin (ACh) molekülünü parçalama özelliğine sahiptir. Bu enzimin aktif bölgesi katyonik ve anyonik alt birim olmak üzere iki alt birimden oluşmaktadır. AChE' ın mekanizması ve yapısı enzimin kristal yapısı ile açıklanmıştır (27,28). Enzimin nörotransmitter madde ve substratı olan asetilkolinin kimyasal yapısı aşağıdaki gösterilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Asetilkolinin yapısı



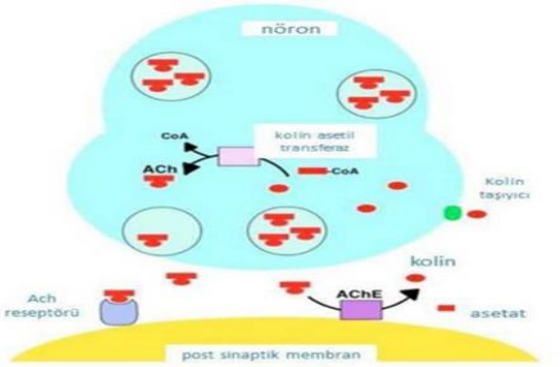
Şekil 2.8. Asetilkolinesterazın asetat ve kolin oluşturan kataliz reaksiyonu

Enzimdeki anyonik kısım asetilkoline ait kuaterner amin ile bağ kurar. Bahsedilen bölge ile iğer artı yüklü substrat veya inhibitörler de bağ yapabilir. Katyonik substratlar, aktif bölgeye giden 14 aromatik amino asit ile etkileşim kurarlar

(32). Aromatik aralıktaki bu 14 amino asit oldukça fazla bir korumaya sahiptir (33). Aromatik asitler arasında yer alan triptofanın alaninle değişikliği enzimin reaktifliğini önemli seviyede düşürür (34). Aktif bölgeye giden bu aralık yaklaşık olarak 20 A^o uzunluğa sahiptir. Aktif bölge enzimin alt kısmı arasında 4 A^o bir mesafe bulunmaktadır (35). Asetilkolinin asetat ve koline hidrolizlendiği esteratik alt birim katalitik üçlü; serin 200, histidin 440, glutamat 327 amino asitlerinden oluşmuştur. Bu üçlü amino asit grubu, 3. amino asitin olması gereken aspartat yerine glutamat gelmesi dışında serin proteazlarla benzer dizilime sahiptir (36). Karboksil esterin hidroliz reaksiyonu açil-enzim ve serbest kolinin oluşumuna sebep olmaktadır. Daha sonra açil-enzim, H_2O molekülü tarafından nükleofilik atağa uğrar ve histidin 440 amino asitinin etkisiyle asetik asit serbest kalır ardından tekrar serbest enzim oluşur (37).

2.3.1.2. Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu

Sinir iletimi esnasında asetilkolinesteraz, sinaptik boşluğa bırakılır ve post-sinaptik membrandaki ACh reseptörlerine takılır ardından sinyal meydana gelir. Benzer şekilde post-sinaptik membranda asetilkolinesteraz enzimi asetilkolini hidrolize ederek sinyal akışını engeller. Serbest kalan kolin önceki sinaptik sinir hücresi tarafından tekrar alınır ve kolin asetiltransferaz enzimi tarafından asetil-CoA ile reaksiyonundan tekrar asetilkolin sentezlenir (Şekil 2.9) (36–38).



Şekil 2.9. Asetilkolinesterazın Biyolojik Fonksiyonu

2.3.1.3. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

Merkezi kolinerjik fonksiyonun yaygın kaybı ile karakterize edilen, ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluk olan Alzheimer hastalığının bilinen tek semptomatik tedavisi, kolinerjik aktiviteyi arttırmak için kolinesteraz inhibitörlerinin kullanılmasıdır. AChE sağlıklı beyinde baskın iken, butirilkolinesterazın (BChE) beyin asetilkolin seviyelerini düzenlemede küçük bir rol oynadığı düşünülür. Bununla birlikte, BChE aktivitesi Alzheimer hastalığı olan hastalarda giderek artar, AChE aktivitesi değişmeden kalır veya azalır (39). Tüm bu bulgular, bellek işlemede ve depolama esnasında kolinerjik nörotransmisyonun bilinen rolü ile birlikte, kolinerjik çoğalmanın, metabolize edici enzimlerinin inhibisyonu sonucu asetilkolin etkisinin çoğaltılması yoluyla Alzheimer semptomlarını azaltacağı hipotezine yol açmıştır. Alzheimer'in etiyolojisi ve kesin patogenezi belirsiz olduğundan, bu hipotez, bilişsel işlevi geliştireceği umuduyla, merkezi kolinerjik fonksiyonu güçlendirmeyi amaçlayan Alzheimer'in semptolojik tedavisinin mantığını oluşturmuştur (39).

Yapılan çalışmalarda rivastigminin beyin omurilik sıvısındaki (BOS) AChE aktivitelerini % 43 oranında azalttığı, galantamin'in AChE aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı ve donepezilin BOS AChE aktivitesini % 12 oranında önemli

ölçüde artırdığı gösterilmiştir ayrıca donepezil veya galantamin tedavisini takiben BOS AChE aktivitesinde büyük ve anlamlı bir artış bildirilmiştir, ancak plasebo ile anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (39).

Ancak bu artışlar, sağlıklı gönüllülerde rivastigmin kullanımı ile BOS AChE aktivitesinde önemli bir azalma gözlemlenen başka bir çalışma ile tezatlık oluşturmuştur (40). Genel olarak, birçok çalışmanın sonuçları, hızlı geri dönüşümlü kolinesteraz inhibitörleri (donepezil, galantamin ve takrin) ile tedavinin, Alzheimer hastalarının BOS'unda AChE aktivitelerinin belirgin ve önemli bir yukarı regülasyonuna neden olabileceğini, ancak BChE'yi önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir (40).Toplam BOS AChE aktivitelerinin ölçümünün, tedavi etkilerini ve sonuçlarını tahmin etmek için yeterli olmayabileceğine dair artan bir görüş vardır (40).

2.3.1.4. Asetilkolinesteraz İnhibitörleri

Asetilkolinesteraz inhibitörleri AChE inhibisyonu sağlayarak asetilkolinin yıkımına engel olurlar. Bunun sonucunda asetilkolin derişimi ve işlev süresi artış gösterir. AChE inhibitörleri 3 farklı şekilde etki gösterirler; geri dönüşümlü (karbamatlar, piperidinler, fizostigmin, piridostigmine, ambenonium, rivastigmin, fenantren türevleri, neostigmin, galantamin, ladostigil, kafein, donepezil, takrin, edrofonyum, demekaryum, Huperzin A, ungeremine, lactucopicrin), geri dönüşümsüz, yarı geri dönüşümlü (organofosfatlar, ekotiofat, sarin, diazinon, propamocarb, diizopropilfluorofosfat, karbetamit, malathion, karbosulfan, soman, galantamin, cadusafos, pinmicarb, oxamyl, siklosarin, diklorvos, dimethoat, tabun, propham, methomyl, parathion, aldicarb, ethiofencarb, bendiocarb, phenmedipham, bufencarb,

pirimicarb, huperzine A, karbaril, karbendazim, propoxur, karbofuran, chlorbufam, chlorpropham, klorprifos, formetanate, methiocarb, onchidal ve kumarinler) (41).

Yarışmalı ve yarışmasız geri dönüşümlü AChE inhibitörleri tedavilerde kullanılırken, yarı-geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz AChE inhibitörleri daha çok kimyasal silah ve pestisit yapımında tercih edilirler (37). AChE enzimi inhibitörleri birçok alanda kullanılır. Doğal olarak bitkisel ve hayvansal kaynaklı zehirler AChE enzimini inhibe edebilirler. Sinir gazları kimyasal silah olarak kullanılabilir ve insektisitlerde bulunurlar (42).

Tıbbi amaçlı olarak, Lewy Body Dementia tedavisinde, Alzheimer da nöropsikiyatrik semptomların tedavisinde, antikolinerjik zehirlenmede, non-depolarlayıcı kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirmede, Parkinson, glaucoma ve myasthenia gravis tedavisinde kullanılır. BChE enzimi inhibitörleride son yıllarda AChE inhibitörleri gibi Alzheimer tedavisinde tercih edilmeye başlanmıştır (43).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan aletler ve cihazlar kullanılmıştır.

UV Spektrofotometre	:	Shimadzu
Buzdolabı	:	Siemens
pH metre	:	Thermo
Hassas terazi	:	Denver Instrument
Otomatik pipetler	:	Eppendorf ve Socorex
Vorteks	:	Nüve SL 350

Tez çalışmasında deneyler boyunca kullanılan kimyasal maddelerin tümü analitik saflıktadır. Elektrikli yılan balığından (*Electrophorus electricus)*, saflaştırılmış asetilkolinesteraz enzimi, asetiltiyokolin iyodat, L-Tirozin p-nitrofenilasetat (Tris), HCl, etanol 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), sodyum sitrat gibi kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edildi. İnsan kanı Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kan Merkezi' nden taze olarak temin edildi ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.2. İnsan Kanından hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Saflaştırılması İle İlgili Çalışmalar

3.2.1. İnsan Kanından hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 0.2 M $NaHCO_3$, pH 8.8 (Afinite jeli Sepharose-4B matriksi hazırlarken kullanılan tampon)

2. 25 mM Tris-HCl/ 22 mM Na_2SO_4, pH 8.7 (Hemolizat tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti)

3. 25 mM Tris-HCl/ 0.1 M Na_2SO_4, pH 8.7 (Afinite jelini dengelenmek için kullanılan tampon çözelti)

4. 25 mM Na_2HPO_4 /1 M NaCl, pH 6.3 (Kolona bağlanmış olan hCA-I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti)

5. 0.05 M Tris-SO_4, PH 7.4 (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti)

6. 0.1 M CH_3COONa/ 0.5 M $NaClO_4$, pH 5.6 (Kolona bağlanmış olan hCAII enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti)

3.3. İnsan Eritrositlerinde CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin Saflaştırma Çalışmaları

3.3.1. CA Enzim Hemolizatının Hazırlanması

Alınan taze insan eritrositleri hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4 ℃'de 10.000 g'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıkla dikkatli bir şekilde alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 ℃'de muhafaza edildi (39,40).

3.4. CA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılmasıyla İlgili Çalışmalar

a. Sepharose-4B-L-Tirozin afinite jelinin hazırlanması: CNBr kullanılarak aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi ile afinite jeli hazırlandı. Hazırlanan kolona L-Tirozin'in kovalent bağlanması gerçekleştirildi. Ardından sülfanilamid L-Tirozine diazollanma yoluyla bağlandı. Sülfanilamid, enzimi spesifik olarak bağlayan bölümünü, tirozin de afinite jelinin uzantı kolunu ve afinite jeli oluşturuldu.

b. CNBr kullanılarak aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B'ye tirozin takılması: CNBr kullanılarak aktifleştirilmiş olan Sepharose-4B, 250 mL 0.1 M soğuk $NaHCO_3$ tamponu (pH 10.0) ile yıkanıp behere alındı. Hazırlanan $NaHCO_3$ tamponundan 20 mL alınıp içinde 80 mg tirozinin çözünmesi sağlandı. Bu soğuk çözelti başka bir behere alınarak karıştırıldı. Daha sonra bu çözelti, 2 saat boyunca +4 °C'de manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. +4 °C'de 16 saat bekletildi. Sonra yıkama suyu ile 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylelikle tirozin uzaklaştırılmış oldu. 100 mL'lik 0.2 M $NaHCO_3$ tamponu ile (pH 8.8) yıkama tekrarlanarak tirozin bağlı jel, 40 mL'lik aynı tamponun içine alındı.

c. Sülfanilamid kenetlendirilmesi: Sülfanilamidten 25 mg alınıp 0 °C'deki 10 mL, 1 M HCl içerisinde çözüldü. Ardından içinde 75 mg $NaNO_2$ bulunan 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisinin içine yavaş yavaş eklendi. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış olan sülfanilamid 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamid süspansiyonuna ilave edildi. pH'sı 9.5 olan 1 M NaOH ile 3 saat boyunca 25 °C'de yavaşça karıştırıldı. Sonra 1 litre saf su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO_4 (pH 7.4) tamponuyla yıkandı. Daha sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı.

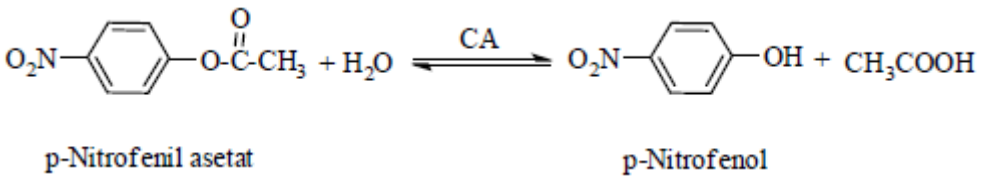
d. Afinite kolonunun paketlenmesi: Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH 7.8) içine alınarak jel süspanse edildi ve vakum ile havası alındı. Süspanse edilen bu jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemli soğutmalı kolona aktarıldı. Jel çöktükten sonra dengeleme tamponu ve peristaltik pompa yardımıyla yıkama sağlandı. Kolonun dengelenmiş olduğu toplanan eluat ile tamponun 280 nm'de absorbanslarının veya pH'larının eşit olmasından anlaşıldı.

e. Afinite kolonuna numune tatbik edilmesi ve elüsyonu: Hemolizatın pH'sı katı Tris yardımıyla pH 8.7'ye ayarlandı. Ardından pH'sı ayarlanan hemolizat kolona aktarıldı. Kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/ 22 mM Na_2SO_4 (pH 8.7) çözeltisi yardımıyla yıkandı. Böylece hCA-I ve hCA-II enzimi kolona bağlanmış ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/ 25 mM Na_2HPO_4 (pH 6.3) tamponu ilave edilerek hCA-I enzimi daha sonra da 0.1 M $NaCH_3COO$/ 0,5 M $NaClO_4$ (pH 5.6) çözeltisi kolona aktarılıp hCA-II enzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı ile elüatlar 5'er mL halinde tüplere toplandı ve 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı. Peristaltik pompa kullanılarak kolonun akış hızı 20 mL/saat'e ayarlandı.

3.5. CA Enzim Aktivitesi Tayini

3.5.1. Esteraz Aktivitesi

Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitisine sahip olması hususuna dayanmaktadır. Metodun prensibi ise kısaca şöyle açıklanabilir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı 348 nm'de absorbsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz etmektedir (44–46). Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. p-Nitrofenilasetatın p-nitrofenole dönüşüm şeması

348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat aynı absorbansı göstermektedir. Bundan dolayı fenol grubundaki H^+ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (44–46). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbsiyonu

olduğu için, kör olarak kullanılmaktadır. 1 mL'lik kuvarz küvet kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

Tablo 3.1. Karbonik anhidraz enzim aktivite tayin yönteminde kullanılan küvet içeriği ve madde miktarları

Kullanılan Maddeler	**Kontrol Tüpü (µl)**	**Numune Tüpü**
Tris-SO_4 (pH:7.4, 0.05 M)	467	467
p-Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Tablo 3.1'e göre reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir 25 °C' de ve 348 nm'de absorbans değeri okundu ve 3 dakika sonundaki değerler okunarak absorbans farkları alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Yapılan deneylerde kullanılan p-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27.2 mg ester, 1ml aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişiğini hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (46). Kinetik çalışmalar esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.6. Protein Tayini

3.6.1. Kalitatif Protein Tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (47). Bu metot yardımıyla kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.6.2. Kantitatif Protein Tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Brillant Blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan komplex 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya komplexi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (48).

3.7. CA Enzimi İçin Yapılan Kinetik Çalışmalar

5 farklı inhibitör konsantrasyonuna karşılık % Aktivite/İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizildi ve IC_{50} değerleri hesaplandı. İnsan kanından saflaştırılan CA enziminin K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için en az beş farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda üç farklı inhibitör konsantrasyonuna karşılık aktivite ölçümü yapıldı. Lineweaver-Burk grafiği çizildi ve bu grafikten Ki değerleri hesaplandı.

3.8. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi Tayini

3.8.1. Asetilkolinesteraz Enziminin Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1. 1 M'lık Tris-HCl Tamponu

2. 10mM'lık Asetilkolin İyodat Çözeltisi

3. 10 mM'lık DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) Çözeltisi

3.8.2. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi

İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin asetilkolinesteraz enzimi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla öncelikle saf asetilkolinesteraz enzimi hazır olarak temin edildi. Enzim, aktivitesinin korunacağı uygun tampon çözücüde çözülerek belirli hacimlere ayrılarak buzdolabında uygun şartlarda saklandı. Enzim aktivitesi yönteminin esası asetilkolinin kolinesterazlarla parçalanması sonucu oluşan tiyokolinin 5.5' ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)le reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturması ve bu ürünün 412 nm'de absorbans göstermesi dayanır (49). Asetillkolinesteraz enzim aktivitesi ölçümünde 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve asetillkolin iyodür substrat olarak kullanılırlar. 1 mL'lik küvet hacmi için; reaksiyon karışımındaki maddeler ve miktarları sırasıyla Tablo 3.2'deki gibi uygulandı.

Tablo 3.2. Asetilkolinesteraz enzim aktivite tayin yöntemi için kullanılan küvet içeriği ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-HCl	100	100
Saf Su	790	780
Örnek	-	10
DTNB	50	50
Enzim çözeltisi	10	10
Asetilkolintiyoiyodür	50	50

3.9. Asetilkolinesteraz Enzimi Üzerinde Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.9.1. IC_{50} Değerlerinin Bulunması ile İlgili Çalışmalar

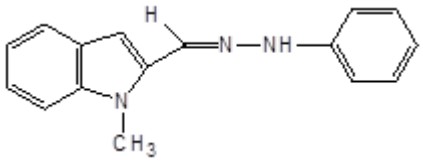
Asetilkolinesteraz Enzimi için Tablo 3.2'deki reaksiyon karışımları ayarlandıktan sonra 1 dakikada bir absorbans değeri okunarak ve 3 dakika sonunda 25°C'de 412 nm'de son absorbans değeri okundu. Başlangıç ve son okunan değerler arasındaki fark kaydedildi. Bu işlemler her enzim ve her madde için 5 farklı inhibitör konsantrasyonu tekrarlandı. İnhibisyon etkisi gösteren her molekül için %Aktivite/İnhibitör konsantrasyonu grafiği çizilerek IC_{50} değerleri hesaplandı (50).

3.9.2. Ki Değerlerinin Bulunması ve İnhibisyon Türlerinin Belirlenmesi ile İlgili Çalışmalar

İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin AChE enzimi için K_i değerlerini belirlemek amacıyla en az 5 değişik substrat ve 3 farklı inhibitör konsantrasyonu kullanılarak aktivite ölçümü yapıldı. Farklı her inhibitör için Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_i değerleri hesaplandı ve her madde için inhibisyon türleri belirlendi (50).

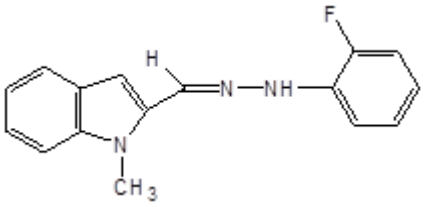
3.9.3. Çalışmada Faydalanılan İnhibitör Bileşikler

Çalışmamızda hCA I, hCA II ve AChE enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini araştırdığımız indol türevi schiff bazı bileşiklerinin molekül yapıları aşağıda verilmiştir. (Şekil 3.2) Bu moleküller Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Hanif Şirinzade tarafından sentezlenmiştir. (Tablo 3.3) (51).



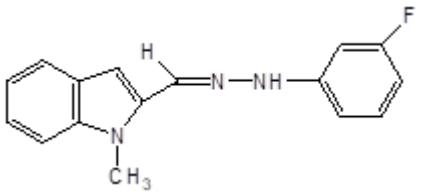
Molekül ağırlığı: 249,31 g/mol

1a



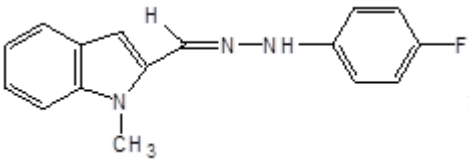
Molekül ağırlığı: 267,3 g/mol

1b



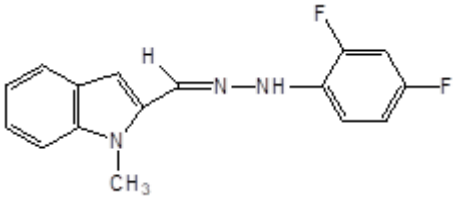
Molekül ağırlığı: 267,3 g/mol

1c



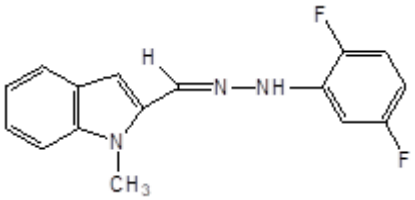
Molekül ağırlığı: 267,3 g/mol

1d



Molekül ağırlığı: 285,29 g/mol

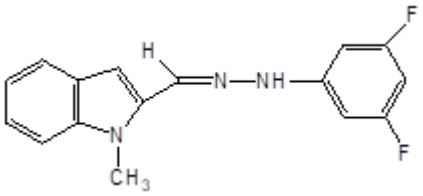
1e



Molekül ağırlığı: 285,29 g/mol

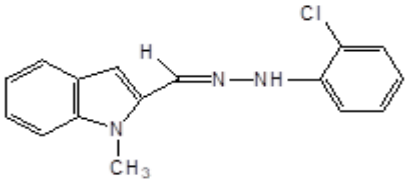
1f

Şekil 3.2. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin kimyasal gösterimi



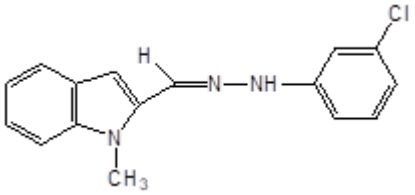
Molekül ağırlığı: 285,29 g/mol

1g



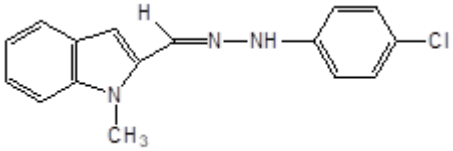
Molekül ağırlığı: 283,76 g/mol

1h



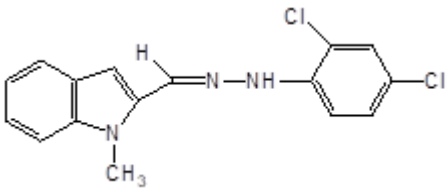
Molekül ağırlığı: 283,76 g/mol

1i



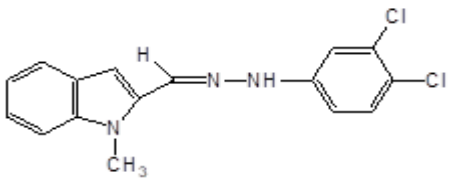
Molekül ağırlığı: 283,76 g/mol

1j



Molekül ağırlığı: 318,2 g/mol

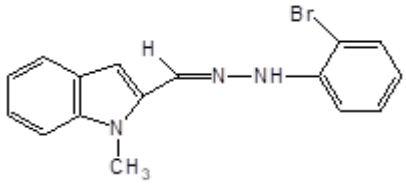
1k



Molekül ağırlığı: 318,2 g/mol

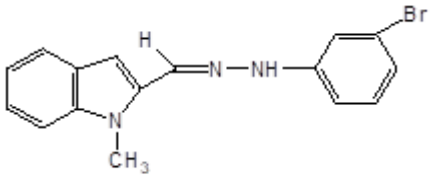
1l

Şekil 3.2. (Devamı) İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin kimyasal gösterimi



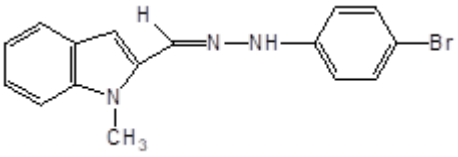
Molekül ağırlığı: 328,21 g/mol

1m



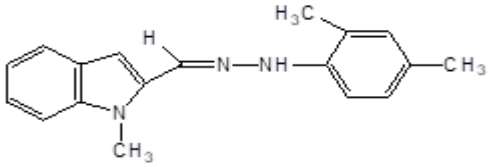
Molekül ağırlığı: 328,21 g/mol

1n



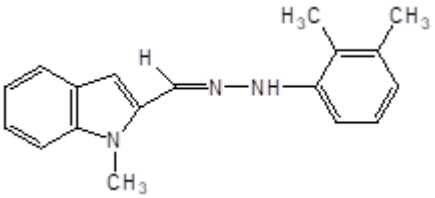
Molekül ağırlığı: 328,21 g/mol

1p



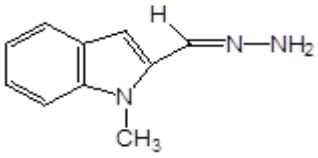
Molekül ağırlığı: 277,36 g/mol

1q



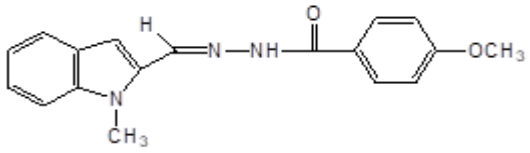
Molekül ağırlığı: 277,36 g/mol

1r



Molekül ağırlığı: 173,21 g/mol

1s



Molekül ağırlığı: 307,35 g/mol

1t

Şekil 3.2. (Devamı) İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin kimyasal gösterimi

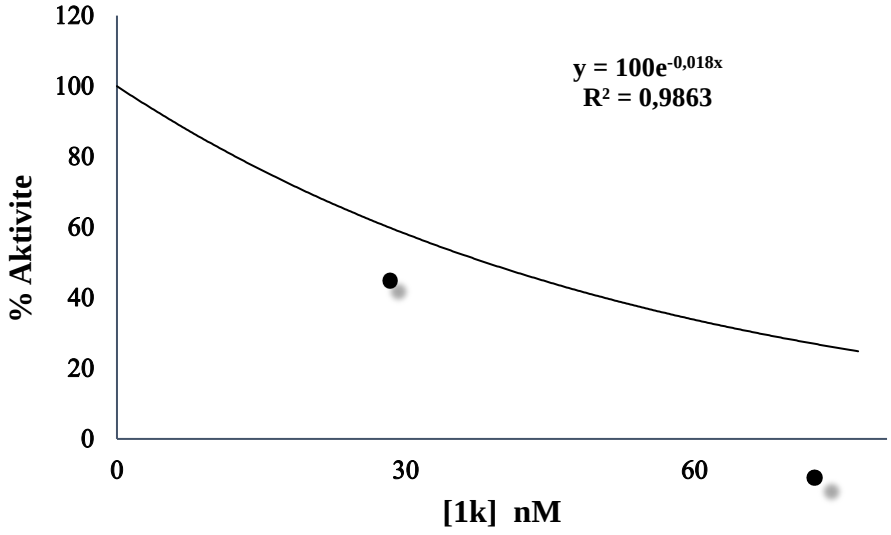
Tablo 3.3. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin kimyasal isimleri ve kodları.

Kodu	Bileşiğin Adı
1a	1-Metilindol-2-karboksaldehit fenil hidrazin
1b	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2-florofenil) hidrazin
1c	1-Metilindol-2-karboksaldehit (3-florofenil) hidrazin
1d	1-Metilindol-2-karboksaldehit (4-florofenil) hidrazin
1e	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,4-diflorofenil) hidrazin
1f	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,5-diflorofenil) hidrazin
1g	1-Metilindol-2-karboksaldehit (3,5-diflorofenil) hidrazin
1h	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2-klorofenil) hidrazin
1i	1-Metilindol-2-karboksaldehit (3-klorofenil) hidrazin
1j	1-Metilindol-2-karboksaldehit (4-klorofenil) hidrazin
1k	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,4-diklorofenil) hidrazin
1l	1-Metilindol-2-karboksaldehit (3,4-diklorofenil) hidrazin
1m	1-Metilindol-2-karboksaldehit (3,5-diklorofenil) hidrazin
1n	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2-bromofenil) hidrazin
1p	1-Metilindol-2-karboksaldehit (4-bromofenil) hidrazin
1q	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,4-dimetil fenil) hidrazin
1r	1-Metilindol-2-karboksaldehit (2,3-dimetil fenil) hidrazin
1s	1-Metilindol-2-karboksaldehit hidrazon
1t	1-Metilindol-2-karboksaldehit izonikotinoilhidrazon

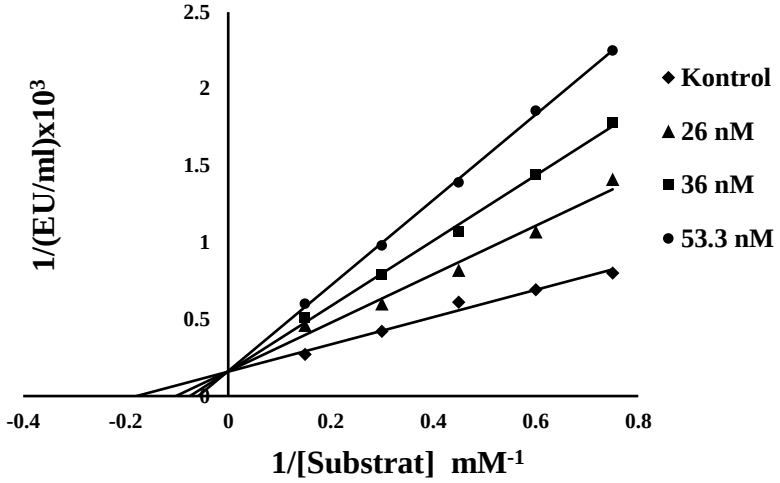
4. BULGULAR

4.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (CA-I ve CA-II) ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

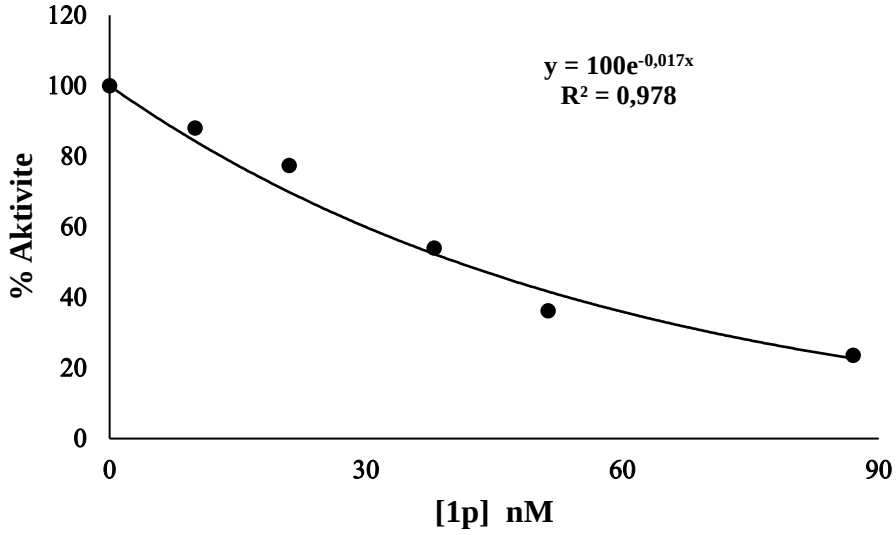
Çalışmada kullanılan indol türevi schiff bazı bileşiklerinin (1a-1t) hCA-I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri belirlendi ve nanomolar düzeyde olan bu inhibisyonların her bir izoenzimi için IC_{50} değeri ile K_i sabitleri hesaplandı. Bu bileşiklerinin enzimleri önemli ölçüde inhibe ettiği gözlendi. Çalışmamızda IC_{50} ve K_i değerleri hCA-I izoenzimi için sırasıyla 38.50-231.05 nM ve 36.18 ± 3.07- 224.29 ± 5.78 nM aralığında olduğu belirlendi. Aynı parametreler hCA-II izoenzimi için 33.01-216.28 nM ve 31.30 ± 2.63-201.64 ± 7.25 nM aralığında hesaplandı (Tablo 4.1). Asetazolamit (AAZ) İnsan hCA - I ve hCA-II izoenzimleri için pozitif kontrol olarak kullanıldı. hCA- I için en iyi sonuç veren 1k ve 1p iken; (Şekil 4.1-4.4; Tablo 4.1) CA-II için en iyi sonuç veren 1 p idi (Şekil 4.5 ve 4.6, Tablo 4.2).



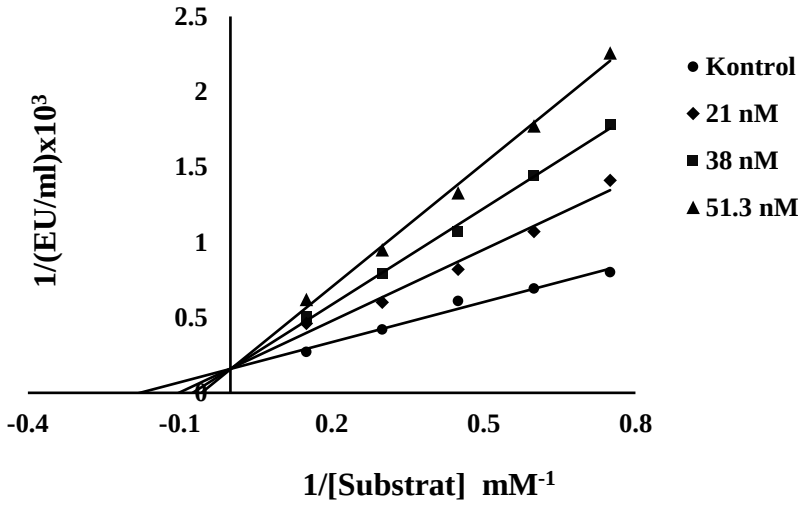
Şekil 4.1. 1 k bileşiğin hCA-I için çizilen IC_{50} grafiği



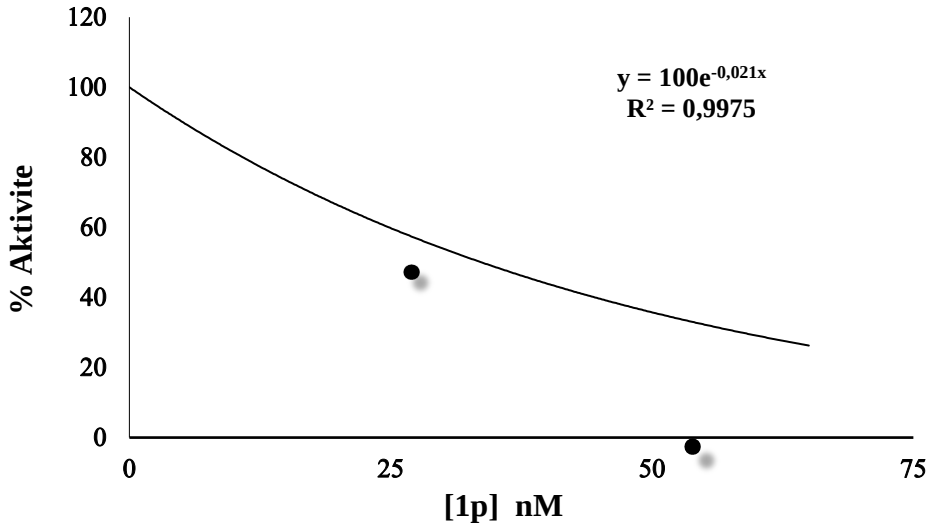
Şekil 4.2. 1k bileşiğinin hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



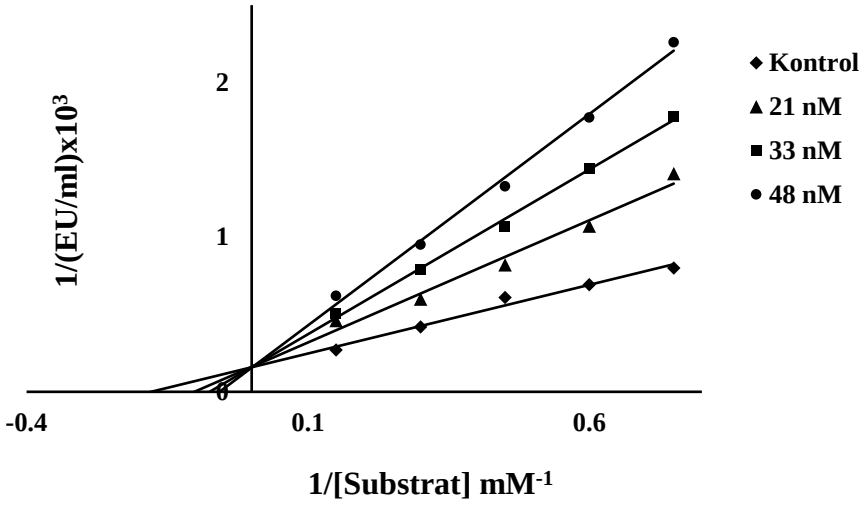
Şekil 4.3. 1 p bileşiğin hCA-I için çizilen IC_{50} grafiği



Şekil 4.4. 1p bileşiğinin hCA-I izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.5. 1 p bileşiğin hCA- II için çizilen IC_{50} grafiği



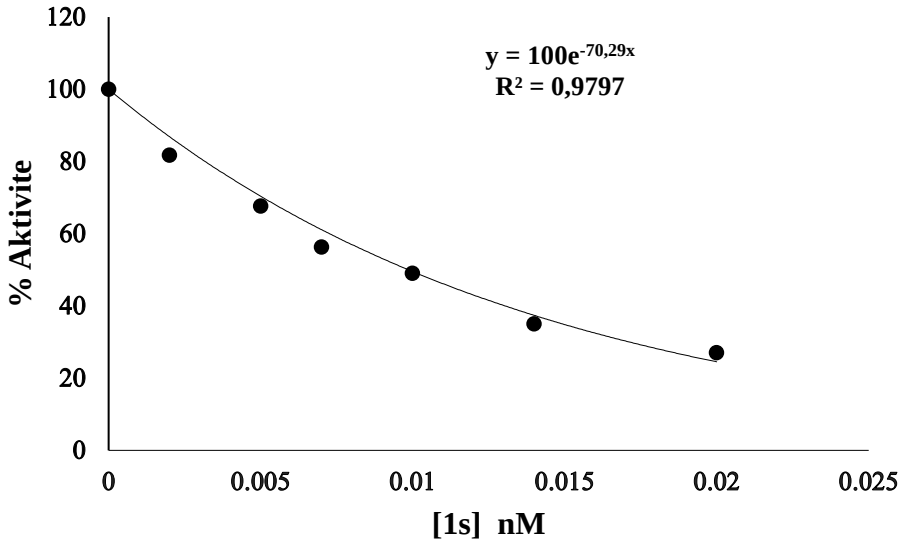
Şekil 4.6. 1p bileşiğinin hCA-II izoenzimi için çizilen Lineweaver-Burk grafiği

Tablo 4.1. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin (1a-1t) hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için belirlenen IC_{50} ve K_i değerleri

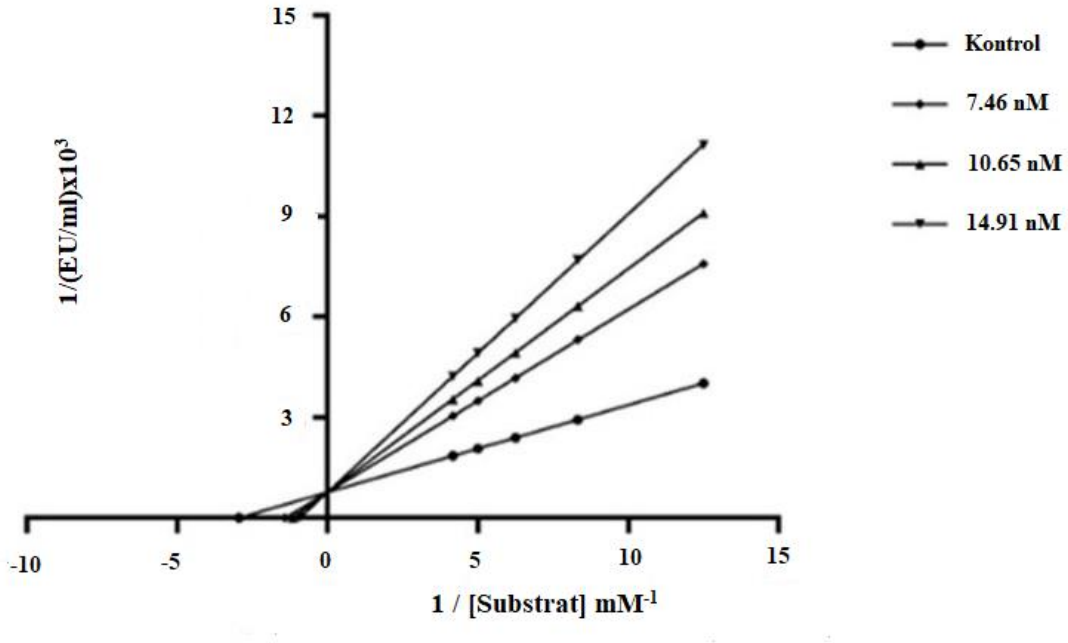
Bileşikler	IC_{50} (nM)				K_i (nM)	
	hCA-I	R^2	hCA-II	R^2	hCA-I	hCA-II
1a	77.02	0.970	62.25	0.987	64.18 ± 5.30	66.17 ± 6.12
1b	73.14	0.981	52.05	0.985	61.29 ± 4.44	49.83 ± 5.27
1c	69.31	0.986	58.26	0.989	49.43 ± 3.03	53.88 ± 4.14
1d	80.37	0.997	67.43	0.994	72.18 ± 3.45	61.81 ± 3.48
1e	173.29	0.969	15.17	0.981	159.07 ± 9.01	145.45 ± 8.51
1f	89.55	0.996	78.80	0.987	80.60 ± 3.90	59.70 ± 5.10
1g	115.52	0.988	94.20	0.993	111.20 ± 2.50	86.70 ± 3.20
1h	81.78	0.989	74.50	0.986	84.80 ± 1.97	69.30 ± 5.16
1i	86.64	0.998	82.26	0.984	77.24 ± 2.90	74.64 ± 3.16
1j	69.32	0.973	54.63	0.987	57.45 ± 2.17	43.97 ± 1.77
1k	38.50	0.986	35.32	0.983	36.18 ± 3.07	37.25 ± 3.16
1l	53.32	0.980	41.29	0.969	49.25 ± 2.13	42.63 ± 1.68
1m	99.02	0.972	83.46	0.975	87.23 ± 4.13	79.26 ± 3.68
1n	63.01	0.967	49.68	0.987	61.29 ± 1.83	44.98 ± 2.72
1p	40.77	0.978	33.01	0.998	38.24 ± 1.13	31.30 ± 2.63
1q	167.53	0.974	143.69	0.968	158.64 ± 3.57	141.26 ± 2.29
1r	202.67	0.981	185.39	0.979	197.25 ± 4.71	177.69 ± 4.79
1s	231.05	0.983	216.28	0.968	224.29 ± 5.78	201.64 ± 7.25
1t	57.76	0.991	51.29	0.981	52.67 ± 2.78	49.87 ± 3.12
Acetazolamide (AAZ)	61.29	0.982	39.48	0.972	47.62 ± 4.11	32.22 ± 3.25

4.2. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

Asetilkolinesteraz enzimi üzerine indol türevi schiff bazı bileşikleri üzerine etkisi araştırıldı. Aktivite ölçümü 3 dakika boyunca 412 nm'de absorbans ölçümü yapılarak gerçekleştirildi. Aktivite (%)-[I. grafiği çizmek için 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda ölçüm yapıldı. K_i için ayrıca 3 ayrı inhibitör konsantrasyonu seçilip, 5 ayrı substrat konsantrasyonunda (0.08, 0.12, 0.16, 0.2, 0.24 mM) çalışıldı. Çizilen grafiklerden IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı (Şekil 4.7-4.8; Tablo 4.2).



Şekil 4.7. 1s molekülünün AChE için çizilen IC_{50} grafiği



Şekil 4.8. 1s molekülünün AChE enzimi için çizilen Lineweaver-burk grafiği

Tablo 4.2. İndol türevi schiff bazı bileşiklerinin (1a-1t) AChE için belirlenen IC_{50} ve K_i değerleri

Madde ID	IC_{50} (nM)	R^2	K_i (nM)	R^2	İnhibisyon tipi
1a	46.02	0.995	18.78 ± 1.30	0.9838	Yarışmasız
1b	35.14	0.983	21.14 ± 1.96	0.9586	Yarışmasız
1c	31.31	0.992	12.91 ± 0.69	0.9883	Yarışmasız
1d	34.37	0.974	18.55 ± 0.56	0.9953	Yarışmasız
1e	78.29	0.998	110.30 ± 9.26	0.9647	Yarışmasız
1f	133.55	0.993	94.45 ± 5.05	0.9864	Yarışmasız
1g	45.42	0.988	80.94 ± 5.92	0.9761	Yarışmasız
1h	135.90	0.989	71.46 ± 5.94	0.9699	Yarışmasız
1i	31.84	0.980	27.50 ± 4.38	0.9530	Yarışmalı
1j	27.42	0.988	19.09 ± 2.18	0.9778	Yarışmalı
1k	19.50	0.982	18.96 ± 1.00	0.9865	Yarışmasız
1l	36.72	0.994	26.49 ± 1.31	0.9881	Yarışmasız
1m	94.62	0.985	66.47 ± 5.31	0.9705	Yarışmasız
1n	31.71	0.993	60.24 ± 2.03	09955	Yarışmasız
1p	16.17	0.988	36.4 ± 3.640	0.9667	Yarışmasız
1q	41.33	0.984	105.80 ± 5.38	0.9917	Yarışmasız
1r	74.87	0.983	105.20 ± 6.66	0.9810	Yarışmasız
1s	9.90	0.991	6.82 ± 0.72	0.9823	Yarışmalı
1t	31.16	0.987	25.64 ± 1.38	0.9945	Yarışmalı
Takrin	14,29	0.995	10.86 ± 0.44	0.9974	Yarışmalı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, hCA-I ve II' nin yanı sıra AChE'nin inhibisyonu için yeni indol türevi Schiff bazı bileşiklerinin etkileri araştırıldı. Referans inhibitör olarak hCA-I ve II için asetazolamid (AAZ) ve AChE için takrin (THA) kullanıldı.

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin ve karbonik anhidraz aktivatörlerinin sentezi üzerine yapılan çalışmalar son zamanlarda hızla artmıştır. Bu nedenle birçok enzim inhibitörü sentezlenmiş ve glokom tedavisinde birincil ilaç olarak CA inhibitörleri kullanılmıştır. Glokomanın yanı sıra halen kliniklerde antitümör, analjezik, epilepsi, antiülser, diüretik, antibiyotik ve nörolojik hastalık ilaçları olarak kullanılmaktadır (52).

Schiff bazları ve türevleri birçok çalışmada araştırılmış ve antikonvülsan (53) antiproliferatif (54), antikanser (55), sitotoksik (56) antifungal ve diğer aktiviteler (57) gibi çeşitli biyolojik aktivitelerle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada indol türevi Schiff bazı bileşiklerinin insan eritrositlerinden saflaştırılan CA-I ve II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisinin olup olmadığını araştırdık.

CA-I, indol türevi Schiff bazı bileşikleri (**1a-1t**) tarafından güçlü bir şekilde inhibe edildi. Bu bileşikler, düşük nanomolar aralıkta K_i değerleri gösterdi (36.18 ± 3.07 nM ila 224.29 ± 5.78 nM arasında değişen K_i değerleri). İndol türevi Schiff bazı bileşiklerinin K_i değerlerinin sırası **1k** (K_i: 36.18 ± 3.07 nM) > **1p** (K_i: 38.24 ± 1.13 nM) > **1l** (K_i: 49.25 ± 2.13 nM) > **1c** (K_i: 49.43 ± 3.03) idi. nM) > **1t** (K_i: 52.67 ± 2.78 nM) > **1j** (K_i: 57.45 ± 2.17 nM) > **1n** (K_i: 61.29 ± 1.83 nM) > **1b** (K_i: 61.29 ± 4.44 nM) > **1a** (K_i: 64.18 ± 5.30 nM) > **1d** (K_i: 72.18 ± 3.45 nM) > **1i** (K_i: 77.24 ± 2.90 nM) > **1f** (K_i: 80.60 ± 3.90 nM) > **1h** (K_i: 84.80 ± 1.97 nM) > **1m** (K_i: 87.23 ± 4.13 nM) > **1g** (K_i: 111.20 ± 2.50 nM) > **1q** (K_i: 158.64 ± 3.57 nM) > **1e** (K_i: 159.07 ± 9.01 nM)

> **1r** (K_i: 197.25 ± 4.71 nM) > **1s** (K_i: 224.29 ± 5.78) nM olarak belirlendi. Bileşik 1k, standart bir ilaç olan AAZ'e kıyasla hCA-I'e karşı en iyi inhibisyon profilini gösterdi (K_i: 47.62 ± 4.11 nM) (Tablo 4.1). Öte yandan, en az etkili bileşik 224,29 ± 5,78 nM K_i ile **1s** idi.

Fizyolojik olarak en bol bulunan sitozolik izoenzim hCA-II, 31.30 ± 2.63-201.64 ± 7.25 nM K_i değeri aralığında indol türevi Schiff bazı bileşikleri tarafından inhibe edildi. İndol türevi Schiff bazı bileşiklerinin K_i değerlerinin sırası **1p** (K_i: 31.30 ± 2.63 nM) > **1k** K_i (: 37.25 ± 3.16 nM) > **1l** (K_i: 42.63 ± 1.68 nM) > **1j** (K_i: 43.97 ± 1.77) idi. nM) > **1n** (K_i: 44.98 ± 2.72 nM) > **1b** (K_i: 49.83 ± 5.27 nM) > **1t** (K_i: 49.87 ± 3.12 nM) > **1c** (K_i: 53.88 ± 4.14 nM) > **1f** (K_i: 59.70 ± 5.10 nM) > **1d** (K_i: 61.81 ± 3.48 nM) > 1a (K_i: 66.17 ± 6.12 nM) > **1s** (K_i: 69.30 ± 5.16 nM) > **1i** (K_i: 74.64 ± 3.16 nM) > 1m (K_i: 79.26 ± 3.68) nM) > **1g** (K_i: 86.70 ± 3.20 nM) > **1q** (K_i: 141.26 ± 2.29 nM) > 1e (K_i: 145.45 ± 8.51 nM) > **1r** (K_i: 177.69 ± 4.79 nM) > **1s** (K_i: 201.64 ± 7.25 nM) olarak belirlendi. **1p**, standart bir ilaç olan AAZ'e kıyasla hCA-II'ye karşı en iyi inhibisyon profilini gösterdi (K_i: 32.22 ± 3.25 nM) (Tablo 4.1). Öte yandan, en az etkili bileşik, 201.64 ± 7.25 nM K_i ile **1s** idi.

Çalışmamızın diğer aşamasında, indol türevi Schiff baz bileşiklerinin AChE enzimi üzerindeki *in vitro* etkilerini araştırdık. Bazı çalışmalar, AChE inhibisyonuna bağlı olarak artan asetilkolin seviyesinin Alzheimer hastalığının erken evrelerinde bilişsel açığı iyileştirebileceğini göstermiştir. Kolinerjik eksikliğin klinik tablo ile yakın ilişkisi nedeniyle, asetilkolinin sinaptik aralıkta daha uzun süre tutulması amacı günümüzde hastalığın semptomatik tedavisinde en çok kullanılan stratejidir. Bu amaçla daha çok kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır (58).

Beyindeki kolinerjik sistemin bozulması ile hafıza arasındaki ilişkiden yola çıkarak tedavide en etkili ilaç grubu olarak asetilkolinesteraz inhibitörleri (antikolinesterazlar) kullanılmaktadır. Antikolinesteraz, merkezi sinir sisteminin önemli bir nöromodülatörü olan asetilkolini hidrolize eder. Asetilkolinesteraz inhibitörleri ise asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederek asetilkolin miktarında azalmaya neden olarak hastanın davranış bozukluklarında belirgin bir gerileme sağlar (59,60).

Asetilkolinesteraz inhibitörlerinin sentezi ile ilgili çalışmalar son zamanlarda hızla artmıştır. Bu nedenle, birçok enzim inhibitörü türü sentezlenmiş ve Parkinson, Alzheimer ve glokom hastalıklarının tedavisinde birincil ilaç olarak kullanılmıştır (30,61).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin spesifik inhibitörleri olan sülfonamidlerin, Alzheimer hastalığının iyi bilinen bir terapötik hedefi olan AChE enzimi üzerinde önemli bir inhibitör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, karbonik anhidraz enzimini nanomolar düzeyde inhibe eden indol türevi Schiff bazı bileşiklerinin AChE enzimi üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Bileşiklerin (**1a-1t**) K_i değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Tüm bileşikler; Takrin (THA) (K_i: 10.86 ± 0.44 nM) ile karşılaştırıldığında 6.82 ± 0.72 ila 110.30 ± 9.26 nM arasında değişen K_i değerleri ile AChE'ye karşı nanomolar konsantrasyonlarda tatmin edici inhibisyon profili göstermiştir. İndol türevi Schiff bazı bileşiklerinin K_i değerlerinin sırası **1s** (K_i: 6.82 ± 0.72 nM) > **1c** (K_i: 12.91 ± 0.69 nM) > **1d** (K_i: 18.55 ± 0) idi. ,56 nM) > **1a** (K_i: 18.78 ± 1,30 nM) > **1k** (K_i: 18.96 ± 1.00 nM) > **1j** (K_i: 19.09 ± 2.18 nM) > **1b** (K_i: 21.14 ± 1.96 nM) > **1t** (K_i: 25.64 ± 1.38 nM) > **1l** (K_i: 26.49 ± 1.31 nM) > **1i** (K_i: 27.50 ± 4.38 nM) > **1p** (K_i: 36.84 ± 3.640 nM) > **1n** (K_i: 60.24 ± 2.03 nM) > **1m** (K_i: 66.47 ± 5.31

nM) > **1h** (K_i: 71.46 ± 5.94 nM) > **1g** (K_i: 80.94 ± 5.92 nM) > **1f** (K_i: 94.45 ± 5.05 nM) > **1r** (K_i: 105.20 ± 6.66 nM) > **1q** (K_i: 105.80 ± 5.38 nM) > **1e** (K_i: 110.30 ± 9.26 nM) olarak bulundu.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

hCA-I ve hCA-II'nin inhibisyon tipinin araştırılması

Çalışmamızda indol türevi Schiff bazı bileşiklerinin hCA-I ve II enzimlerine karşı inhibitör etkisi IC_{50} ve K_i değerleri ile belirlendi. $IC5_0$ hesaplanırken önce substrat konsantrasyonları sabit tutularak çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında aktivite yüzdesi bulundu. Daha sonra ise grafiksel olarak %50 inhibisyon sağlayan inhibitör konsantrasyonu belirlenerek IC_{50} hesaplanması tamamlandı. Her bileşiğin K_i değerleri, üç farklı inhibitör konsantrasyonu seçilerek belirlendi. K_i değerlerinin ve inhibisyon tipinin belirlenmesi için Lineweaver-Burk eğrileri çizildi. hCA-I ve hCA-II için bulunan IC_{50} ve K_i değerleri Tablo 4.1.'de verildi. IC_{50} değerlerinin hCA-I için 38.50-231.05 nM ve hCA-II için 33.01-216.28 nM aralığında olduğu belirlendi. K_i değerleri hCA-I için 36.18 ± 3.07-224.29 ± 5.78 nM, hCA -II için 31.30 ± 2.63-201.64 ± 7.25 nM aralığında bulundu. Sentezlenen bileşikler arasında, 1k, 1l, 1p ve 1t, hCA-I için güçlü bir inhibitör etki gösterdi ve 1k ve 1p, hCA-II için güçlü bir inhibitör etki gösterdi.

AChE'nin inhibisyon tipinin araştırılması

İndol türevi Schiff bazı bileşiklerinin AChE üzerindeki inhibisyon etkisini belirlemek için IC_{50} ve K_i değerleri belirlendi. IC_{50}'nin belirlenmesinde ilk önce, substrat konsantrasyonları sabit tutuldu ve buna bağlı olarak çeşitli inhibitör konsantrasyonlarında aktivite yüzdesi belirlendi. Daha sonra da grafiksel olarak %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu belirlenerek IC_{50} hesaplandı. Her bileşiğin K_i değerleri, inhibisyon gösteren üç farklı bileşik konsantrasyonu seçilerek belirlendi. Lineweaver-Burk eğrileri ile K_i değerleri ve bileşiğin inhibisyon tipi belirlendi. AChE enzimi için elde edilen IC_{50} ve K_i değerleri Tablo 4.2'de verilmiştir.

IC_{50} değerlerinin 9.90-135.90 nM aralığında olduğu belirlendi. K_i değerlerinin ise 6.82 ± 0.72-110.30 ± 9.26 nM aralığında olduğu belirlendi. Sentezlenen bileşikler arasında 1s, AChE için güçlü bir inhibitör etki gösterdi.

AChE inhibisyonu Alzheimer hastalığının tedavisinde önemli bir görev olduğundan, bu bileşiklerin nörodejeneratif bozukluklara yönelik yeni ilaçların geliştirilmesi için ilginç bir geleceği olabilir.

KAYNAKLAR

1. Akincioğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, I. ve Supuran, C. T. (2013) Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors, *Bioorg Med Chem*, 21(6), 1379–1385.

2. Andersson, B., Nyman, P. O. ve Strid, L. (1972) Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase B., *Biochem Biophys Res Commun*, *48*(3), 670–677.

3. Armstrong, J. M., Myers, D. V., Verpoorte, J. A. ve Edsall, J. T. (1966) Purification and Properties of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases, *J Biol Chem*, 241(21), 5137–5149.

4. Barak, D., Ordentlich, §arie, Bromberg, A., Kronman, C., Marcus, D., Lazar, A. ve diğerleri. (1995) Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase Activity by Peripheral Ligands Involves a Conformational Transition of the Anionic Subsite'1, *Biochemistry*, *34*, 15444–15452.

5. Birks, J. S. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, (1).

6. Boriack-Sjodin, P. A., Zeitlin, S., Christianson, D. W., Chen, H.-H., Crenshaw, L., Gross, S., Dantanarayana, A., Delgado, P., May, J. A., ve Dean, T. (1998) Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II, *Protein Sci*, 7(12), 2483–2489.

7. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72(1–2), 248–254.

8. Cabiscol, E., ve Levine, R. L. (1996). The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation, *Proc Natl Acad Sci*, 93(9), 4170–4174.

9. Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ., ve Ekinci, D. (2008) The effect of ethanol

on erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes activity: An *in vitro* and *in vivo* study, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 23(2), 266–270.

10. Crowther, R. J., Meedel, T. H., ve Whittaker, J. R. (1990) Differentiation of tropomyosin-containing myofibrils in cleavage-arrested ascidian zygotes expressing acetylcholinesterase, *Development*, 109(4), 953–959.

11. Darreh-Shori, T., ve Soininen, H. (2010) Effects of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease: a review of recent clinical studies. Current Alzheimer, *Research*, 7(1), 67-73.

12. Engberg, P., Millqvist, E., Pohl, G., ve Lindskog, S. (1985) Purification and some properties of carbonic anhydrase from bovine skeletal muscle, *Arch Biochem Biophys*, 241(2), 628–638.

13. Köksal, Z., Alım, Z., Bayrak, S., Gülçin, İ., ve Özdemir, H. (2019). Investigation of the effects of some sulfonamides on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. *J Biochem Mol Toxicol*, 33(5), e22300.

14. Gilmour, K. M. (2010) Perspectives on carbonic anhydrase, *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, 157(3), 193–197.

15. Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D. K., ve Lahiri, D. K. (2001) A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase, *Curr Med Res Opin*, 17(3), 159–165.

16. Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., Axelsen, P. H., Silman, I., ve Sussman, J. L. (1993) Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase, *Proc Natl Acad Sci*, 90(19), 9031–9035.

17. Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., Lanoue, K. F., ve Lynch, C. J. (1996) Differentiation-dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes, *The FASEB Journal*, 10(4),

481–490.

18. Hunaiti, A. A., ve Soud, M. (2000) Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood, *Sci Total Environ*, 248(1), 45–50.

19. Innocenti, A., Scozzafava, A., ve Supuran, C. T. (2009) Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isoforms I, II, III, VII and XIII with less investigated inorganic anions, *Bioorganic Med Chem Lett*, 19(7), 1855–1857.

20. Kannan, K. K., Notstrand, B., Fridborg, K., Lövgren, S., Ohlsson, A., ve Petef, M. (1975) Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase B. Three-dimensional structure at a nominal 2.2-A resolution, *Proc Natl Acad Sci*, 72(1), 51–55.

21. Kannan, K. K., Ramanadham, M., ve Jones, T. A. (1984) Structure, Refinement, and Function of Carbonic Anhydrase Isozymes: Refinement of Human Carbonic Anhydrase I, *Ann N Y Acad Sci*, 429(1), 49–60.

22. 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, *Bioorg Med Chem*, 14(22), 7482–7489.

23. Keha, E. E., and Ö. İ. Küfrevioğlu. Biyokimya, Aktif Yayınevi, 5. Baskı. Sirkeci/İstanbul (2007).

24. Küçükgüzel, I., Güniz Küçükgüzel, Ş., Rollas, S., Ötük-Saniş, G., Özdemir, O., Bayrak, I., 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. *Il Farmaco*, 59(11), 893–901.

25. Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C. H., ve Tashian, R. E. (1996) Expression of Mouse Carbonic Anhydrase VII inE. coliand Demonstration of Its CO_2 Hydrase Activity, *Biochem Biophys Res Commun*, 226(1), 268–272.

26. Lesburg, C. A., ve Christianson, D. W. (1995) X-ray Crystallographic Studies of Engineered Hydrogen Bond Networks in a Protein-Zinc Binding Site, *J Am Chem Soc*, 117, 6838–6844. Retrieved from https://pubs.acs.org/sharingguidelines

27. Lıljas, A., Kannan, K. K., Bergstén, P.-C., Waara, I., Frıdborg, K., Strandberg, B., Carlbom, U., Järup, L., Lövgren, S., ve Petef, M. (1972) Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase C. , *Nat New Biol*, 235(57), 131–137.

28. Lin, K.-T. D., ve Deutsch, H. F. (1974) Human Carbonic Anhydrases: Xıı. The Complete Prımary Structure Of The C Isozyme, *J Biol Chem*, 249(8), 2329–2337.

29. Lindskog, S. (1997) Structure and mechanism of carbonic anhydrase, *Pharmacol Ther*, 74(1), 1–20.

30. Jokanović, M., ve Maksimović, M. (1997) Abnormal cholinesterase activity: understanding and interpretation, *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 35(1), 11–16.

31. Madhu, A., ve Chakraborty, J. N. (2017) Developments in application of enzymes for textile processing, *J Clean Prod*, 145, 114–133.

32. Mallis, R. J., Poland, B. W., Chatterjee, T. K., Fisher, R. A., Darmawan, S., Honzatko, R. B., ve Thomas, J. A. (2000) Crystal structure of S-glutathiolated carbonic anhydrase III, *FEBS Letters*, 482(3), 237–241.

33. Maren, T. H., ve Conroy, C. W. (1993) A new class of carbonic anhydrase inhibitor, *J Biol Chem*, 268(35), 26233–26239.

34. Masson, P., Carletti, E., ve Nachon, F. (2009) Structure, Activities and Biomedical Applications of Human Butyrylcholinesterase, *Protein Pept Lett*, 16(10), 1215–1224.

35. Mesulam, M., Guillozet, A., Shaw, P., ve Quinn, B. (2002) Widely Spread Butyrylcholinesterase Can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain, *Neurobiol Dis*, 9(1), 88–93.

36. Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G., ve Lockridge,

O. (2002) Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine, *Neuroscience*, 110(4), 627–639.

37. Tarafder, M. T., Kasbollah, A., Saravanan, N., Crouse, K. A., ve Ali, A. M. (2002) S-methyldithiocarbazate and its Schiff bases: evaluation of bondings and biological properties, *J Biochem Mol Biol Biophys*, 6(2), 85–91.

38. Nelson, David L., and Michael M. Cox. (2008), Absolute Ultimate Guide for Lehninger Principles of Biochemistry.

39. Nordberg, A., Darreh-Shori, T., Peskind, E., Soininen, H., Mousavi, M., Eagle, G., ve Lane, R. (2009) Different Cholinesterase Inhibitor Effects on CSF Cholinesterases in Alzheimer Patients, *Curr Alzheimer Res,* 6(1), 4–14.

40. Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X. L., ve Sly, W. S. (1995) Carbonic anhydrase IV: Role of removal of C-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme activity, *Arch Biochem Biophys*, 320(2), 315–322.

41. Pignatello, R., Panico, A., Mazzone, P., Pinizzotto, M., Garozzo, A., ve Furneri, P. M. (1994) Schiff bases of N-hydroxy-N′-aminoguanidines as antiviral, antibacterial and anticancer agents, *Eur J Med Chem*, 29(10), 781–785.

42. Pocker, Y., ve Beug, M. W. (1972) Kinetic studies of bovine carbonic anhydrase catalyzed hydrolyses of p-substituted phenyl esters, *Biochemistry*, 11(5), 698-707.

43. Pohanka, M. (2011) Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc*, 155(3).

44. Renzi, G., Scozzafava, A., ve Supuran, C. T. (2000) Carbonic anhydrase inhibitors: topical sulfonamide antiglaucoma agents incorporating secondary amine moieties, *Bioorganic Med Chem Lett*, 10(7), 673–676.

45. Ozturk Sarikaya, S. B. (2015) Acethylcholinesterase inhibitory potential and

antioxidant properties of pyrogallol, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(5), 761-766.

46. Sly, W. S., ve Hu, P. Y. (2003) Human carbonıc anhydrases and carbonıc anhydrase defıcıencıes, *Annurev Bi*, 64, 375–401.

47. Soreq, H., ve Seidman, S. (2001) Acetylcholinesterase new roles for an old actor, *Nat. Rev Neurosci*, 2:4, 2(4), 294–302.

48. Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of protein, *Meth Enzymol*, 182(C), 50–68.

49. Supuran, C., chemistry, A. S.-C. medicinal, ve, undefined. (n.d.). (2001) Carbonic anhydrase inhibitors, *Ingentaconnect.com*. Retrieved from https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmciema/2001/00000001/00000001/art00006

50. Supuran, C. T. (2010a) Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms , *Mol Divers*, 15:2, 15(2), 305–316.

51. Suzen S., Tekiner-Gulbas B., Shirinzadeh H., Uslu D., Gurer-Orhan H., Gumustas M., Ozkan S.A. (2012) Antioxidant activity of indole-based melatonin analogues in erythrocytes and their voltammetric characterization *J Enzyme Inhib Med Chem*, 1–13

52. Supuran, C. T. (2010b) Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms , *Mol Divers*, 15:2, 15(2), 305–316.

53. Sussman, J., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., ve Silman, I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein, *Science*, 253(5022), 872–879.

54. Thacker, Paul D. Surprising discovery with Alzheimer's medication. *Drug Discov*, 8.9 (2003): 379-380.

55. Tougu, V. (2005) Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition, *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 1(2), 155–170.

56. Tripathi, A., ve Srivastava, U. C. (2008) Acetylcholınesterase :a versatıle enzyme

of nervous system, *Ann Neurosci*, 15.

57. Tsukada, K., Oura, H., Nakashima, S., ve Hayasaki, N. (1968) Adaptive response of tryptophan pyrrolase and tyrosine transaminase in rat liver after partial hepatectomy and laparotomy, *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 165(2), 218–224.

58. Velan, B., Kronman, C., Ordentlich, A., Flashner, Y., Leitner, M., Cohen, S., ve Shafferman, A. (1993) N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis, *Biochem J*, 296(3), 649–656.

59. Verpoorte, J. A., Mehta, S., ve Edsall, J. T. (1967) Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C, *J Biol Chem*, 242(18), 4221–4229.

60. Vicini, P., Geronikaki, A., Incerti, M., Busonera, B., Poni, G., Cabras, C. A., ve La Colla, P. (2003) Synthesis and biological evaluation of benzod. isothiazole, benzothiazole and thiazole Schiff bases, *Bioorg Med Chem*, 11(22), 4785–4789.

61. Zubenko, G. S., Marquis, J. K., Volicer, L., Direnfeld, L. K., Langlais, P. J., ve Nixon, R. A. (1986) Cerebrospinal fluid levels of angiotensin- converting enzyme, acetylcholinesterase, and dopamine metabolites in dementia associated with Alzheimer's disease and Parkinson's disease: A correlative study, *Biol Psychiatry*, 21(14), 1365–1381.