



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BERGAMOTTİNİN KARBONİK ANHİDRAZ
I VE II İZOENZİMLERİNİN AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe TEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17/07/2025

Ayşe TEKİN

İthaf

Bu yüksek lisans tezimi, her zaman yanımda olan aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca insani ve ahlaki değerlerini kendime örnek edindiğim; tezimin her aşamasında desteğini benden esirgemeyen, tüm bu süreç boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Tez sürecim boyunca çalışmalarımıza bilgi ve tecrübeleriyle destek veren Prof. Dr. Selim DEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Bayram TORAMAN, Dr. Öğr. Üyesi Zekeriya DÜZGÜN, Araş. Gör. Dr. Ertuğrul YİĞİT, Uzm. Dyt. Seçkin KAYA ve Arş. Gör. Fikret YANAR'a,

Eğitim sürem içerisinde emekli olan hocamız Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER'e,

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerinden çokça faydalandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Birgül VANİZOR KURAL, Prof. Dr. Asım ÖREM, Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN, Doç. Dr. Serap ÖZER YAMAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Lisansüstü eğitim sürecimde her koşulda yanımda olup destek olan Uzm. Dyt. Ceren PEKŞEN, Uzm. Dyt. Sera ŞAHİN ve Araş. Gör. Dr. Şeniz ERDEM'e,

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan tüm araştırma görevlisi, yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Bu sürece başlamamda ve sürdürmemde bana destek olan, yol gösteren azmi ve çalışma şekli ile örnek olan mesafelere rağmen varlığını hep yanımda hissettiğim sevgili dostum Uzm. Dyt. Berfin SARUHAN'a,

Bu süreçte desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Ayşe TEKİN

Bu tez çalışması KTÜ BAP TYL-2024-11140 numaralı proje bütçesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

ix

ŞEKİLLER DİZİNİ

xi

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xiii

ÖZET

xv

ABSTRACT

xvi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Enzimler

3

2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

4

2.1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

4

2.2. Karbonik Anhidraz

9

2.2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı ve Katalitik Özellikleri

10

2.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve İzoenzimlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

12

2.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

16

2.2.3.1. Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

16

2.2.3.2. Karbonik Anhidraz Aktivasyonu

21

2.2.4. Karbonik Anhidraz I İzoenzimi

23

2.2.5. Karbonik Anhidraz II İzoenzimi

24

2.3. Furanokumarinler

25

2.3.1. Bergamottin

26

3. GEREÇ ve YÖNTEM

28

3.1. Kullanılan Cihazlar, Ekipmanlar ve Malzemeler

28

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

29

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

29

3.4. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayini

31

3.4.1. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Tayini	31
3.4.1.1. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	32
3.4.1.2. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II izoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	32
3.4.1.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde Asetazolamid, L-Histidin ve Bergamottinin Etkisinin Belirlenmesi	33
3.4.2. Karbonik Anhidrazın Hidrataz Aktivitesi Tayini	35
3.4.2.1. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	35
3.4.2.2. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II izoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi	36
3.4.2.3. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Üzerine Asetazolamid, L-Histidin ve Bergamottinin Etkisinin Belirlenmesi	37
3.4.3. Sonuçların İfade Edilmesi ve Karşılaştırma	37
3.5. Moleküler Kenetleme Analizi	38
3.6. Moleküler Dinamik Simülasyon	38
4. BULGULAR	39
4.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II Enzim Konsantrasyonu Aralığının Belirlenmesi	39
4.2. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	41
4.3. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine Asetazolamidin Etkisinin Belirlenmesi	42
4.4. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine L-Histidin Etkisinin Belirlenmesi	45
4.5. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine Bergamottinin Etkisinin Belirlenmesi	48
4.6. Moleküler Kenetleme Çalışması	50
4.6.1. Karbonik Anhidraz I'in Asetazolamid, L-Histidin ve Bergamottin ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları	50
4.6.2. Karbonik Anhidraz II'nin Asetazolamid, L Histidin ve Bergamottin ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları	51
4.6.3. Karbonik Anhidraz I ve II' nin Bergamottin ile Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları	52

5. TARTIşMA VE SONUÇ	56
6. KAYNAKÇA	63
ÖZGEÇMİş	75



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri ve izoenzimlerinin özellikleri	14
Tablo 2. Klinikte kullanımda olan karbonik anhidraz inhibitörleri	19
Tablo 3. Deneylerde kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri	28
Tablo 4. Deneylerde kullanılacak kimyasalların isimleri, üretici firmaları ve ürün kodları	29
Tablo 5. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı	32
Tablo 6. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonu	33
Tablo 7. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin AZM, HIS ve BGM'nin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonu	34
Tablo 8. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı	35
Tablo 9. İnsan CA I ve CA II izoenziminin kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesi için kullanılacak çözeltilerin miktarları ve konsantrasyonları	36
Tablo 10. Karbonik anhidraz I izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine AZM, HIS ve BGM etkisinin tayini için reaksiyon karışımları	37
Tablo 11. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA I izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri	39
Tablo 12. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA II izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri	40
Tablo 13. <i>p</i> -Nitrofenil asetat substratının farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait esteraz aktivite değerleri	41
Tablo 14. CO ₂ 'nin farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait hidrataz aktivitesi değerleri	41
Tablo 15. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için belirlenen V_{max} ve K_m değerleri	42
Tablo 16. Esteraz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri	43
Tablo 17. Esteraz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri	44

Tablo 18. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri	44
Tablo 19. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenzimin % aktivite değerleri	45
Tablo 20. Esteraz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri	46
Tablo 21. Esteraz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri	47
Tablo 22. Hidrataz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri	47
Tablo 23. Hidrataz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri	47
Tablo 24. Esteraz yöntemiyle BGM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri	48
Tablo 25. Esteraz yöntemiyle BGM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri	48
Tablo 26. Hidrataz yöntemiyle BGM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite tablosu	49
Tablo 27. Hidrataz yöntemiyle BGM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri	49
Tablo 28. CA I ve CA II için moleküler kenetleme analizi ile belirlenen inhibitör ligandın ve bergamottinin bağlanma skorları	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Bir enzimatik reaksiyonun şematik gösterimi	3
Şekil 2. Enzim konsantrasyonunu bir enzimin reaksiyon hızı veya aktivitesi üzerindeki etkisi	5
Şekil 3. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi	5
Şekil 4. Lineweaver-Burk grafiği	6
Şekil 5. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi	7
Şekil 6. pH değişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi	8
Şekil 7. Farklı inhibisyon mekanizmalarının şematik gösterimi; K_i inhibisyon sabiti, I inhibitör	9
Şekil 8. α -Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesi	10
Şekil 9. Karbonik anhidraz enziminin katalitik döngüsü	11
Şekil 10. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları	12
Şekil 11. İnsan karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücrel lokalizasyonları ve göreceli katalitik aktiviteleri	13
Şekil 12. Çinko iyonuna bağlanan CA inhibitörlerinin inhibisyon mekanizması	17
Şekil 13. Klinikte kullanımda olan CA _i ve Faz-1 klinik çalışması devam eden 20 SLC-0111	18
Şekil 14. hCA II aktif bölgesi içindeki fenolün bağlanma modunun şematik gösterimi	20
Şekil 15. CA'ların aktif bölgeye girişini kapatarak inhibe eden bileşikler	20
Şekil 16. Aktif bölgenin dışında CA inhibisyon mekanizması	21
Şekil 17. X-ışını kristalografisi ile belirlenen insan karbonik anhidraz II-aktivatör komplekslerinin gösterimi	22
Şekil 18. hCA I'in üçüncül yapısı	23
Şekil 19. hCA II'nin üçüncül yapısı	24
Şekil 20. BGM'nin kimyasal yapısı	26
Şekil 21. BGM'nin biyosentez yolu	27
Şekil 22. <i>p</i> -nitrofenol asetatın CA tarafından <i>p</i> -nitrofenol ve asetik aside dönüştürülme reaksiyonu	31

Şekil 23. Çalışmada, farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında ölçülen hız (aktivite) değerlerine dayanarak oluşturulan Michaelis-Menten grafiği örneği	33
Şekil 24. A) Enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisinin belirleneceği örnek grafik (IC_{50}), B) Enzim aktivitesi üzerine aktivatör etkisinin belirleneceği örnek grafik (AC_{50})	34
Şekil 25. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimi aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılan çalışma konsantrasyon aralığını belirlemek için çizilen konsantrasyon-aktivite grafiği	40
Şekil 26. Karbonik anhidraz I ve II enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için kullanılan Lineweaver-Burk grafikleri	42
Şekil 27. Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine AZM'nin etkisi	43
Şekil 28. Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine HIS'nin etkisi	46
Şekil 29. Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine BGM'nin etkisi	50
Şekil 30. Karbonik anhidraz I izoenziminin inhibitör, AZM, HIS ve BGM ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri	51
Şekil 31. Karbonik anhidraz II izoenziminin inhibitör, AZM, HIS ve BGM ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri	53
Şekil 32. CA I ile bergamottin etkileşimi	54
Şekil 33. CA II ile bergamottin etkileşimi	55

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AC₅₀	Yarı Aktivasyon Konsantrasyonu
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
AZM	Asetazolamid
b	Işık Yolu
BGM	Bergamottin
CA	Karbonik Anhidraz
CAA	Karbonik Anhidraz Enzimi Aktivatörleri
CA_i	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
CARP	Karbonik Anhidraz İle İlişkili Proteinler
CYP	Sitokrom P450
EA	Enzim Aktivitesi
EAT	Esteraz Tayin Yöntemi
EC	Enzim Komisyonu
ϵ	Molar Absorpsiyon Katsayısı
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
g	Gram
HAT	Hidrataz Tayin Yöntemi
hCA	İnsan Karbonik Anhidraz
HEPES	(Sodium 2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethanesulfonate)
HIS	L – Histidin
IC₅₀	Yarı İnhibisyon Konsantrasyonu
K_A	Aktivasyon Sabiti
kDa	Kilodalton
K_i	İnhibisyon Sabiti
L	Litre
μL	Mikro Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NC-IUBMB

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği
İsimlendirme Komitesi

nM

Nanomolar

***p*-NPA**

para-Nitrofenil Asetat

RMSD

Kök Ortalama Kare Sapması

RMSF

Kök Ortalama Kare Dalgalanması

T

Zaman

Tris

Tris(hidroksimetil)aminometan

U

Ünite

V

Hacim

Simgeler**Å**

Angstrom

 α

Alfa

 β

Beta

 γ

Gama

 δ

Sigma

 ζ

Zita

 η

İta

 θ

Tita

 ι

İota

Formüller**CO₂**

Karbondioksit

H⁺

Hidrojen İyonu

H₂O

Su Molekölü

H₂SO₄

Sülfürik Asit

HCl

Hidroklorik Asit

HCO₃⁻

Bikarbonat İyonu

NaOH

Sodyum Hidroksit

O₂

Oksijen

OH⁻

Hidroksit İyonu

Zn²⁺

Çinko İyonu

ÖZET

Bergamottinin Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Karbonik anhidraz (CA) enzimleri, karbondioksitin (CO_2) hidrasyonunu katalizleyerek fizyolojik pH dengesi, solunum, elektrolit taşınımı gibi temel biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir. CA izoenzimlerinin anormal aktivitesi; kanser, obezite, epilepsi gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmekte olup, bu izoenzimlere özgü yeni inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik araştırmalar güncelliğini korumaktadır.

Bu tez çalışmasında, doğal bir furanokumarin türevi olan bergamottinin (BGM), insan karbonik anhidraz I (hCA I) ve II (hCA II) izoenzimleri üzerindeki olası etkileri esteraz ve hidrataz aktivite tayin yöntemleri ile *in vitro* olarak değerlendirildi; ayrıca moleküler kenetleme (docking) analizleriyle enzim-bileşik etkileşimleri incelendi. Karşılaştırma amacıyla asetazolamid (AZM) ve L-Histidin (HIS) pozitif kontrol olarak kullanıldı. BGM'nin 0–500 μM aralığında hazırlanan farklı konsantrasyonlarıyla yapılan ölçümlerde, her iki enzim izoformunun aktivitesinde anlamlı azalma gözlemlendi. Esteraz aktivitesi sonuçlarına göre, BGM'nin hCA I ve hCA II için IC_{50} değerleri sırasıyla 742.5 μM ve 49.09 μM olarak hesaplandı. Hidrataz aktivite tayininde ise hCA II için IC_{50} değeri 140 μM olarak belirlenirken hCA I üzerinde inhibitör etki gözlenmesine rağmen IC_{50} değeri hesaplanamadı. Moleküler kenetleme analizleri sonucunda, BGM'nin CA I ve II enzimlerine sırasıyla -7.6 kcal/mol ve -8.2 kcal/mol bağlanma skoru ile yüksek afinite gösterdiği belirlendi.

Elde edilen *in vitro* ve *in silico* veriler birlikte değerlendirildiğinde, bergamottinin hCA I ve II izoenzimlerinin aktivitesini inhibe edebilen potansiyel bir doğal inhibitör adayı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aktivatör, Bergamottin, Enzim kinetiği, İnhibitör, Karbonik anhidraz, Moleküler kenetleme

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Bergamotin on the Activity of Carbonic Anhydrase I and II Isoenzymes

Carbonic Anhydrase (CA) enzymes play crucial roles in essential biological processes such as physiological pH balance, respiration, and electrolyte transport by catalyzing the hydration of carbon dioxide (CO₂). Abnormal activity of CA isoenzymes has been associated with various pathologies such as cancer, obesity, and epilepsy, and research into the development of new inhibitors specific to these isoenzymes remains ongoing.

In this thesis, the potential effects of bergamottin (BGM), a natural furanocoumarin derivative, on human carbonic anhydrase I (hCA I) and II (hCA II) isoenzymes were evaluated *in vitro* using esterase and hydrase activity assays; additionally, enzyme-ligand interactions were investigated via molecular docking analyses. For comparison, acetazolamide (AZM) and L-Histidine (HIS) were used as positive controls.

The measurements conducted with various concentrations of BGM (ranging from 0 to 500 μ M) showed a significant decrease in the activity of both enzyme isoforms. According to the esterase activity results, the IC₅₀ values of BGM for hCA I and hCA II were calculated to be 742.5 μ M and 49.09 μ M, respectively. In the hydrase activity assay, an IC₅₀ value of 140 μ M was determined for hCA II, while no IC₅₀ value could be calculated for hCA I despite the inhibitory effect being observed. Molecular docking analysis revealed that BGM showed high affinity for both CA I and CA II enzymes, with binding score of -7.6 kcal/mol and -8.2 kcal/mol, respectively.

When the *in vitro* and *in silico* data were considered together, it was concluded that bergamottin could be a potential natural inhibitor capable of inhibiting the activity of both hCA I and II isoenzymes.

Keywords: Activator, Bergamottin, Carbonic Anhydrase, Enzyme kinetics, Inhibitor, Molecular docking

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Canlı organizmalarda, yaşamın sürdürülebilmesi için her gün trilyonlarca kimyasal reaksiyon meydana gelmektedir. Bu reaksiyonların büyük bir kısmı, biyolojik katalizörler olan enzimler aracılığıyla kontrol edilmekte ve hızlandırılmaktadır (1, 2). Enzimler, aktif bölgeleri aracılığıyla substratlarına yüksek özgüllük göstererek bağlanır ve bu sayede biyokimyasal süreçlerin verimli ve düzenli bir şekilde ilerlemesini sağlarlar (1).

Karbonik anhidraz (CA) enzimleri, karbondioksitin (CO_2) bikarbonat (HCO_3^-) ve protona (H^+) dönüşümünü katalizleyen çinko içeren metaloenzimlerdir. Genetik olarak sekiz farklı CA ailesi tanımlanmış olup, insanlarda α -CA ailesi üyeleri görev yapmaktadır (3). Şu ana kadar insan dokularında farklı lokalizasyonlara sahip 15 CA izoenzimi tanımlanmış ve bu enzimlerin fizyolojik süreçlerde kritik roller üstlendiği gösterilmiştir (4, 5). Özellikle CA I ve CA II izoenzimleri sitozolik yerleşimli olup; pH homeostazı, solunum, iyon dengesi, kemik rezorpsiyonu ve metabolizma gibi işlevlerde yer almaktadırlar. İnsan CA I izoenzimi başlıca eritrositlerde, gözde, gastrointestinal sistemde, edilmekte olup; retinal ve serebral ödem gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmiştir. İnsan CA II izoenzimi ise eritrositlerin yanı sıra göz, böbrek, akciğer, testis, osteoklastlar ve beyinde yaygın şekilde bulunmakta; yüksek irtifa hastalığı, epilepsi, glokom kanser gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğu bilinmektedir. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin aktivitesini hedef alan ilaçlar, bazı hastalıkların tedavisinde hali hazırda klinik kullanımda olup; glokom, epilepsi ve ödem gibi durumlarda CA inhibitörlerinden faydalanılmaktadır (3-7). Mevcut CA inhibitörlerinin büyük çoğunluğu sülfanamid türevi olup asetazolamid, dorzolamid, metazolamid, zonisamid ve brinzolamid gibi ilaçları içermektedir. Ancak bu inhibitörlerin genellikle tüm izoenzimler üzerinde etkili olması, seçicilik eksikliği nedeniyle çeşitli yan etkilere yol açmaktadır (3). Bu durum, izoforma özgü ve daha az yan etkiye sahip yeni inhibitörlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Diğer yandan, CA aktivasyonunun da bazı fizyopatolojik durumlarda rol oynadığı bilinmekle birlikte, günümüzde klinik kullanıma sunulmuş bir CA aktivatörü bulunmamaktadır (7).

Doğal bileşikler, düşük toksisite potansiyelleri ve çok yönlü biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilaç geliştirme çalışmalarında giderek daha fazla ilgi görmektedir. Kumarinler, poliaminler ve fenoller gibi bitki kökenli bileşiklerin CA izoenzimleri üzerindeki etkileri araştırılmış ve bu bileşiklerin farklı inhibisyon mekanizmalarına sahip olduğu gösterilmiştir (8, 9). Literatürde, doğal ürünlerin antioksidan, antiinflamatuvar,

hepatoprotektif, kardiyoprotektif ve antikanser etkileri olduğu gösterilmiş olup, bu bileşiklerin enzimatik hedefler üzerindeki seçici etkileri, yeni nesil terapötik ajanların geliştirilmesinde umut vadetmektedir (3).

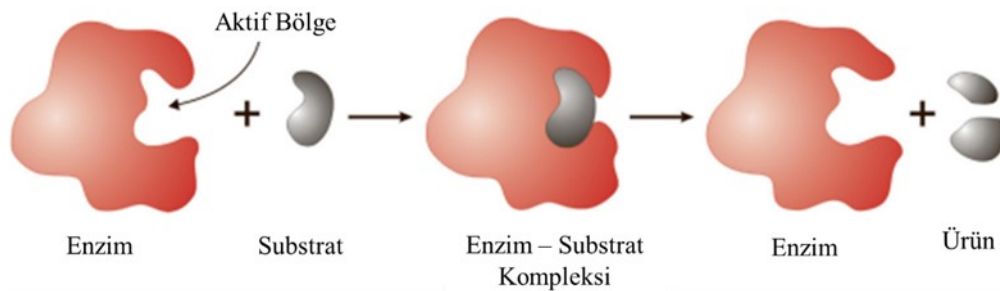
Bu tez çalışmasının amacı, doğal bir furanokumarin olan bergamottinin insan karbonik anhidraz I (hCA I) ve II (hCA II) izoenzimleri üzerindeki olası etkilerinin belirlenmesidir. Bu kapsamda, BGM'nin CA I ve II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine etkisi esteraz ve hidrataz aktivitesi tayin yöntemleriyle belirlendi. Enzim-bileşik etkileşimlerinin yapısal özellikleri ise moleküler kenetleme analizleri ile incelendi.

Çalışmanın özgün hipotezi, bergamottinin hCA I ve II izoenzimleri ile etkileşime girerek bu enzimlerin aktivitesini anlamlı biçimde değiştirebileceği ve bu yönüyle potansiyel bir inhibitör ya da aktivatör aday bileşik olabileceğidir. Bu çalışmanın sonuçlarının, hem CA enzimleriyle ilişkili hastalıkların tedavisinde yeni farmakolojik hedeflerin geliştirilmesine katkı sağlaması hem de doğal ürünlerin biyolojik etkilerine dair literatüre özgün bir katkı sunması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler tüm canlı hücrelerde biyolojik reaksiyonların denge sabitini değiştirmeden reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek hızlarının artmasını sağlayan katalizörlerdir (1, 10, 11). Enzimler birkaç istisna dışında protein yapısındadır. Enzimler katalitik aktivite gösterebilmeleri için protein yapısında olmayan kofaktör adı verilen bileşenlere ihtiyaç duymaktadır. Enzimlerin kofaktör içermeyen protein kısımları apoenzim, kofaktör içeren aktif şekilleri ise haloenzim olarak adlandırılmaktadır. Kofaktörler Zn (II) gibi metal iyonlarından, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve flavin adenin dinükleotid (FAD) gibi organik moleküllerden biri olabilmektedir. Kofaktör yapısındaki metal iyonları ya katalitik merkez oluşturabilmekte ya da enzim ve substrat etkileşimini sağlayabilmektedir (1, 11). Katalitik merkez yani aktif bölge katalize edilen kimyasal reaksiyonu kolaylaştırmak için bir substratın bağlandığı, enzim üzerindeki bir oyuk veya yarıktır. Enzimlerin aktif bölgesinde bulunan amino asit rezidüleri, substratın spesifik olarak bağlanmasını ve enzimlerin substratlarına spesifik olmasını sağlamaktadır (1). Ayrıca enzimler belirli bir fonksiyonel gruba (metil vb.), belirli bir kimyasal bağ türüne (C-C) özgü aktivite de gösterebilmektedir (11). Enzimlerin substratlarına anahtar kilit modeli veya uyum oluşturma modeli ile iki farklı mekanizma ile bağlanabilmektedir (1, 10, 11). Reaksiyon sırasında ilk olarak enzim substratına bağlanarak enzim-substrat kompleksi oluşturur (Şekil 1). Daha sonra substrat ürüne dönüşür ve enzimden ayrılır. Enzim böylece reaksiyondan değişmeden ayrılır ve tekrar tekrar kullanılabilir (12).



Şekil 1. Bir enzimatik reaksiyonun şematik gösterimi (Blanco'dan, 12)

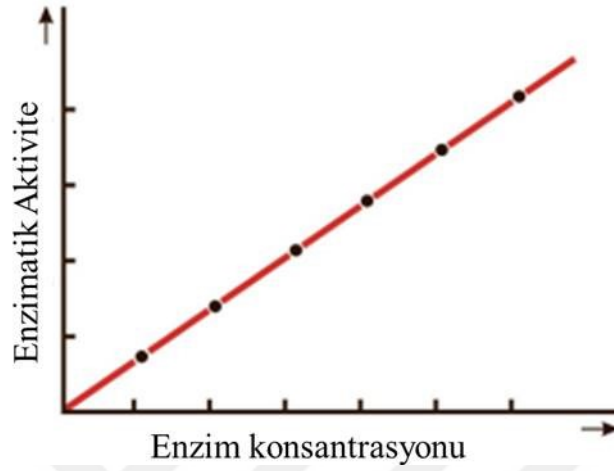
2.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim biliminin başlangıcını temsil eden diastaz (α -amilaz), 1833 yılında izole edilerek saflaştırılan ilk enzim olmuştur. Daha sonra yeni keşfedilen enzimler genellikle kataliz ettikleri reaksiyona göre sonuna “az” son eki getirilerek isimlendirilmeye başlanmıştır (13, 14). Bu durum yıllar içinde enzimlerin sayılarındaki artış sebebi ile karışıklığa yol açmış ve enzimlerin isimlendirilmesi sorunu ortaya çıkmıştır. Böylece ilerleyen yıllarda Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği İsimlendirme Komitesi’nin (NC-IUBMB) Enzim Komisyonu’ndan (EC) uzmanlar tarafından bilinen enzimlerin adlandırılıp yeni keşfedilen enzimlerin sınıflandırılabileceği bir adlandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu adlandırma sisteminde enzimler bir EC numarasıyla kodlanarak tanımlanmaktadır. Bu EC kodu 4 numaralı bir koddur. İlk numara katalize edilen ana reaksiyonu belirtmektedir. 2. ve 3. numaralar reaksiyonun alt sınıflarını belirtmektedir. 4. numara ise kendi ait olduğu sınıftaki seri numarasıdır ve substrat spesifikliğini göstermektedir (11, 13). Enzimler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar ve translokazlar olmak üzere 7 ana sınıfa ayrılmaktadır (15). Oksidoredüktazlar oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize ederler, transferazlar amin, karboksil, karbonil, metil, açıl, glikozil ve fosforil gibi fonksiyonel grupların bileşikler arasında transferini gerçekleştirmektedir. Hidrolazlar su aracılığı ile C—O, C—N, C—S ve O—P bağlarının hidrolizini katalizlemektedir. Liyazlar bir substrattaki C—C, C—S ve C—N bağlarının (peptit bağları hariç) hidrolitik veya oksidasyon dışında farklı şekilde yıkılmasını sağlarlar. İzomerazlar bir molekül içindeki değişiklikleri katalize etmekte böylece izomerlerin birbirine dönüşümünü sağlamaktadır. Ligazlar bir nükleozit trifosfatın hidrolizi ile iki molekül arasında C—C, C—S, C—O veya C—N bağlarının oluşumunu katalizlemektedir (11-13). Translokazlar en son tanımlanan enzim sınıfıdır ve iyonların veya moleküllerin zarlar boyunca transferini düzenlemektedir (14, 16).

2.1.2. Enzim Aktivitesini Etkileyen Faktörler

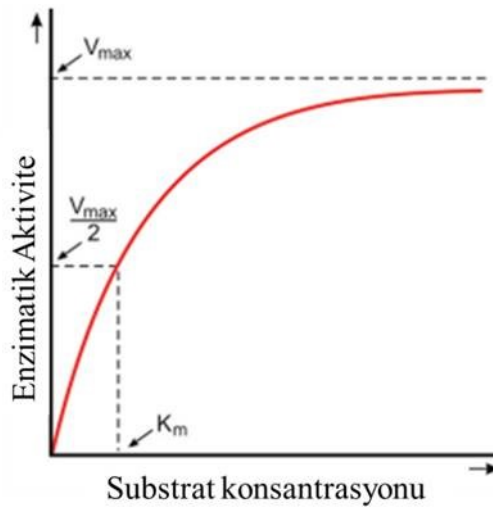
Enzim aktivitesi enzim tarafından bir dakikada ürüne dönüştürülen substratın mikromol cinsinden miktarı olarak tanımlanabilir ve enzim tarafından gerçekleştirilen reaksiyonun hızını göstermektedir (17). Enzim aktivitesini enzim ve substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörler etkileyebilmektedir (12, 18).

Enzim konsantrasyonu doygun substrat varlığında ve reaksiyon ortamındaki diğer şartlar sabit tutulduğunda reaksiyon hızı ile ilişkilendirilmektedir. Şekil 2’de görüldüğü gibi enzim aktivitesi ile enzim konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır.



Şekil 2. Enzim konsantrasyonunu bir enzimin reaksiyon hızı veya aktivitesi üzerindeki etkisi (Blanco’dan, 12)

Substrat konsantrasyonu enzim konsantrasyonu ve reaksiyon ortamındaki diğer şartlar sabit tutulduğunda substrat konsantrasyonu ve enzim aktivitesi arasındaki ilişki Şekil 3’te görüldüğü gibi hiperbolik eğri ile grafik üzerinde gösterilebilir. Substrat ve aktivite arasındaki ilişki Michaelis ve Menten tarafından 20. yüzyılın başlarında tanımlanmıştır (12).



Şekil 3. Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerindeki etkisi (Blanco’dan, 12)

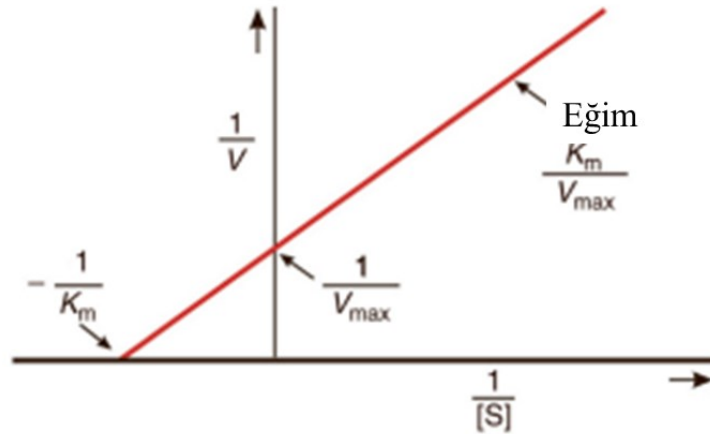
Reaksiyonun başlangıcında substrat konsantrasyonunun artırılması, enzimatik reaksiyon hızında artışa neden olmaktadır. Belirli bir noktadan sonra ortamda substrat konsantrasyonu artsa bile enzimin hızı değişmez. Çünkü enzim artık maksimum hıza (V_{max}) ulaşmıştır. Yarı maksimum hızdaki substrat konsantrasyonu ise ($V_{max}/2$) Michaelis sabiti (K_m) olarak tanımlanmakta ve enzimin substratına olan ilgisini yansıtmaktadır. Reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki Michaelis-Menten denklemi ile tanımlanmaktadır (12, 17).

$$V = \frac{V_{max}S}{K_m + S} \quad \text{Eşitlik 1}$$

İlerleyen yıllarda Michaelis-Menten denklemi Hans Lineweaver ve Dean Burk tarafından doğrusal bir grafik şekline dönüştürülmüştür. Böylece enzim kinetik parametreleri V_{max} ve K_m hesaplaması daha kolaylaşmıştır (12, 17, 19).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}S} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Eşitlik 2}$$

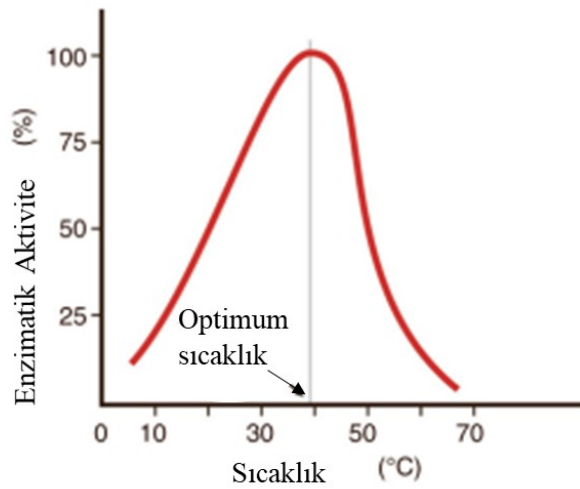
Lineweaver-Burk grafiği hem V_{max} ve K_m değerlerini daha kolay bir şekilde hesaplamak hem de farklı enzim inhibitörlerinin etkisini incelemek için yaygın kullanılan bir hesaplamadır (12, 19). Şekil 4'te Lineweaver- Burk grafiği görülmektedir (12).



Şekil 4. Lineweaver-Burk grafiği (Blanco'dan, 12)

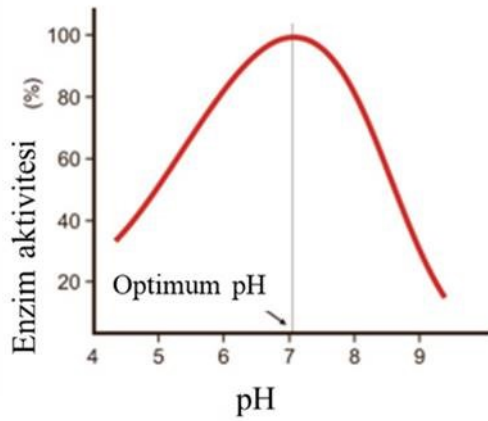
Enzim aktivitesini etkileyen bir diğer faktör de sıcaklıktır. Sıcaklık artışı sistemdeki kinetik enerji artışını sağlayarak reaksiyonun hızlanmasını sağlamaktadır. Ancak her enzimin çalışabilmesi için optimal sıcaklık değerine ihtiyaç vardır. Çünkü enzimlerin

yapısında hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları gibi non-kovalent etkileşimler bulunmaktadır. Bu etkileşimler yüksek sıcaklık tarafından bozulmaktadır. Eğer çok şiddetli bir bozulma olursa bu olay protein denatürasyonu olarak adlandırılır ve geri dönüşümsüz bir olaydır. Sıcakkanlı memeliler için ideal sıcaklık 37 °C'dir ve bu sıcaklık dışında enzim aktivitesi olumsuz etkilenmektedir. Şekil 5'te enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi görülmektedir (12, 19).



Şekil 5. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi (Blanco'dan, 12)

Enzim aktivitesini etkileyen faktörlerden bir diğeri de pH'dır. Reaksiyon ortamındaki diğer değişkenler sabit tutulduğunda pH değişimleri enzim aktivitesi üzerinde etkileri açık bir şekilde fark edilmektedir. pH değişimi enzimde bulunan elektrostatik etkileşimleri bozarak enzim yapısını etkilemekte böylece enzim ve substrat üzerindeki yüklerin iyonlaşma durumu değişmesine neden olarak enzim-substrat kompleksi oluşumunu engellemektedir. Sıcaklıkta olduğu gibi enzimlerin aktivite gösterebilmesi için belirli pH değerleri bulunmaktadır. İstisna enzimler bulunmakla beraber çoğu enzim için optimum pH aralığı 6-8 arasındadır (11, 12, 19). Şekil 6'da enzim aktivitesi üzerinde pH değişiminin etkisi görülebilmektedir (12).



Şekil 6. pH değişiminin enzim aktivitesi üzerine etkisi (Blanco'dan, 12)

Kimyasal bileşikler de enzim aktivitesini etkilemektedir. Enzim aktivitesi için çeşitli koenzimler, kofaktörler gerekmede ve çeşitli kimyasal bileşikler enzimin aktif bölgesine veya farklı bir bölgesine bağlanarak enzim aktivitesini azaltabilmekte veya inhibe etmektedir (11, 13). Enzimleri geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz inhibisyon olmak üzere iki farklı şekilde inhibe etmektedir. Ayrıca geri dönüşümlü inhibitörler yarışmalı, yarışmasız ve karışık inhibisyon olmak üzere kendi içinde üçe ayrılmaktadır (11).

Geri Dönüşümlü İnhibisyon

Yarışmalı İnhibisyon

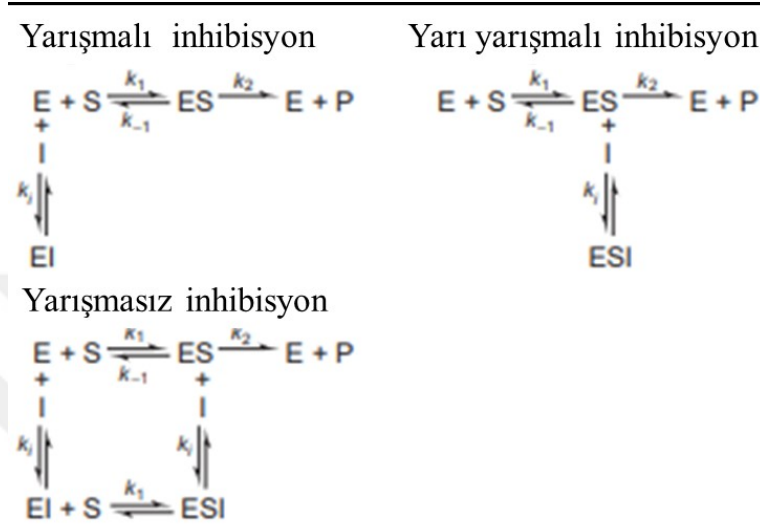
Yarışmalı inhibisyon gösteren bileşikler çoğunlukla yapısal olarak substrata benzemektedir ve bu sebeple enzim için substrat ile aralarında rekabet oluşmaktadır. Bu tip inhibisyon geri dönüşümlü bir inhibisyondur. Ortamda yeterli substrat olduğunda inhibitör etki gösteren bileşik yerine substrat bağlanabilir. Ortamda inhibitör bileşik olduğu zaman enzimin substrata olan ilgisi azalmakta yani K_m değerinde artış görülür, V_{max} değerinde ise değişim görülmez (17, 20).

Yarışmasız inhibisyon

Yarışmasız inhibisyon gösteren bileşikler yapısal olarak substrat ile ilişkili değildir ve enzimin aktif bölge dışında bir yerine bağlanma göstermektedir. Bu durumda substrat ile inhibitör enzime aynı anda bağlanabilir. Fakat inhibitör enzime bağlandığı zaman enzimin aktif bölgesinde konfarmasyonel bir değişiklik görülebilir bu durumda V_{max} değerinde bir azalmaya sebep olur ancak enzimin substrata olan ilgisi yani K_m değerinde bir değişiklik gözlenmez (17, 20).

Yarı yarışmalı inhibisyon

Bu inhibisyon mekanizmasında bileşikler enzim ile değil de enzim-substrat kompleksi ile etkileşime girerler. Bu tip inhibisyonda $V_{\max}$ ve K_m değerinde değişim gözlenmektedir (12, 20).



Şekil 7. Farklı inhibisyon mekanizmalarının şematik gösterimi; K_i inhibisyon sabiti, I inhibitör (Narva'ez'den, 11)

Geri Dönüşümsüz İnhibisyon

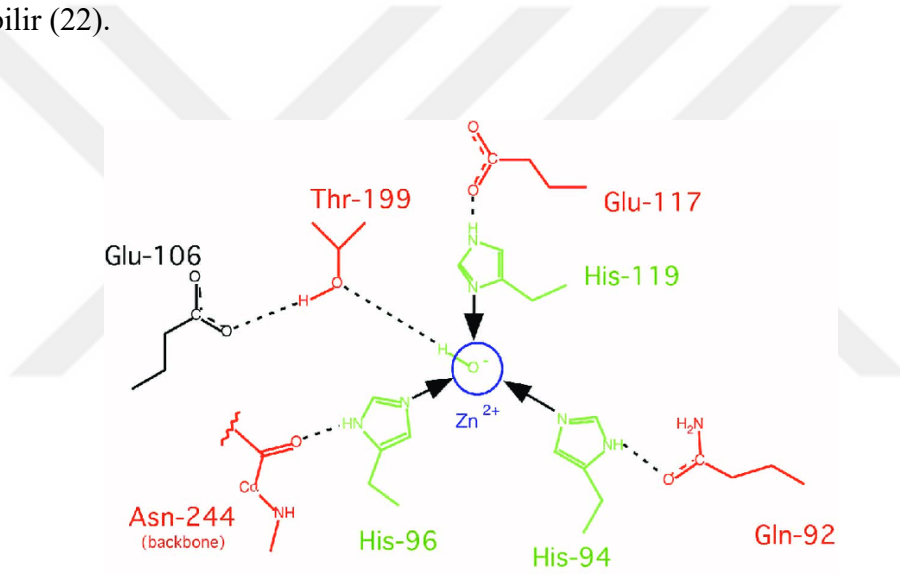
Bu inhibisyon mekanizmasında bileşikler enzim üzerindeki gruplara kovalent olarak bağlanarak enzimi geri dönüşümsüz olarak inhibe edebilmektedir. Bazı bileşikler ise enzimin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyon gösterebilmektedir. Bu tip inhibitörlere intihar inhibitörleri denilmektedir. Geri dönüşümsüz inhibisyonda yarışmasız inhibitörlerde olduğu gibi K_m değeri değişmezken $V_{\max}$ değerinde azalma görülmektedir (12, 17, 19).

2.2. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz enzimi (E.C.4.2.1.1) bakteriler, arkea, mantarlar, hayvanlar, insanlar da olmak üzere tüm canlılarda bulunan, yapısında Zn, Fe, Co, Kd gibi metalleri bulundurabilen liyaz sınıfına ait bir metalloenzimdir (5). Karbonik anhidraz enzimi ilk defa Meldrum ve Roughton tarafından 1933 yılında yapılan çalışmada sığır eritrositlerinden izole edilmiştir (21). Karbonik anhidraz enzimi α , β , γ , δ , ζ , η , θ ve ι olmak üzere 8 farklı gen tarafından kodlanır (5). İnsan karbonik anhidraz enzimi α -CA sınıfına aittir (9). İnsan CA'ları 260 ile 459 arasında amino asit rezidüsü içermektedir (22).

2.2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı ve Katalitik Özellikleri

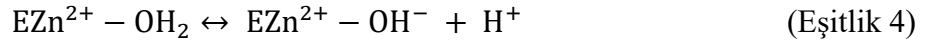
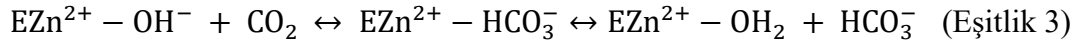
Alfa karbonik anhidrazların aktif bölgesi, 15 Å derinliğinde koni şeklinde bir boşluktur ve bir tarafı hidrofobik diğer tarafı hidrofilik olmak üzere iki kısımdan oluşur (22, 23). Aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu bulunur ve Zn^{2+} iyonu, bir OH^- iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, 97, 119) ile tetrahedral bir geometri (Şekil 8) oluşturur (22, 24). Ayrıca aktif bölgede His64 ve Tyr127 rezidüleri de proton alıcısı olarak bulunur. Bu yapı bütün α -CA izoformlarında benzerlik gösterir. Hidrofilik kısımda bulunan Thr199 ve Glu106 rezidüleri ile Zn^{2+} iyonuna bağlı OH^- anyonu arasında oluşan hidrojen bağı, enzimin katalitik fonksiyonunu artırır. Ayrıca His94, Gln92 ile hidrojen bağı oluştururken His119 ise Glu117, His107, Tyr194, Ser29 ve Trp209 gibi çeşitli gömülü rezidüler ile hidrojen bağı oluşturabilir (22).



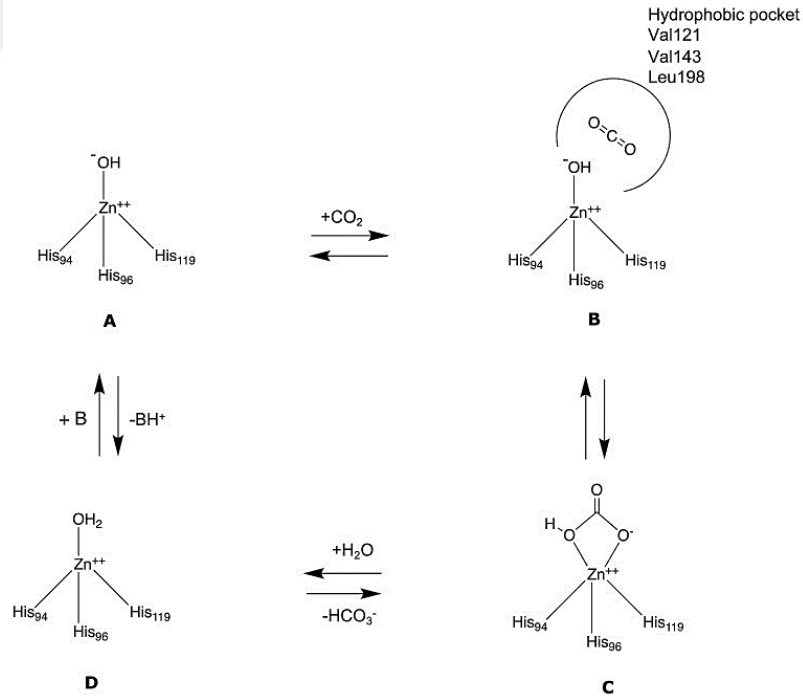
Şekil 8. α -Karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesi (DeGrado'dan, 24)

Canlı hücrelerde karbondioksit (CO_2) ve bikarbonat (HCO_3^-) bir denge halinde bulunur. Karbondioksitin hücre içinde çözünürlüğü bikarbonata göre daha fazladır ve hücre içine veya dışına kolaylıkla difüze olabilir. Bikarbonat ise lipid membranlarında çözünmediği için hücre dışına taşınması gerekir. Canlılarda $CO_2:HCO_3^-$ dönüşümü karbonik anhidraz enzimi ile gerçekleşir (22). Karbonik anhidraz enzimi CO_2 'nin hidrasyonu ve HCO_3^- 'in dehidrasyonu reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon dönüşümlü bir reaksiyondur ve iki aşamalı olarak ping-pong mekanizmasıyla gerçekleşir (Reaksiyon denklemi 1 ve 2) (23). Reaksiyonun ilk adımında OH^- iyonun CO_2 molekülüne nükleofilik saldırısı en son H_2O 'ya dönüşür. İkinci adımda ise proton transferi gerçekleşir ve H_2O molekülü proton kaybeder. Bu proton ise His64 gibi proton tutuculara aktarılır (25). Bu

reaksiyon ile CO₂ ve protonlar, hücre içinde, hücre dışında ve hücreler arasında biyolojik membranlar boyunca taşınabilir (22).



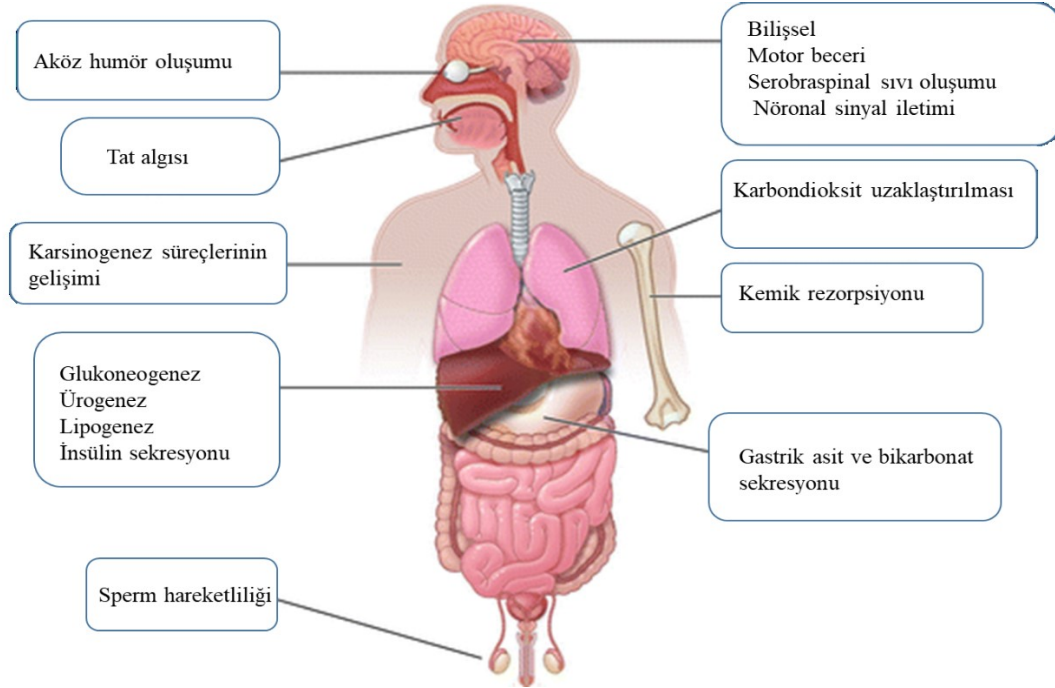
Zn²⁺ iyonuna H₂O molekülü bağlı hali enzimin inaktif formunu oluşturur (Şekil 9 D). Reaksiyonda ilk olarak (Şekil 9 A) H₂O molekülü bir proton kaybederek enzimin hidroksillenmiş halini oluşturur. Enzim aktif formuna dönüşür. Zn²⁺ iyonuna bağlı OH⁻ iyonunun CO₂ molekülüne (Şekil 9 B) nükleofilik saldırısı sonucu Zn²⁺ iyonuna bağlı HCO₃⁻ oluşur (Şekil 9 C). Daha sonra ise HCO₃⁻ H₂O tarafından uzaklaştırılır ve enzimin aktif olmayan asit formu oluşur (Şekil 9 D). Böylece katalitik döngü tekrar başlamış olur. H₂O molekülünden çevreye proton mekiği reaksiyonun hız sınırlayıcı adımını oluşturur ve His64 rezidüsü tarafından (özellikle hCA I, II, IV, V, VII ve IX'da) gerçekleştirilir. His aminoasidinin pKa değerinin 7 civarında olması, imidazol grubu içermesi ve bazik özellik göstermesi sebebiyle proton mekiği gibi davranmaktadır (23).



Şekil 9. Karbonik anhidraz enziminin katalitik döngüsü. (A) H₂O molekülünün hidroksillenmiş bir türe dönüşmesi. (B) OH⁻ iyonun CO₂'ye saldırması (C) HCO₃⁻'in çinko iyonuna koordine olduğu türlerin oluşması. (D) Enzimin inaktif durumunun yeniden oluşması (Poggetti'den, 23)

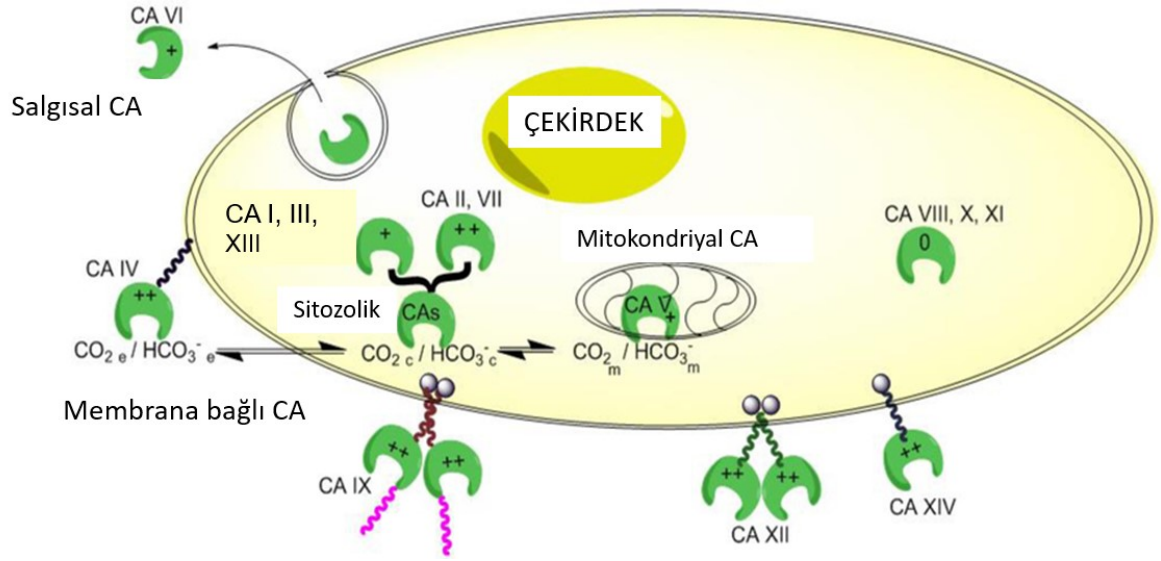
2.2.2.Karbonik Anhidraz İzoenzimleri ve İzoenzimlerinin Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz enziminin temel görevi asit–baz dengesinin korunması olmakla beraber CA vücudumuzda farklı işlevlere de sahiptir (Şekil 10). Glukoneogenez, lipogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, aköz humör ve tat algısı oluşumu gibi süreçlerde de fonksiyon gösterebilmektedir (5).



Şekil 10. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik fonksiyonları (Aspatwar’dan, 5)

Memelilerde bulunan α -CA sınıfına ait şu zamana kadar 16 izoenzim tanımlanmıştır. Bu izoenzimlerden CAXV, insanlarda bulunmamaktadır. Bu izoenzimler hücresel lokalizasyonlarına göre sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV), salgısal (CA VI) ve mitokondriyal (CA VA ve CA VB) olmak üzere dört şekilde sınıflandırılabilir (5, 26). Şekil 11’de hücresel konumları gösterilmektedir (26). Karbonik anhidraz izoenzimlerinden CAVIII, CAX ve CAXI, ise Zn^{2+} iyonunun stabilizasyonunu sağlayan His rezidülerinden yoksun olmasından dolayı katalitik olarak aktif değildir ve karbonik anhidraz ile ilişkili proteinler (CARP) olarak da isimlendirilmektedir (22). Karbonik anhidraz izoenzimlerinin özellikleri fonksiyonları Tablo 1’de özetlenmektedir.



Şekil 11. İnsan karbonik anhidraz izoenzimlerinin hücresel lokalizasyonları ve göreceli katalitik aktiviteleri (Zamanova'dan, 26)

Tablo 1. İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri ve izoenzimlerinin özellikleri

CA İzoenzimi	Ekspresyon bölgeleri	Fonksiyonu	İlişkili Hastalıklar
CA I	Eritrositler, göz, gastrointestinal sistem, ter bezleri, adipoz doku (22, 26, 27)	CO ₂ /HCO ₃ ⁻ arasındaki dengenin korunması, pH hemoastazisinin sağlanması, antireflü savunması, CO ₂ 'nin akciğerlere taşınması (26)	Retinal/serebral ödem, bipolar bozukluk, glokom (27, 28)
CA II	Eritrositler, göz, gastrointestinal sistem, böbrekler, akciğerler, testisler, kemik osteoklastları ve beyin (27, 28)	CO ₂ /HCO ₃ ⁻ arasındaki dengenin korunması, pH hemoastazisinin sağlanması, kemik rezorpsiyonu, aköz humör üretimi, sperm hareketliliği, idrar asitleşmesi, BOS sekresyonu, CO ₂ 'ye karşı nazal kemosenitivite ve antireflü savunması (22, 27)	Yüksek irtifa hastalığı, kanser, ödem, glokom, epilepsi, makula dejenerasyonu, alzheimer hastalığı, uyku apnesi, pulmoner hipertansiyon, KOAH, psödötümör serebri (27, 28)
CA III	İskelet kasları, adipositler, rahim, prostat, akciğerler, böbrekler, kolon, testis, eritrositler (27)	Kaslarda CO ₂ /HCO ₃ ⁻ arasındaki dengenin korunması, pH hemoastazisinin sağlanması, antireflü savunması, oksidatif strese karşı koruma, yağ asidi metabolizması ve oküler sıvı taşınması (22, 26)	Myastenia gravis, oksidatif stres (27, 28)
CA IV	Beyin kılcal damarları, göz, kalp kası, böbrekler, akciğerler, pankreas, gastrointestinal sistem, endotel, tükürük bezleri, insan üreme sistemi (22, 26, 27)	CO ₂ /HCO ₃ ⁻ arasındaki dengenin korunması, CO ₂ 'e karşı nazal kemosenitivite, antireflü savunma, HCO ₃ ⁻ geri emilimi, NH ₄ ⁺ çıkışı, pH hemoastazisinin sağlanması, oküler sıvı üretimi ve serebral kan akışı (22, 26)	Glokom, inme, makula dejenerasyonu, retinitis pigmentosa, KOAH (27, 28)
CA VA	Karaciğer, böbrek, pankreas beta hücreleri, beyin (22, 27)	Adipositlerde ve glukoneogenez, lipogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda piruvat karboksilaz gibi mitokondriyal enzimlere HCO ₃ ⁻ sağlanması (22, 26)	Alzheimer, obezite, diyabetik serabovasküler hastalık (27, 28)
CA VB	Gastrointestinal sistem, kalp veya iskelet kasları, böbrekler, pankreas, omurilik, tükürük bezleri, omurilik, beyin (22, 26, 27)	Adipositlerde ve glukoneogenez, lipogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda mitokondriyal enzimlere HCO ₃ ⁻ sağlanması (22, 26)	Obezite, Alzheimer (27, 28)
CA VI	Tükürük, gözyaşı ve sütün ana bileşeni, nazal, lakrimal, von Ebner's ve meme bezleri (22, 27)	pH düzenlemesi, antireflü savunması, kanserojenlerden koruma, tat fonksiyonu (22)	Karyogenez (27, 28)
CA VII	Esas olarak merkezi sinir sisteminde, ayrıca karaciğer, iskelet kaslar, mide, duodenum, kolon (22, 26, 27)	Merkezi sinir sistemi ve diğer dokularda CO ₂ /HCO ₃ ⁻ arasındaki dengenin korunması, beyin omurilik sıvısı üretimi (22, 26)	Epilepsi, nöropatik ağrı, oksidatif stres (27, 28)
CA VIII	Beyincik purkinje hücreleri (22)	Katalitik olarak aktif değil (22)	- (28)

Tablo 1. (Devam)

CA IX	Hipoksik tümörler, gastrointestinal sistem, erkek boşaltım kanalı, pankreas, merkezi sinir sistemi (22, 26, 27)	Dokularda $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ arasındaki dengenin korunması, pH düzenlenmesi, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, iyon transportu (22, 26)	Kanser, artrit (27, 28)
CA X	Beyin, merkezi sinir sistemi (22)	Katalitik olarak aktif değil (22)	- (28)
CA XI	Beyin, merkezi sinir sistemi, omurilik, tiroid (22)	Katalitik olarak aktif değil (22)	- (28)
CA XII	Hipoksik tümörler, kolon, rektum, yemek borusu, pankreas, böbrekler, beyin, endometriyum, yumurtalıklar, derideki ter bezleri, meme epitelyumu, aktifleştirilmiş lenfositler, akciğer, göz, erkek boşaltım kanalları (22, 26, 27)	Hücrelerde $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ arasındaki dengenin korunması, pH düzenlenmesi, Aköz humör üretimi, HCO_3^- emilimi, H^+ salgılanması, testis sıvısının konsantrasyonu ve asitlenmesi (22, 26)	Artırt, kanser, glokom (27, 28)
CA XIII	Beyin, bağırsak, böbrekler, akciğerler ve üreme sistemi, timüs, dalak (22, 26, 27)	Hücrelerde $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ arasındaki dengenin korunması, böbrek, gastrointestinal ve üreme organlarında pH düzenlenmesi (22, 26)	Sterilite (27)
CA XIV	Merkezi sinir sisteminin bazı kısımları, karaciğer, kalp, ince bağırsak, kolon, böbrek, mesane, iskelet kasları, beyin, retina, akciğerler (22, 26, 27)	Hücrelerde $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ arasındaki dengenin korunması, kronik hipoksiye yanıt olarak kaslarda, retinada ve diğer dokularda pH düzenlenmesi (22, 26)	Epilepsi, retinopati (27, 28)

2.2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

İnsanlarda CA enzimi, pH hemoastazisinin düzenlenmesinden kalsifikasyona kadar çeşitli fizyolojik olaylarda yer almaktadır. Karbonik anhidraz, fizyolojik fonksiyonlarının yanı sıra glokom, epilepsi, obezite, kanser gibi çeşitli patolojilerle de ilişkilendirilmektedir. Bu sebeple CA enziminin aktivasyonu veya inhibisyonu, çeşitli patolojilerde tedavi seçeneği olarak düşünülmektedir (6).

2.2.3.1. Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

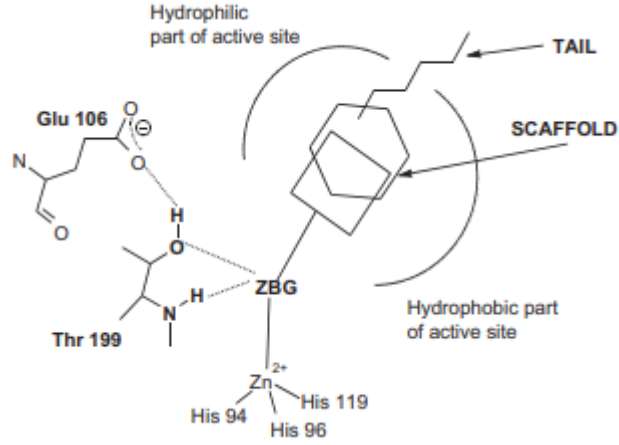
Karbonik anhidraz inhibitörleri (CA_i) uzun yıllardır özellikle ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi ve osteoporozis tedavisinde kullanılmaktadır (23).

Bilinen beş farklı karbonik anhidraz inhision mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizmalar şunlardır:

1. Çinko iyonuna bağlanan inhibitörler (Sülfonamidler ve onların izosterleri, ditiyokarbamat ve onların izosterleri, hidroksilatlar, karboksilatlar, çoğu anyon)
2. Çinko iyonuna koordine OH⁻ iyonu veya H₂O molekülüne bağlanan inhibitörler (fenoller, sülfokumarinler, poliaminler, tiyoksokumarinler, karboksilatlar)
3. Aktif bölgenin girişini kapatan bileşikler (kumarinler ve onların izosterleri)
4. Aktif bölgenin dışına bağlanan bileşikler (2-(benzilsülfonil)-benzoik asit)
5. İnhibisyon mekanizması bilinmeyen bileşikler (ikincil/üçüncül sülfonamidler, imatinib, nilotinib) (29).

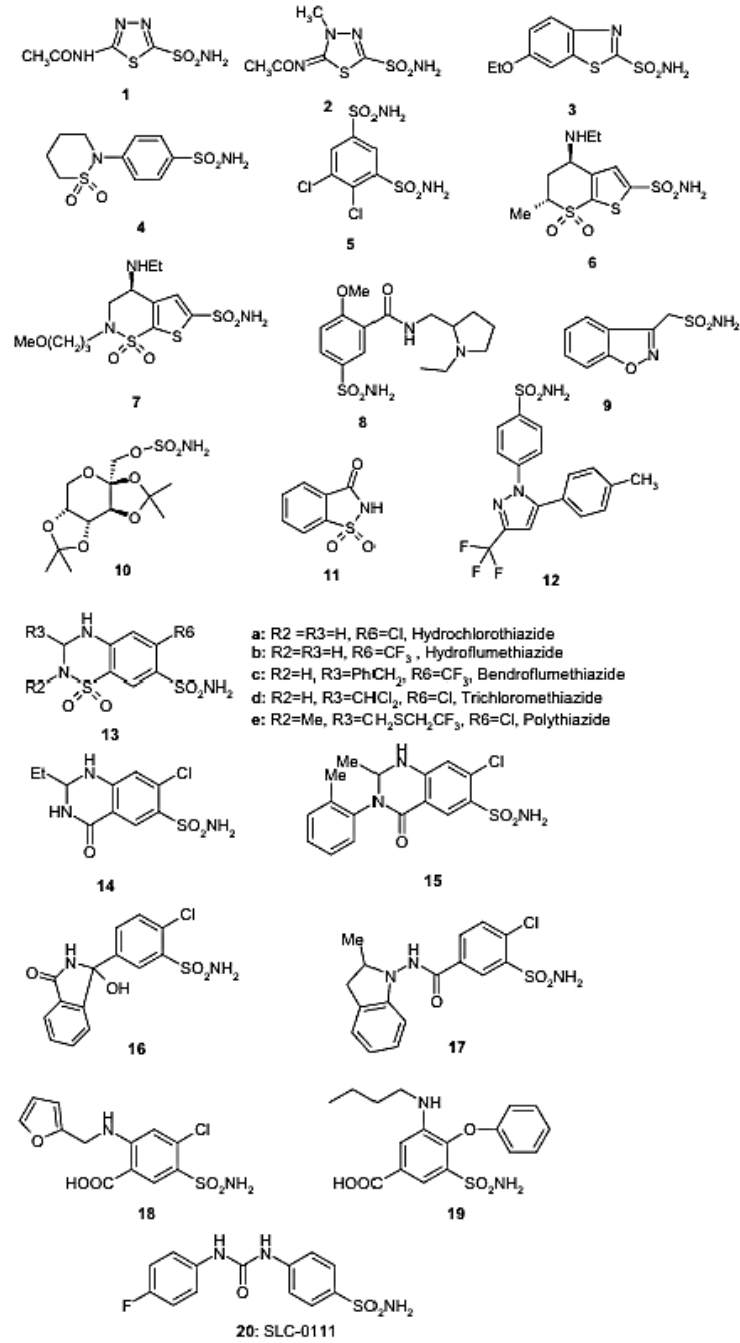
Çinko İyonuna Bağlanan CA İnhibitörleri

Çinko iyonuna bağlanan CA inhibitörleri, Zn²⁺ iyonuna bağlı dördüncü ligand olan H₂O molekülünün veya OH⁻ iyonunun yerini alarak inhibisyon gösterir. Ayrıca Glu106 ve Thr199 rezidüleri ile güçlü etkileşimler kurmaktadır (7, 29). İnhibisyon mekanizması Şekil 12’de gösterilmektedir (29).



Şekil 12. Çinko iyonuna bağlanan CA inhibitörlerinin inhibisyon mekanizması (Supuran'dan, 29)

Sülfonamidler çinko iyonuna bağlanan CA sınıfındadır ve CA_i sınıfının en önemli kısmını oluşturur. Sülfonamidlerin CA üzerine inhibisyon etkileri 1940 yılında Mann ve Keilin tarafından bulunmuştur (29, 30). Asetazolamid 1, metazolamid 2, etokszolamid 3, sultiam 4, diklorofenamid 5, dorzolamid 6, brinzolamid 7, sülpirid 8, zonisamid 9, topiramet 10, sakarin 11, selekoksib 12, klorotiyazid/highceilling tip diüretikleri 13-19 gibi sülfonamid türevleri diüretik olarak, glokom ve epilepsi tedavisinde uzun yıllardır klinikte kullanılmaktadır (29). SLC-0111 20 ise antitümör/antimetastatik ajan olarak faz -1 klinik çalışması devam eden seçici CAIX inhibitörüdür (29, 31).



Şekil 13. Klinikte kullanımda olan CA_i ve Faz-1 klinik çalışması devam eden 20 SLC-0111 (Supuran'dan, 29).

Asetozalamid gibi sülfonamid türevi inhibitörler güçlü ve seçici olmayan CA_i'leridir. Katalitik olarak aktif CA izoenzimlerinin tümünü (CA I-VA, VB, VI, VII, IX, XII-XIV) inhibe ederler. Böylece hedef dışı CA izoenzimlerinin inhibisyonu çeşitli yan etkilere sebep olabilmektedir (30). Bu yan etkiler Tablo 2'de özetlenmektedir.

Tablo 2. Klinikte kullanımda olan karbonik anhidraz inhibitörleri

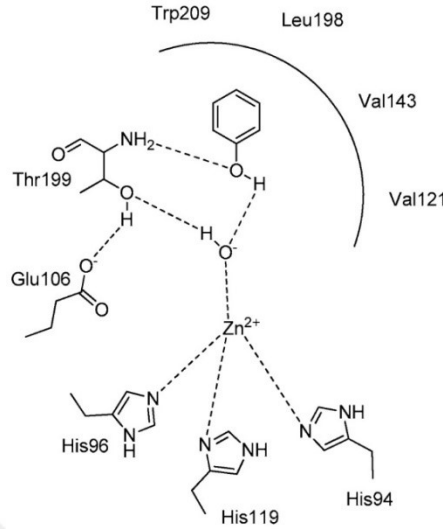
İlaç etken maddesi	Kullanım alanı	Görülen yan etkiler
Asetozalamid (7, 29, 32, 33)	Diüretik, epilepsi, glokom, akut dağ hastalığı, konjestif kalp yetmezliği bağlı ödem (7, 33-40)	Kaşıntı, döküntü, Stevens-Johnson sendromu, ışığa duyarlılık, kemik iliği depresyonu ve kan diskrazileri, hiperkloremik metabolik asidoz, böbrek taşı, hipokalemi, parestezi, kulak çınlaması, iştah kaybı, tat alma duyusunda değişiklik, depresyon, gastrointestinal semptomlar (34-38)
Dorzolamid (7, 32, 41-43)	Diüretik, Glokom (7, 34, 38, 41-43)	Disguzi (ağızda hoş olmayan bir tat), yüzeysel punktat keratit, gözde yanma, batma ve yabancı cisim hissi ve sulanma, parestezi, anestezi, baş dönmesi (34, 38, 42, 43)
Zonisamid (7, 32, 35)	Epilepsi (7, 32, 33, 35)	Baş ağrısı, mide bulantısı, uyku hali, baş dönmesi ve kilo kaybı (33, 35)
Topiramet (7, 32, 33, 35)	Epilepsi (7, 32, 33, 35)	Baş dönmesi, sinirlilik, anksiyete ve depresyon, konfüzyon, koordinasyon anormallliği, iştah kaybı, duyuşal çarpıklık, bilişsel bozukluk, parestezi, böbrek taşı (33, 35)
Diklorfenamit (7, 32, 42, 43)	Glokom (32, 38, 44)	Deri döküntüsü, parestezi, baş dönmesi, kaşıntı, iştahta azalma, diyare, tat değişiklikleri, karın krampları (44)
Brinzolamid (7, 33, 38, 41, 42,)	Glokom (7, 38, 41-43)	Disguzi, alerjik konjonktivit, gastrointestinal semptomlar (41, 42, 43)
Metazolamid (7, 32-34, 41,	Glokom, diüretik (7, 34, 32, 37, 41)	Tat almada değişiklik, el ve ayak parmaklarında uyuşma ve karıncalanma, bulanık görme, kulak çınlaması, baş dönmesi, işitme kaybı, poliüri, bulantı, diyare, yorgunluk ve baş ağrısı, anafilaksi, döküntü, eritema multiforme ve Stevens Johnson sendromu gibi alerjik reaksiyonlar, geçici miyopi (37, 41, 46, 47)
Etokszolamid (7, 32, 40)	Glokom, diüretik (7, 32, 40, 45)	İshal, parestezi, yorgunluk, halsizlik, bacak krampları, karın krampları, kas krampları, baş dönmesi, yaygın döküntü (45)

Sülfonamidler dışında sülfonamid izosterleri (sülfamatlar, sülfamidler), karboksilatlar, hidroksamatlar, ditiyokarbamatlar ve onların izosterleri, fosfatlar, format ve tiyosinat gibi anyonlar, benzoksaboroller ve selenollerde Zn^{2+} iyonuna bağlanarak CA üzerinde inhibisyon etki gösterirler (30, 28, 48).

Çinko İyonuna Koordine OH^- İyonu veya H_2O Molekülüne Bağlanan İnhibitörler

Çinko iyonuna koordine OH^- iyonu veya H_2O molekülüne bağlanarak CA inhibisyonu gösteren ilk madde fenoldür. Fenolün inhibisyonunun gösterilmesinden sonra spremin gibi poliaminler, sülfokumarinler gibi bileşiklerinde aynı mekanizma ile

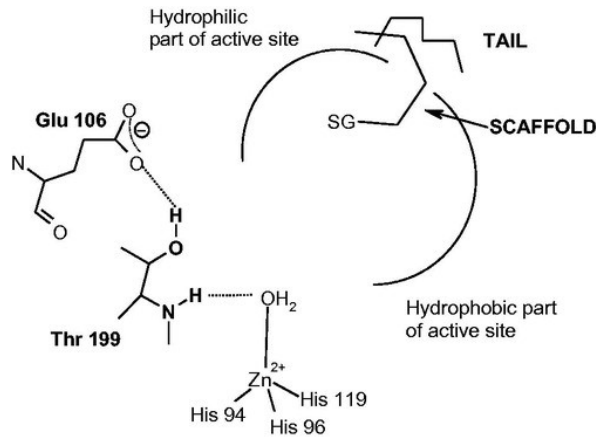
inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur Bu bileşikler ayrıca Thr 199, Glu 106 rezidüleri ile hidrojen bağı (Şekil 14) oluştururlar (9, 28-30).



Şekil 14. hCA II aktif bölgesi içindeki fenolün bağlanma modunun şematik gösterimi (Karioti'den, 9)

Aktif Bölgenin Girişini Kapatan Bileşikler

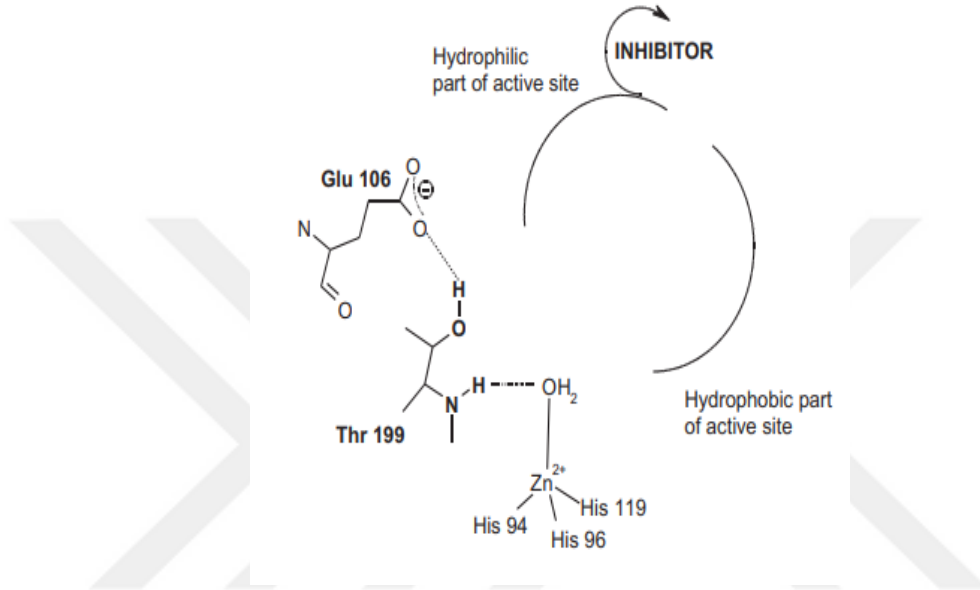
Bu inhibisyon mekanizmasında bileşikler Zn^{2+} iyonundan daha uzağa aktif bölgenin girişine bağlanarak aktif bölgeyi kapatırlar (Şekil 15). Bu inhibisyon mekanizması gösteren bileşikler aromatik, heterosiklik veya alifatik olabilen yapıları içerirler. Bu mekanizma ilk olarak kumarinlerde gösterilmiştir (28, 29). Daha sonra laktonlar, tiyolaktonlar, kinolinonlarında benzer mekanizma gösterdiği bulunmuştur (29).



Şekil 15. CA'ların aktif bölgeye girişini kapatarak inhibe eden bileşikler (Supuran'dan, 29)

Aktif Bölgenin Dışına Bağlanan Bileşikler

Bu mekanizma ise bir benzoik asit türevi olan 2-(benzilsülfonil)-benzoik asit'te gösterilmiştir (Şekil 16). Diğer inhibitörlerden farklı bir mekanizma ile aktif bölgenin dışına bağlanmakta ve His64 rezidüsünün proton mekiğini inhibe ederek etki göstermektedir (28-30).



Şekil 16. Aktif bölgenin dışında CA inhibisyon mekanizması (Supuran'dan, 29)

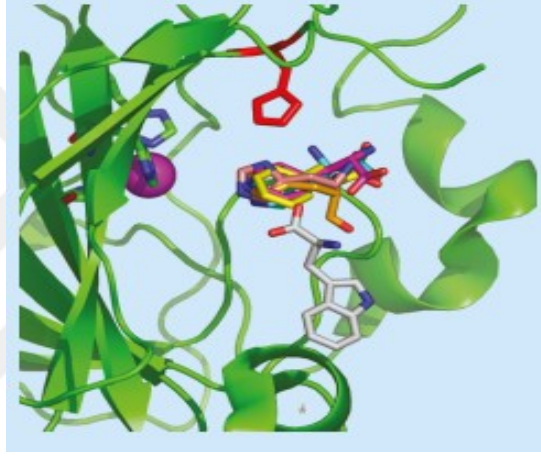
İnhibisyon Mekanizması Bilinmeyen Bileşikler

Bazı ikincil/üçüncül sülfonamidleri ve bazı protein tirozin kinaz inhibitörleri (örn. imatinib, nilotinib) henüz inhibisyon açıklanamamış bir mekanizma ile inhibisyon etkisi göstermektedir (28, 29).

2.2.3.2. Karbonik Anhidraz Aktivasyonu

Histamin gibi aminler, amino asitler ve peptitlerin CA enziminin aktivitesini arttırıcı etkileri 1940'lı yılların başında gösterilmiştir. Fakat bu etkiler enzimde bulunan ağır metaller gibi farklı durumlara ithaf edilerek kabul görmemiştir. Tartışmalı süreçlerden sonra 1997 yılında hCA II izoenzimi üzerine histaminin aktivatör etkisinin x-ışını kristalografisi ile gösterilmesi sonucu aktivatör mekanizması aydınlatılmış ve tartışmalı süreç sona ermiştir. Daha sonra L/D-Histidin gibi amino asitlerin ve diğer aminlerin aktivasyon etkileri de x-ışını kristalografisi ile gösterilmiştir (49, 50). İncelenen x-ışını

kristalografilerinde D-Triptofanın diğer bileşiklerden farklı bir yere bağlandığı gösterilmiştir. D-Triptofan dışındaki bileşikler His-64 rezidüsünün karşısı A bölgesine bağlanırken D-Triptofan B bölgesine bağlanmıştır. Şekil 17’de hCA II izoenzimine çeşitli aktivatörlerin bağlanmaları gösterilmektedir (50). Karbonik anhidraz enzimi aktivatörleri (CAA) His 64 rezidüsünün proton mekiği etkisine katkıda bulunarak enzimin OH⁻ türlerinin oluşumunun artması enzimin aktivitesini arttırmaktadır (49, 50). Bu katkıyı Asn62, Asn67 ve Gln92’nin yan zincirleri ile H bağları kurarak aktif bölgedeki H bağı ağının yeniden düzenlenmesine yol açarak yapmakta ve. böylece ek proton mekiği görevi görmektedir (22).



Şekil 17. X-ışını kristalografisi ile belirlenen insan karbonik anhidraz II-aktivatör komplekslerinin gösterimi. Enzim omurgası yeşil renkle gösterilmiştir, Zn(II) iyonu üç His ligandıyla (94, 96 ve 119 numaralı kalıntılar) mor küredir. His64, proton mekiği kalıntısı kırmızı renktedir (yalnızca ‘in’ konformasyonu gösterilmiştir). Aktivatörler şunlardır: pembe renkte histamin; L-His, altın rengi; D-His, gök mavisi; L-Phe, macenta renginde; Sarı renkte D-Phe ve gri renkte D-Trp (Supuran’dan, 50).

Karbonik anhidraz aktivatörlerinin farmakolojik olarak kullanılabileceği alanlardan biri CA izoenzimlerinin genetik eksikliği sonucu görülen patolojilerdir (50). CA II izoenziminin genetik eksikliği sonucu gelişen osteopetroz, serebral kalsifikasyon, renal tübüler asidoz örnek olarak verilebilir. Ayrıca CA IV, XII gibi farklı izoenzimlerinin eksikliği de çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmektedir (5, 50). Karbonik anhidraz aktivatörlerinin kullanılabileceği bir diğer alan sinaptik etkinlik, uzamsal öğrenme ve hafızanın farmakolojik olarak güçlendirilmesidir. Ayrıca Alzheimer, demans gibi nörolojik bozukluklarda hafıza güçlendirilmesi için kullanılabileceği düşünülmektedir. Hafızanın

güçlendirilmesi dışında obsesif kompulsif bozukluk, yaygın anksiyete bozukluğu, fobiler, travma sonrası stres bozukluğu gibi durumlarda da olumlu etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir (49-52). Karbonik anhidraz aktivatörlerinin kullanılabileceği başka bir alanda kemik mineralizasyon süreçleridir (50, 51). Karbonik anhidraz aktivatörleri inorganik tuzların (kalsiyum karbonat gibi) oluşumunu arttırdığı yakın zamanda yapılan çalışmalarda gösterilmektedir. Böylece yapay kemik fragmanları elde edilmesinde doku mühendisliği alanı için kullanılabileceği düşünülmektedir (7, 50). Bu olumlu etkiler henüz araştırılma aşamasındadır ve klinik kullanımda veya geliştirilmekte olan pek çok farklı ilacın bulunduğu CAi'lerden farklı olarak, şu anda klinik kullanımda olan herhangi bir CAA bulunmamaktadır (7).

2.2.4. Karbonik Anhidraz I İzoenzimi

İnsan CA I izoenziminin sekanslanması 1970'li yıllarda yapılmıştır. CA I izoenzimi 260 rezidü içerir ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 30 kDa'dır (53-55). Şekil 18'de hCA I'in üçüncül yapısı gösterilmektedir. İnsanlarda CA I izoenzimi Tablo 1'de belirtildiği gibi eritrositler, gastrointestinal sistem, adipoz doku gibi dokularda bol bulunmaktadır (9, 26, 27). Karbonik anhidraz I eritrositlerde hemoglobinden sonra en bol bulunan proteindir (22, 26). Karbonik anhidraz II'den yaklaşık beş ila altı kat fazla miktarda olmasına rağmen CA II'nin katalitik aktivitesinin %15'i kadar aktivite göstermektedir (22, 26, 57).



Şekil 18. hCA'in üçüncül yapısı (Lago'dan, 57)

Karbonik anhidraz I izoenzimi, pH hemoastazisinin sağlanması, CO₂'nin akciğerlere taşınması gibi fizyolojik süreçlerde yer alır (58). Karbonik anhidraz I izoenzimi

aktivitesindeki değişim anemi, kronik asidoz, proliferatif diyabetik retinopati ve diyabetik maküler ve vazojenik ödemler gibi patolojik süreçlerle ilişkilendirilmektedir (58, 59). Ayrıca CA I izoenziminin küçük hücre dışı akciğer kanseri, prostat kanseri, eritrosit farklılaşması, diyabetik nefropati, amiotrofik lateral skleroz (ALS), ankilozan spondilit gibi patolojilerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği öngörülmektedir (26, 58-60).

2.2.5. Karbonik Anhidraz II İzoenzimi

İnsan karbonik anhidraz izoenzimleri arasında katalitik aktivitesi en yüksek izoenzim CA II izoenzimidir. Vücutta hemen hemen her doku veya organda bulunmaktadır (22, 26, 53, 61). Karbonik anhidraz II'nin kristal yapısı ilk kez 1972 yılında tanımlanmıştır (62). Karbonik anhidraz II 259 rezidü içerir ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 29 kDa'dur (22, 63). Karbonik anhidraz II'nin üçüncül yapısı Şekil 19'da görülmektedir.



Şekil 19. hCA II'nin üçüncül yapısı (Lago'dan, 57)

Karbonik anhidraz II vücudumuzda en bol bulunan izoenzim olması sebebiyle en çok araştırılan CA izoenzimidir (5, 61). Karbonik anhidraz II izoenzimi $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ arasındaki dengenin korunması, pH hemoastazisinin sağlanması, kemik rezorpsiyonu, aköz humör üretimi, sperm hareketliliği, idrar asitleşmesi gibi fizyolojik olaylarda rol almaktadır (22, 27). Karbonik anhidraz II izoenziminin fizyolojik önemi sonucu seviyesindeki dengesizlik Tablo 1'de gösterildiği gibi epilepsi, glokom, yüksek irtifa hastalığı gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmektedir (27, 28). Karbonik anhidraz II inhibitörleri bu patolojilerde terapötik hedef olarak kullanılmaktadır (61). Karbonik anhidraz II'nin ateroskleroz, gastrointestinal stromal tümörler gibi çeşitli patolojilerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği de düşünülmektedir (26). Ayrıca CA II geninde görülen mutasyonlarda çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmektedir. Karbonik anhidraz II izoenzimi geninde ilk mutasyon 1983 yılında Sly ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Bu mutasyonda

bireylerde osteopetroz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon görülmektedir. İlerleyen çalışmalarda bu bulgulara gelişimsel gecikme, zeka geriliği, boy kısalığı ve hastalar ergenliğe ulaşmadan önce çoklu kemik kırıkları da eklenmiştir. Bu durum CA II eksikliği sendromu olarak adlandırılmaktadır (5, 26).

2.3. Furanokumarinler

Furanokumarinler, kumarinin bir furan halkası ile kondenzasyonu sonucu oluşan, bitkileri mantar, bakteri ve böcek saldırılarına karşı korumak için üretilen doğal pestisitlerdir (64, 65). Furanokumarinlerin yüksek bitkilerde tanımlanmasına rağmen Apiaceae, Moraceae, Fabaceae ve Rutaceae olmak üzere 4 ana familyaya ayrılabilir (66). Kumarin ana yapısına furan halkasının bağlanmasına göre açısall (angelicin, pimpinellin, sphondin, isobergaptin vb.) ve doğrusal furanokumarinler (psoralen, bergaptin, ksantotoksin, triokssalen, izopimpinellin, bergamottin vb.) şeklinde sınıflandırılabilir (65, 67, 68). Psoralen doğrusal, angelicin ise açısall izomerlerin öncüsü olan temel furanokumarinlerdir (65, 67). Yapılan çeşitli çalışmalar, furanokumarinlerin antioksidan, antiinflamatuar, antibakteriyal, antikanser gibi çeşitli olumlu etkilere sahip olduğunu göstermiştir (65, 67).

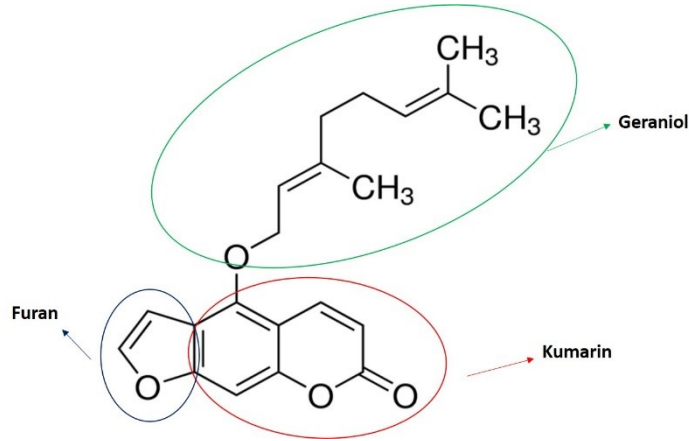
Gıdalardaki furanokumarinlerin içeriği değişebilmektedir. En fazla Apiaceae familyasına ait bitkilerde bulunmaktadır. Rutaceae familyasında ise miktarı düşüktür (68, 69). Örneğin greyfurt sularındaki bergamottin konsantrasyonu sadece yaklaşık $6 \mu\text{g g}^{-1}$ 'dir (68). Yenilebilir sebze ve meyveler içerisinde en yüksek furanokumarin içeriği $145 \mu\text{g g}^{-1}$ ile yaban havucunda (*Pastinaca Sativa*) bulunmaktadır (68, 69). Ayrıca furanokumarinler bitkilerin yapraklarında ve diğer yeşil kısımlarda meyve ve köklere oranla daha fazla miktarda bulunmaktadır. Mekanik hasar, böcek veya mantar saldırısı ve elverişsiz iklim, depolama koşulları gibi çeşitli stres faktörlerinin etkisi ile furanokumarin içeriği artabilmektedir. Isıya dayanıklı yapıları ile pişirme sırasında bitkilerdeki furanokumarin içeriği değişmemektedir. Çeşitli besin hazırlama işlemleri sırasında ise bitkilerde meydana gelen hasar sebebi ile furanokumarin içeriği artabilmektedir. Bitkilerin soyulması furanokumarinleri azaltmanın en iyi yollarından biridir (68, 70).

Rutaceae familyası, Avustralasya, Amerika ve Güney Afrika'nın tropikal ve ılıman bölgelerinde yaygın bir dağılıma sahiptir ve bazı türleri geleneksel halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Rutaceae familyası terpenoidler, flavonoidler, kumarinler gibi doğal ve biyoaktif bileşikler açısından zengin bir içeriğe sahiptir ve antimikrobiyal, antiviral, anti-

proliferatif gibi sağlık için olumlu etkiler göstermektedir (71). Rutaceae familyası en çok yenilebilir meyveleri (portakal, limon, mandalina ve greyfurt) nedeniyle dünya çapında yaygın olarak yetiştirilen Asya kökenli özel bir cins olan *Citrus L.* ile tanınır (72). Rutaceae familyası türlerinde furanokumarinler narenciye kabuğunun karakteristik bileşenleridir (69). Narenciyelerde bulunan ana furanokumarin ise bergamottindir (68). Bu türler arasında yapılan araştırma sonucunda narenciyeler arasında en yüksek furanokumarin içeriğine sahip olan meyve greyfurt (*Citrus Paradisi*) olmuştur ve greyfurt suyu etkisi olarak adlandırılan etkiye sebep olmaktadır (69). Greyfurt suyunda bulunan ana furanokumarinler bergaptol, bergamottin ve 6',7'-dihidroksi bergamottindir (73). Bu furanokumarinlerden bergamottin ve 6',7'-dihidroksibergamottin greyfurt suyu etkisinden sorumlu tutulmaktadır (74).

2.3.1. Bergamottin

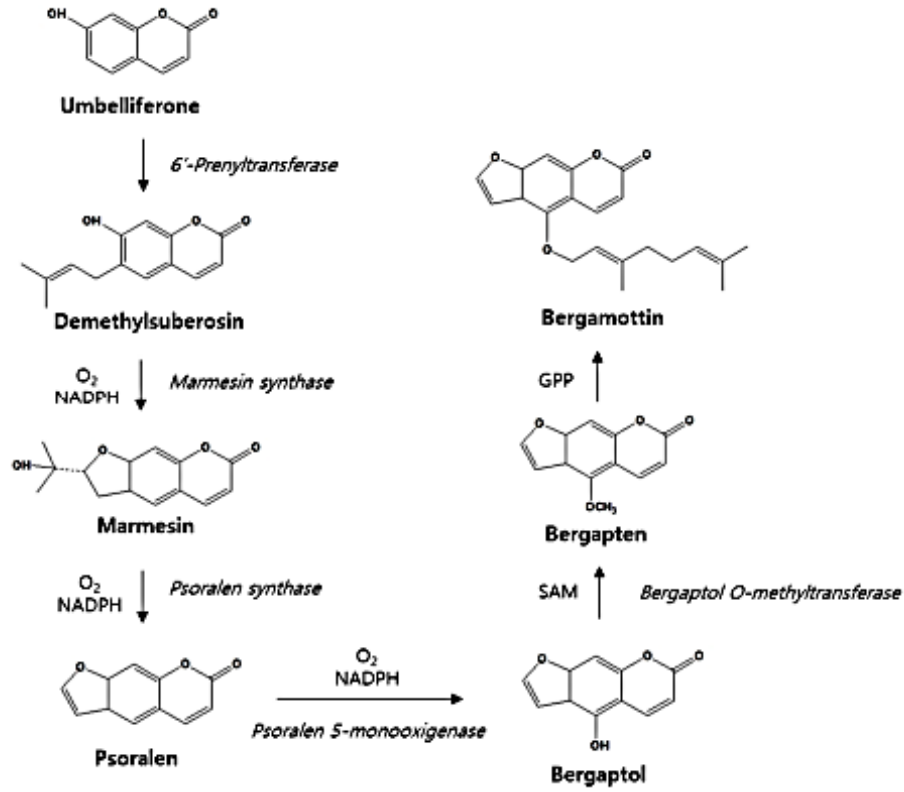
Bergamottin ilk olarak *Citrus bergamia* yağında tespit edilmiştir ve ismi de buradan gelmektedir (74). Bergamottinin kimyasal adı 4-[(2E)-3,7-dimetilokta-2,6-dienoksi]furo[3,2-g]kromen-7-on'dur (75). Bergamottinin molekül formülü $C_{21}H_{22}O_4$ 'tür ve molekül ağırlığı ise 338.4 g/mol'dür (74). şekil 20'de bergamottinin kimyasal yapısı görülmektedir.



şekil 20. BGM'nin kimyasal yapısı (Luo'dan, 76)

Bergamottin umbelliferoneden sentezlenir. Sentezin ilk basamağında umbelliferonun alkilasyonu yoluyla oluşan demetilsuberosin oluşur. Oluşan demetilsuberosin Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve O₂ varlığında marmesine dönüştürülür. Marmesin daha sonra NADPH ve O₂ varlığında psoralen sentez

tarafından psoralene dönüştürülür. Oluşan psoralen 5 monooksijenaz tarafından psoralen bergaptol dönüştürülür. Ardından bergaptolün S-adenozil metiyonin ile metillenmesi sonucu bergaptene oluşur. Sentezin son adımında ise bergaptene bir geranil pirofosfat eklenmesi ile bergamottin oluşur (74). Şekil 21’de BGM biyosentezi gösterilmektedir.



Şekil 21. BGM'nin biyosentez yolu (Ko'dan, 74)

Bergamottinin sitokrom P450 (CYP) sistemi tarafından metabolizması sonucu oluşan reaktif ara ürünler P450 enzimlerinin inhibisyonuna sebep olmaktadır (74). Bergamottin CYP3A4'ün geri dönüşümlü inhibisyona sebep olmaktadır (77). Ayrıca CYP1A1, CYP1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 aktivelerini de baskılayabilmektedir (74, 78).

Bergamottinin yapılan çalışmalarda akciğer kanseri, cilt kanseri, multipl miyelom, lösemi, meme kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerde koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (74, 79-82). Bergamottinin antikanser etkisine ek olarak antiviral, antioksidatif, antiinflamatuvar, antidiyabetik, hepatoprotektif, antiobezite etkileri de bulunmaktadır (74, 83-85).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar, Ekipmanlar ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, ekipmanlar ve malzemelerin marka ve modelleri Tablo 3'te detaylı olarak sunulmuştur.

Tablo 3. Deneylerde kullanılan cihaz, ekipman ve malzemelerin marka ve modelleri

Cihaz, Ekipman ve Malzeme	Marka/Model
Saf su cihazı	Elga Purelab® Classic
Soğutucu dolap	Hotpoint Ariston NMTL 1928 FW
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
Karıştırıcı (Vorteks)	IKA Vorteks Genius 3
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA RH BASIC 2
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Yarı-otomatik pipet (1-20 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (20-200 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (100-1000 µL)	Eppendorf
Yarı-otomatik pipet (1-5 mL)	Eppendorf
pH-metre	HANNA Instruments HI 2211 pH/ORP Meter
CO ₂ Tüp	
Mikroplate Okuyucu	VersaMax
Cam Deney Tüpleri	SH&GLASS

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasalların ve çözeltilerin isimleri, ürün kodları ile üretici firmalarına ilişkin bilgiler Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. Deneylerde kullanılan kimyasalların isimleri, üretici firmaları ve ürün kodları

Kullanılan Kimyasallar	Üretici Firmalar ve Ürün Kodları
İnsan eritrosit karbonik anhidraz I	Sigma-Aldrich, C4396-5 mg
İnsan eritrosit karbonik anhidraz II	Sigma-Aldrich, C6165-5 mg
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Sigma-Aldrich, T1503-1 kg
Hidroklorik asit	Carlo Erba, 7647-01-0, % 37
<i>p</i> -Nitrofenil Asetat	Sigma-Aldrich, N8130-10 g
Asetazolamid	Sigma-Aldrich, A-6011
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma-Aldrich, D8418
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma-Aldrich, 415413
H ₂ SO ₄ (Sülfürik asit)	Sigma-Aldrich, 258105
Aseton	Sigma-Aldrich, 650501
HEPES (Sodium 2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethanesulfonate)	BLDpharm- Cat. No.BD17232-100g
Bergamottin	BLDpharm- Cat. No. BD116395
L-Histidin	Sigma-Aldrich, H8125-5g

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanma yöntemi ve hazırlanan çözeltilerin saklanması/kullanılması hakkındaki öneriler aşağıda belirtilmektedir. Farklı bir kullanım şekli önerisi olmadıkça çözeltiler kullanılana kadar +4 °C’de saklandı. Esteraz aktivitesi deneyleri oda sıcaklığında, hidrataz aktivite deneyleri ise buz soğukluğunda gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan CA, BGM, AZM ve L-Histidin (HIS) çözeltileri hidrataz aktivitesi ölçümü için HEPES tamponunda, esteraz aktivitesi ölçümü için ise Tris-SO₄ tamponunda hazırlandı.

1 M NaOH: 4 g NaOH saf suda çözülerek son hacmi 100 mL’ye tamamlandı ve tampon çözeltilerin pH’larının ayarlanmasında kullanıldı.

1 M HCl: Yoğunluğu 1.18 g/mL olan %37’lik stok HCl’den 8.16 mL alınıp bir miktar saf suya eklendi, hacmi saf su ile 100 mL’ye tamamlandı ve tampon çözeltilerin pH’larının ayarlanmasında kullanıldı.

1 M H₂SO₄ çözeltisi: Yoğunluğu 1.84 g/mL olan %98’lik stok H₂SO₄ ‘den 2.72 mL alınıp bir miktar saf suya eklendi ve hacmi saf su ile 50 mL’ye tamamlandı ve tampon çözeltilerin pH’larının ayarlanmasında kullanıldı.

0.05 M Tris-SO₄ (pH = 7.4) tampon çözeltisi: 6.05 g tris (hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözüldü, çözeltinin pH'sı 1 M H₂SO₄ ile 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı ve Esteraz Aktivitesi Tayini (EAT) ölçümlerinde tampon çözelti olarak kullanıldı.

3 mM *p*-nitrofenil asetat (substrat): 135 mg *p*-nitrofenil asetat 5 mL aseton ile çözüldü ve magnetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılan 245 mL saf suya yavaşça damla damla ilave edilerek hazırlandı. EAT ölçümleri için substrat olarak kullanılan bu çözelti günlük olarak deneyden hemen önce hazırlanarak ölçüm yapıldı.

25 mM HEPES çözeltisi (pH = 8.9): 6.64 g HEPES 800 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH'sı 8.8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Hidrataz Aktivitesi Tayini (HAT) deneylerinde tampon olarak kullanılacak olan bu çözelti günlük olarak deneyden hemen önce hazırlandı.

hCA I çözeltisi: 34.48 µM (1000 mg/mL) stok hCAI çözeltisinden esteraz aktivitesi için Tris-SO₄ tamponu ile hidrataz aktivitesi için HEPES tamponu ile seyreltilerek 20-500 nM konsantrasyona sahip hCA I enzim çözeltisi hazırlandı.

hCA II çözeltisi: 34.48 µM (1000 mg/mL) stok hCA II çözeltisinden esteraz aktivitesi için Tris-SO₄ tamponu ile hidrataz aktivitesi için HEPES tamponu ile seyreltilerek 2-50 nM konsantrasyona sahip hCA II enzim çözeltisi hazırlandı.

Doygun CO₂ çözeltisi: 250 mL saf sudan (buz soğukluğunda) 40-45 dakika boyunca CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

15 mM asetazolamid: 6.7332 mg AZM, 1 M NaOH ile çözüldükten sonra HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile son hacmi 2 mL'ye tamamlandı. AZM ana stok çözeltisi kullanılarak reaksiyon ortamında son konsantrasyon 0-200 µM olacak şekilde AZM ara stok çözeltileri HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile seyreltilerek günlük olarak hazırlandı.

15 mM L-Histidin çözeltisi: 4.7256 mg histidin tartılarak HEPES/Tris-SO₄ tamponunda çözüldü ve üzeri HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile 2 mL'ye tamamlandı. Histidin ana stok çözeltisi kullanılarak reaksiyon ortamında son konsantrasyon 0-1000 µM olacak şekilde histidin ara stok çözeltileri HEPES/Tris-SO₄ tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

Bergamottin çözeltisi: Bergamottin Stok Çözeltisi (1 mM): 0.3384 mg BGM tartıldı, %5'lik 0.1 mL dimetilsülfoksit (DMSO) ve 0.9 mL Tris-SO₄ çözeltisi ile çözüldü. BGM'nin dozları önceki çalışmalara dayalı olarak seçildi. BGM stok çözeltisi kullanılarak

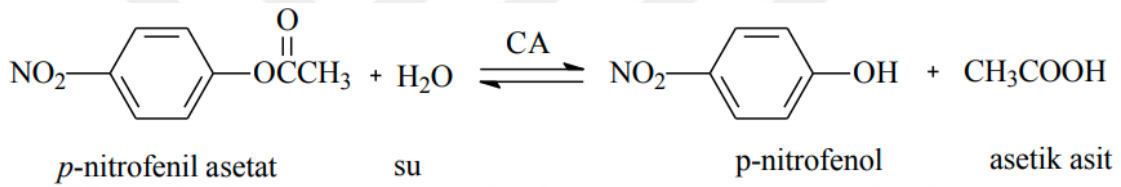
0, 10, 50, 100, 500, 750 ve 1000 µM konsantrasyonda BGM çözeltileri Tris-SO₄ tamponu ile seyreltilerek hazırlandı.

3.4. Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Tayini

Çalışmada kullanılan ve elde edilen hacim ve konsantrasyonlar için kullanılan değerler reaksiyon ortamındaki nihai değerlerdir.

3.4.1. Karbonik Anhidrazın Esteraz Aktivitesi Tayini

Esteraz aktivitesi tayin yönteminin prensibi, CA enziminin ortamda bulunan ester bileşiklerini hidroliz etme yeteneğine dayanmaktadır. Şekil 22’de verilen reaksiyona göre, CA substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil asetatı 348 nm’de absorbans veren *p*-nitrofenol’e ve asetik aside hidroliz etmektedir (55).



Şekil 22. *p*-nitrofenol asetatın CA tarafından *p*-nitrofenol ve asetik aside dönüştürülme reaksiyonu

Esteraz aktivitesi tayini çalışmasında, her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler alınarak Eşitlik 5’e göre enzim aktivitesi hesaplandı. Tüm deneyler sabit sıcaklıkta gerçekleştirildi.

$$EA \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{\Delta A \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot b \cdot x \cdot t \cdot x \cdot v} = \frac{\Delta A \cdot 300 \mu L \cdot 10^6}{5 \cdot 10^3 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot 1 cm \cdot 3 dk \cdot 20 \mu L} = \Delta A \cdot 1000 \mu mol \cdot dk^{-1} \cdot L^{-1}$$

$$= \Delta A \cdot 1000 / L \quad (\text{Eşitlik 5})$$

EA= Enzim aktivitesi (U/L)

ΔA = 3 dakika sonundaki absorbans değişimi

V= Toplam hacim (300 µL)

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı ($5 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$)

b= Işık yolu (1 cm)

t= zaman (3 dk)

v= Örnek hacmi (20 µL)

U= Ünite

3.4.1.1. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

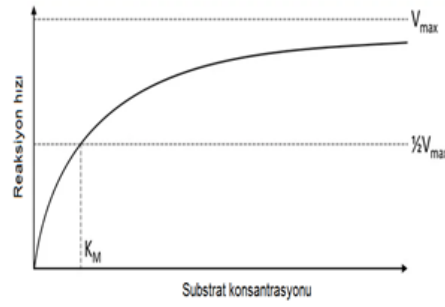
Uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla mikrolate 130 µL tampon (Tris-SO₄ tamponu (0.05 M; pH: 7.4)); 20 µL CA I (20-500 nM aralığında) veya CA II (2-50 nM aralığında) enzim çözeltisi ve 150 µL substrat bileşiği (3 mM *p*-nitrofenilasetat) eklendi ve mikrolate okuyucu kullanılarak 348 nm dalga boyunda 20 saniye aralıklarla 10 dakika boyunca kinetik okuma yapıldı. Çalışmamızda 2.40'ıncı saniyedeki absorbans değerleri birinci okuma ve 5.40'ıncı dakikadaki absorbans değerleri ikinci okuma olarak kullanıldı. EAT konsantrasyon belirleme deneylerinde kullanılacak çözeltiler ve miktarları Tablo 5'te gösterilmiştir. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler alınarak Eşitlik 5'e göre enzim aktivitesi hesaplandı. Tüm deneyler sabit sıcaklıkta gerçekleştirildi.

Tablo 5. Karbonik anhidraz esteraz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol	Numune
Tris-SO ₄ tamponu (0.05 M; pH: 7.4)	150 µL	130 µL
İnsan CA I veya II Enzim Çözeltisi (6 nM)	-	20 µL
<i>p</i> -nitrofenilasetat (3 mM)	150 µL	150 µL
UV spektrofotometre kullanılarak 348 nm dalga boyunda birinci okuma		A _i
UV spektrofotometre kullanılarak 348 nm dalga boyunda ikinci okuma		A _s

3.4.1.2. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II izoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

Kinetik sabitlerin (K_m ve V_{max}) saptanması amacı ile optimum şartlarda CA I ve II izoenzimlerinin (konsantrasyon sabit tutularak CA I için 100 nM, CA II için 15 nM), substratın (başlangıç *p*-nitrofenilasetat konsantrasyonu 0.05-1.5 mM) on farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı ve aktivite değerleri hesaplandı. Aktivite ölçümünde kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonları Tablo 6'da verilmektedir. Reaksiyon hızı- substrat konsantrasyonu Michaelis-Menten grafiği çizilerek V_{max} ve K_m değerleri belirlendi (Şekil 23).



Şekil 23. Çalışmada, farklı başlangıç substrat konsantrasyonlarında ölçülen hız (aktivite) değerlerine dayanarak oluşturulan Michaelis-Menten grafiği örneği

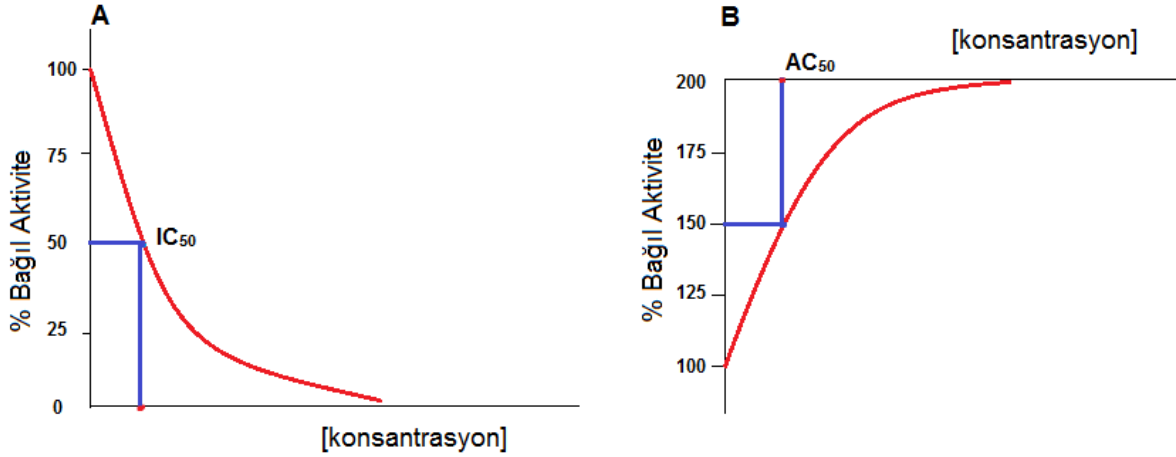
Tablo 6. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonu

Eklenme Sırası		1	2	3
<i>p</i> -nitrofenilasetat		Tris-SO ₄ tamponu (0.05 M; pH: 7.4)	İnsan CA I/CA II Enzim Çözeltisi	<i>p</i> -nitrofenilasetat
Konsantrasyon		Hacim		
1	1.5 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
2	1.25 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
3	1 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
4	0.75 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
5	0.625 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
6	0.5 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
7	0.375 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
8	0.25 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
9	0.125 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
10	0.5 Mm	130 µL	20 µL	150 µL
K	1.5 Mm	150 µL		150 µL

3.4.1.3. Karbonik Anhidraz I ve II İzenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerinde Asetazolamid, L-Histidin ve Bergamottinin Etkisinin Belirlenmesi

Bergamottinin CA I ve II esteraz aktivitesi üzerine etkisini incelemek için deney tüplerine Tablo 7’de belirtildiği hacimlerde pipetlemeler yapıldıktan sonra aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler hesaplandı. Elde edilen sonuçlarla BGM için [BGM] - % bağıl aktivite grafiği çizildi. [BGM] - % bağıl aktivite grafiğine göre aktivitenin %50 azaldığı BGM konsantrasyonu IC₅₀ değeri olarak (Şekil 24 A) belirlendi. Aynı ölçümler inhibitör etkisini doğrulamak için AZM kullanılarak

Tablo 7’de belirtilen hacimlerde pipetlemeler yapılarak tekrarlandı. Elde edilecek ölçüm sonuçları kullanılarak hesaplamalar yapıldı. AZM için IC₅₀ (Şekil 24A), L-histidin için AC₅₀ (Şekil 24B) değerleri belirlendi.



Şekil 24. A) Enzim aktivitesi üzerine inhibitör etkisinin belirleneceği örnek grafik (IC₅₀), B) Enzim aktivitesi üzerine aktivatör etkisinin belirleneceği örnek grafik (AC₅₀).

Tablo 7. İnsan CA I ve II izoenzimlerinin AZM, HIS ve BGM’nin etkisinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları ve konsantrasyonu

Tampon/Reaktifler	Tüpler ⁺										
	Kontrol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Son konsantrasyon AZM [©] (µM)	0	0	0.1	1	5	10	40	80	120	160	200
L-Histidin [#]	0	0	0.2	2	20	200	400	800	1000		
BGM *	0	0	0.0002	0.002	0.02	0.2	2	20	50	100	200
Tris-SO ₄ tamponu (µL)	150	130	110	110	110	110	110	110	110	110	110
hCA I veya II (µL)	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Miktar (µL) AZM	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20
L-Histidin	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20
BGM	-	-	20	20	20	20	20	20	20	20	20
p-nitrofenil asetat (µL)	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Toplam hacim (µL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Absorbans ^a	A _{i0}	A _{i1}	A _{i2}	A _{i3}	A _{i4}	A _{i5}	A _{i6}	A _{i7}	A _{i8}	A _{i9}	A _{i10}
Absorbans ^a	A _{s0}	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀

[©] (86); [#] (87); * (88, 89)

⁺ Reaksiyon tüpleri substrat eklenmeden önce 15 dakika oda sıcaklığında tutulacaktır.

^a 348 nm dalga boyu; A_i: 0. dakika absorbansı; A_s:3. dakika absorbansı.

3.4.2. Karbonik Anhidrazın Hidrataz Aktivitesi Tayini

İnsan CA hidrataz aktivitesi bazı değişiklikler yapılan Wilbur-Anderson yöntemine göre ölçülecektir. Bu yöntemin esası ortamda substrat olarak bulunan CO₂'in hidrasyonu sonucu ortaya çıkan H⁺ iyonunun ortamın pH'sını 8.2'den 7.0'a düşürmesi için geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır (90).

İnsan CA I ve II (insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır; Sigma, St Louis, MO, ABD) tarafından katalize edilen CO₂ hidrasyon hızı, buz soğukluğunda pH'daki düşüş hızının gözlemlenmesiyle elektrometrik olarak belirlendi. Hidrataz aktivite tayini deneylerinde kullanılacak çözeltiler ve miktarları Tablo 8'de gösterilmiştir. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler hesaplandı. CO₂ kaçışını önlemek amacıyla reaksiyon tüpüne yerleştirilen pH elektrodunun üst kısmı kauçuk bir bilezikle çevrelendi. Katalizlenmemiş (enzimsiz) CO₂ hidrasyon değerleri, enzim katalizli olanlardan çıkarılarak körleme yapıldı.

CO₂ hidrataz aktivitesi birimi (EU), $EU = (t_0 - t_c) / t_c$ denklemi kullanılarak hesaplandı; burada t_0 ve t_c , sırasıyla enzimatik olmayan (kontrol) ve enzimatik (numune) reaksiyonların pH değişimi sürelerini temsil eder.

Tablo 8. Karbonik anhidraz hidrataz aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kontrol	Numune
HEPES Tamponu (son konsantrasyon 25 mM; pH: 8.9)	2500 µL	2400 µL
İnsan CA I veya II Enzim Çözeltisi	-	100 µL
Deiyonize Su (%100 CO ₂ gazı ile doyurulmuş)	2500 µL	2500 µL
pH'nın 8.2'den 7.0'a düşme süresi (saniye)	t_0	t_c

3.4.2.1 İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Toplam 2.5 mL'lik nihai hacim elde etmek için HEPES'e (son konsantrasyonu 12.5 mM; pH = 8.8) 100 µL hCA I veya II ilave edildi. Reaksiyon, %100 CO₂ gazı ile doyurulmuş 2.5 mL buz soğukluğunda deiyonize suyun eklenmesiyle başlatıldı. Reaksiyon tüpü soğuk bir ortam sağlamak için buz banyosunda tutuldu ve pH'nın 8.2'den 7.0'a

düşme süresi, bir dijital pH metreye bağlanan bir cam pH elektrodu ile sürekli olarak izlendi ve geçen süre ölçüldü.

3.4.2.2. İnsan Karbonik Anhidraz I ve II izoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Tayin Yöntemiyle Kinetik Sabitlerinin Belirlenmesi

Kinetik sabitlerin (K_m ve V_{max}) saptanması amacı ile optimum şartlarda CA I ve II izoenzimlerinin konsantrasyon sabit tutularak (CA I için 100 nM, CA II için ise 15 nM), substratın %100 CO₂ ile doyurulduğu 2.5 mL buz soğukluğunda deiyonize su (başlangıç CO₂ konsantrasyonu=38 mM) kullanarak 5 farklı konsantrasyonunda enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Substrat konsantrasyonu %100 CO₂ ile doyurulmuş buz soğukluğunda deiyonize suyun hacmi azaltılarak ayarlandı ve azaltılan miktar kadar deiyonize su ilave edilerek son substrat hacmi olan 2.5 mL hacim tamamlandı. Elde edilecek ölçümler kullanılarak aktivite değerleri hesaplandı. Reaksiyon hızı-substrat konsantrasyonu Michaelis-Menten grafiği çizilerek V_{max} ve K_m değerleri belirlendi (Şekil 23). Bu değerler bize deney prosedürünün doğru çalıştığını gösterdi.

Tablo 9. İnsan CA I ve CA II izoenziminin kinetik sabitlerinin (K_m ve V_{max}) belirlenmesi için kullanılacak çözeltilerin miktarları ve konsantrasyonları

Eklenme Sırası	1	2	3	4
	HEPES Tamponu	İnsan CA I/CA II Enzim Çözeltisi (Belirlenen Konsantrasyon)	Deiyonize Su (buz soğukluğunda)	Deiyonize Su (%100 CO ₂ gazı ile doyurulmuş, buz soğukluğunda)
Kontrol	2500 µL	-	-	2500 µL
1	2400 µL	100 µL	2500 µL	-
2	2400 µL	100 µL	2000 µL	500 µL
3	2400 µL	100 µL	1500 µL	1000 µL
4	2400 µL	100 µL	1250 µL	1250 µL
5	2400 µL	100 µL	1000 µL	1500 µL
6	2400 µL	100 µL	750 µL	1750 µL
7	2400 µL	100 µL	500 µL	2000 µL
8	2400 µL	100 µL	250 µL	2250 µL
9	2400 µL	100 µL	-	2500 µL

3.4.2.3. Karbonik Anhidraz Hidrataz Aktivitesi Üzerine Asetazolamid, L-Histidin ve Bergamottinin Etkisinin Belirlenmesi

Bergamottinin CA I ve II hidrataz aktivitesi üzerine etkisini incelemek için deney tüplerine Tablo 10'da belirtilen hacimlerde pipetlemeler yapıldıktan sonra ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarla BGM için [BGM]-% bağıl aktivite grafiği çizildi. BGM için aktivitenin %50 azaldığı BGM konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Şekil 24A). Aynı ölçümler inhibitör etkisini doğrulamak için AZM için Tablo 10'da belirtilen hacimlerde pipetlemeler yapılarak tekrarlandı. Elde edilecek ölçüm sonuçları kullanılarak hesaplamalar yapıldı. AZM için IC_{50} (Şekil 24A) ve L-Histidin için AC_{50} (Şekil 24B) değerleri belirlendi. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanıp ortalama değerler hesaplandı.

Tablo 10. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin hidrataz aktivitesi üzerine AZM, HIS ve BGM etkisinin tayini için reaksiyon karışımları

Tampon/Reaktifler		Tüpler ⁺									
		Kontrol 1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Son konsantrasyon (µM)	AZM [®]	0	0	0.001	0.01	0.05	0.1	1	10	100	1000
	L-Histidin [#]	0	0	0.001	0.01	0.05	0.1	1	10	100	1000
	BGM [*]	0	0	10	50	100	200	400	600	800	1000
HEPES tamponu (mL)		2.5	2.4	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
hCA I veya hCA II (µL)		-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Miktar (µL)	AZM	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100
	L-Histidin	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100
	BGM	-	0	100	100	100	100	100	100	100	100
%100 CO ₂ (mL)		2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Toplam hacim (mL)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Süre (saniye) ^α		t _{0k}	t _{c1}	t _{c2}	t _{c3}	t _{c4}	t _{c5}	t _{c6}	t _{c7}	t _{c8}	t _{c9}

[©] (86); [#] (87); ^{*} (88, 89)

⁺ Reaksiyon tüpleri substrat eklenmeden önce 15 dakika buz banyosunda tutuldu.

^a pH'nın 8.2'den 7.0'a düşme süresi.

3.4.3. Sonuçların İfade Edilmesi ve Karşılaştırma

Tüm koşullarda yapılan aktivite ölçümleri 3 teknik tekrar olarak yapıldı ve ortalamaları alındı. Enzim aktivite tayinleri iki farklı testle yapılacağı için bağımsız tekrarlar (farklı günlerde, koşullarda) yapılmayacaktır. BGM için bulunan IC_{50} veya AC_{50}

konsantrasyon değeri, inhibitör için AZM ve aktivatör için L-Histidin değerleriyle karşılaştırıldı ve yorumlandı.

3.5. Moleküler Kenetleme Analizi

Çalışmamızda, karbonik anhidraz izoenzimleri CA I (PDB: 2FOY) ve CA II (PDB: 2FOU) yapıları RCSB veritabanından alındı (91, 92). Bergamottin molekülünün (PubChem: 5471349) üç boyutlu koordinatları PubChem'den temin edildi (93). Moleküler etkileşim simülasyonları, PyRx platformunda AutoDock Vina aracı kullanılarak yürütüldü. Simülasyon parametreleri optimize edilerek grid boyutları $15 \times 15 \times 15$ Å olarak belirlendi ve aktif bölge merkezli konumlandırma yapıldı (94, 95). Exhaustiveness değeri 8, enerji aralığı 3 kcal/mol ve maksimum konformasyon sayısı 9 olarak ayarlandı.

3.6. Moleküler Dinamik Simülasyon

Protein-ligand komplekslerinin dinamik davranışları GROMACS 2024.4 ile incelendi (96). Başlangıç yapıları UCSF Chimera ile hazırlandı ve PDBFixer kullanılarak optimize edildi. Proteinler AMBER99SB-ILDN ve sıvı faz TIP3P ile modellendi (97-100). Bergamottin molekülü ACPYPE aracılığıyla AM1-BCC yük hesaplamaları ve GAFF parametrisasyonu ile hazırlandı (101-103).

Sistemler rombik dodekahedron kutuda, fizyolojik tuz konsantrasyonunda (150 mM NaCl) hazırlandı. Enerji minimizasyonunu takiben, dengeleme aşamasında önce 300 ps NVT topluluğu (Berendsen termostatu, 310 K), ardından 1 ns NPT topluluğu (V-rescale termostat ve Berendsen barostat, 310 K, 1 bar) uygulandı.

100 ns'lik üretim simülasyonu 2 fs zaman adımıyla gerçekleştirildi. Sıcaklık ve basınç kontrolü V-rescale termostatu ve Parrinello-Rahman barostatu ile sağlandı. LINCS algoritması hidrojen bağlarını sabitlemek için kullanıldı. PME metodu ile elektrostatik hesaplamalar (kesim=1.2 nm) ve van der Waals etkileşimleri (kesim=1.2 nm, switch=1.0 nm) hesaplandı. Koordinatlar 100 ps aralıklarla kaydedildi.

Yapısal analizler GROMACS araçları ile gerçekleştirilip GraphPad Prism ile görselleştirildi.

4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan ve elde edilen hacim ve konsantrasyonlar reaksiyon ortamındaki nihai değerlerdir. Esteraz aktivitesi ölçümü deneyleri oda sıcaklığında, hidrataz aktivitesi ölçümü deneyleri ise buz soğukluğunda gerçekleştirildi.

4.1. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Karbonik Anhidraz I ve II Enzim Konsantrasyonu Aralığının Belirlenmesi

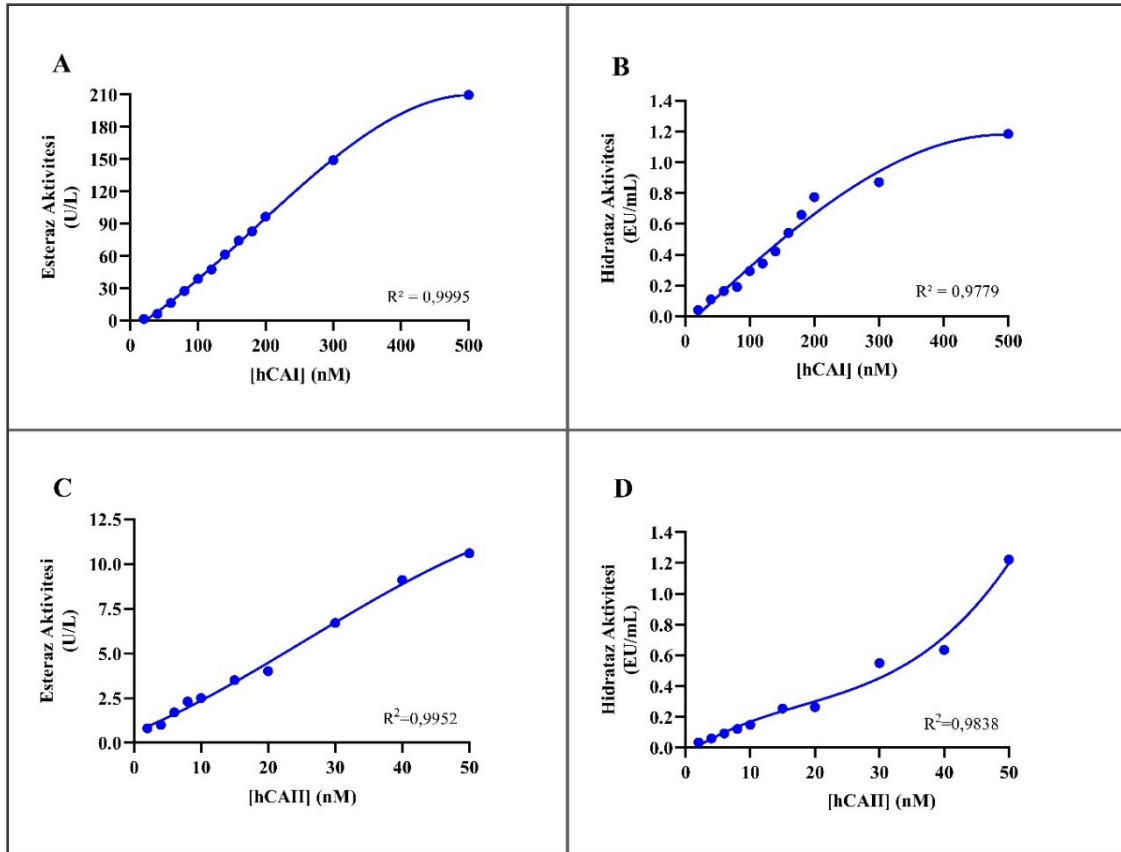
İnsan eritrositlerinden saflaştırılan ticari olarak satın alınan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisini değerlendirmek amacıyla esteraz ve hidrataz yöntemi kullanıldı. Esteraz aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılan enzim konsantrasyonu aralığını belirlemek için 1.5 mM substrat konsantrasyonunda (*p*-NPA) reaksiyon karışımındaki enzim konsantrasyonu hCAI için 0-500 nM, hCAII için 0-50 nM olacak şekilde esteraz aktivitesi tayini yapıldı. Hidrataz aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılacak enzim konsantrasyonu aralığını belirlemek için ise 19 mM substrat konsantrasyonunda (CO₂ ile doymuş saf su) reaksiyon karışımındaki enzim konsantrasyonu hCAI için 0-500 nM, hCAII için 0-50 nM olacak şekilde hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlar CA I için Tablo 11’de, CA II için Tablo 12’de sunulmuştur. Bu sonuçlara kullanılarak çizilen aktivite-konsantrasyon grafiği ise Şekil 25’de sunulmaktadır. Sonuçlar ve aktivite-konsantrasyon grafikleri incelendiğinde belirtilen şartlar altında yöntemin doğru çalıştığı ve hCAI için 0-500 nM, hCAII için 0-50 nM enzim konsantrasyonu aralığının uygun olacağı tespit edildi.

Tablo 11. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA I izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri

Konsantrasyon	Esteraz Aktivitesi	Hidrataz Aktivitesi
[CA I] (nM)	EA (U/L)	EA (EU/mL)
20	1.4	0,04
40	6.2	0,10
60	16.2	0,16
80	27.5	0,19
100	38.6	0,3
120	47.5	0,34
140	61.2	0,4
160	74.2	0,5
180	82.8	0,7
200	96.5	0,8
300	149.1	0,9
500	209.8	1,2

Tablo 12. Hidrataz ve esteraz aktivite ölçüm deneylerinde uygulanan hCA II izoenzimi konsantrasyonlarına karşılık elde edilen aktivite değerleri

Konsantrasyon	Esteraz Aktivitesi	Hidrataz Aktivitesi
[CA II] (nM)	EA (U/L)	EA (EU/mL)
2	0.8	0.03
4	1	0.06
6	1.7	0.09
8	2.3	0.12
10	2.5	0.15
15	3.5	0.25
20	4	0.26
30	6.7	0.55
40	9.1	0.6
50	10.6	1.2



Şekil 25. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimi aktivitesi ölçümü deneylerinde kullanılan çalışma konsantrasyon aralığını belirlemek için çizilen konsantrasyon-aktivite grafiği (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I'in hidrataz aktivitesi ölçümü (C) hCA II'in esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü

4.2. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

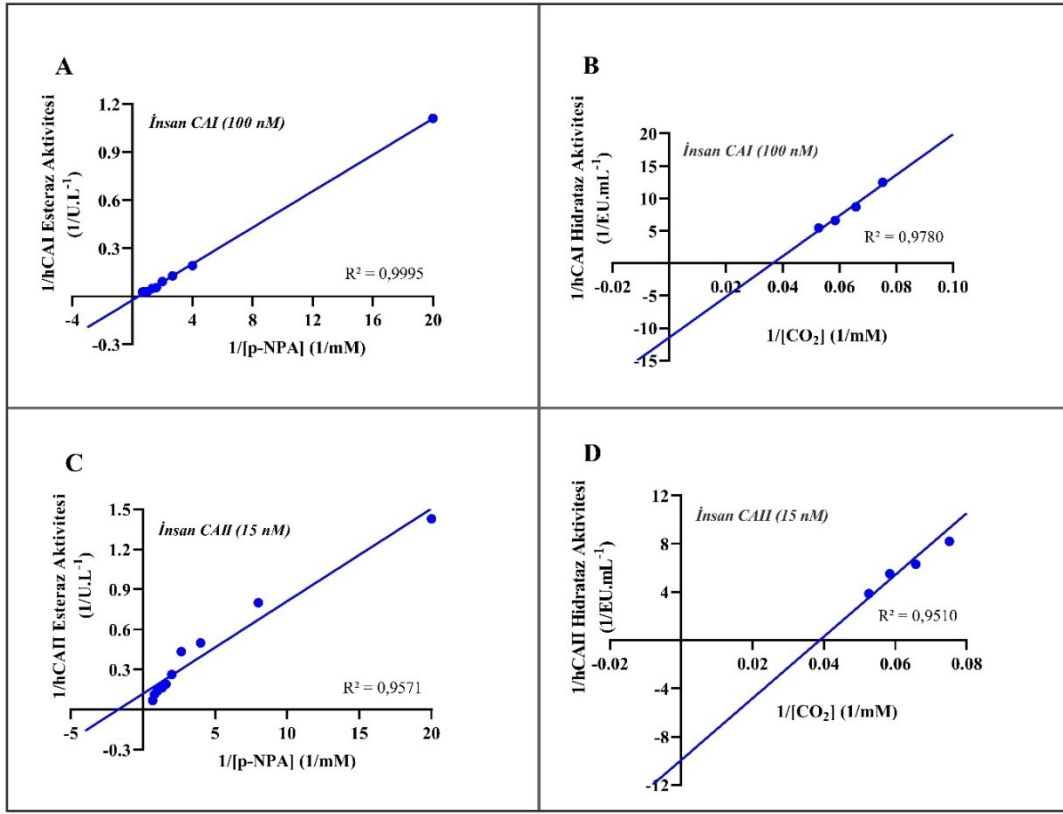
Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCAI:100 nM; hCAII:15 nM) p-nitrofenil asetat için 0.05-1.5 mM arasında değişen dokuz farklı substrat konsantrasyonunda reaksiyon karışımları hazırlandı ve esteraz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 13’de sunulmaktadır. Benzer şekilde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCAI:100 nM; hCAII:15 nM) CO₂ için 11.4-19 mM arasında değişen beş farklı substrat konsantrasyonunda reaksiyon karışımları hazırlandı ve hidrataz aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar Tablo 14’de sunulmaktadır. Elde edilen değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 26). Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak V_{max} ve K_m değerleri hesaplandı (Tablo 15).

Tablo 13. p-Nitrofenil asetat substratının farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait esteraz aktivite değerleri

Konsantrasyon	CA I	CA II
[p-NPA] (mM)	EA (U/L)	EA (U/L)
0.05	0.9	0.7
0.125	1.3	1.3
0.25	5.2	2
0.375	7.8	2.3
0.5	10.8	3.8
0.625	18	5.2
0.75	19.6	6.1
1	32.7	7.2
1.25	33.8	8.7
1.5	37	14.7

Tablo 14. CO₂’nin farklı konsantrasyonlarında hCA I ve hCA II izoenzimlerine ait hidrataz aktivitesi değerleri

Konsantrasyon	CA I	CA II
[CO ₂] (mM)	Aktivite (EU/ml)	Aktivite (EU/ml)
11.4	0.03	0.08
13.3	0.08	0.12
15.2	0.12	0.16
17.1	0.15	0.18
19	0.18	0.26



Şekil 26. Karbonik anhidraz I ve II enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için kullanılan Lineweaver-Burk grafikleri (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü sonucu (B) hCA I'in hidrataz aktivitesi ölçümü sonucu (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü sonucu (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü sonucu

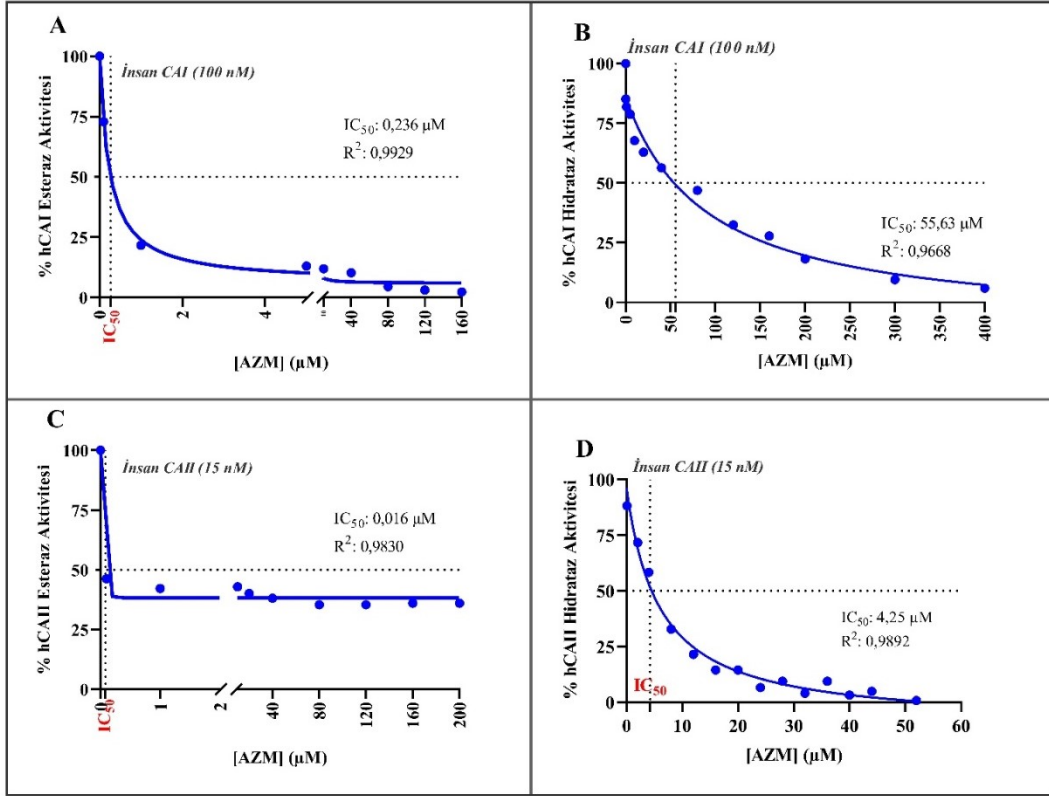
Tablo 15. İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri için belirlenen V_{max} ve K_m değerleri

Yöntem	Esteraz		Hidrataz	
Enzim (nM)	hCAI (100)	hCAII (15)	hCAI (100)	hCAII (15)
V_{max}	42.7 U/L	8.4 U/L	0.09 EU/mL	0.10 EU/mL
K_m	2.4 Mm	0.58 mM	27.4 mM	25.7 mM

4.3. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine Asetazolamidin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II enziminin aktivitesi üzerine asetazolamid'in etkisinin belirlenmesinde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCAI:100 nM; hCAII:15 nM) çeşitli asetazolamid konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Esteraz aktivitesi ölçüm yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 16 ve Tablo 17'de; hidrataz

aktivitesi ölçüm yöntemi ile elde edilen sonuçlar Tablo 18 ve Tablo 19’da sunulmuştur. Bu sonuçlar kullanılarak Asetazolamid konsantrasyonu-% Aktivite grafikleri çizildi (Şekil 27). Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı.



Şekil 27. Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine AZM’nin etkisi (A) hCA I’in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I’in esteraz aktivitesi ölçümü (C) hCA II’nin esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II’nin hidrataz aktivitesi ölçümü

Tablo 16. Esteraz yöntemiyle AZM’nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri

[AZM] (mM)	EA (U/L)	% Aktivite
0	36.1	100
0.1	26.3	72.9
1	7.8	21.6
5	4.7	13
10	4.3	11.9
40	3.7	10.2
80	1.6	4.4
120	1.1	3
160	0.8	2.2

Tablo 17. Esteraz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri

[AZM] (mM)	EA (U/L)	% Aktivite
0	14.7	100
0.1	6.8	46.3
1	6.2	42.2
10	6.3	42.9
20	5.9	40.1
40	5.6	38.1
80	5.2	35.4
120	5.2	35.4
160	5.3	36
200	5.3	36.1

Tablo 18. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri

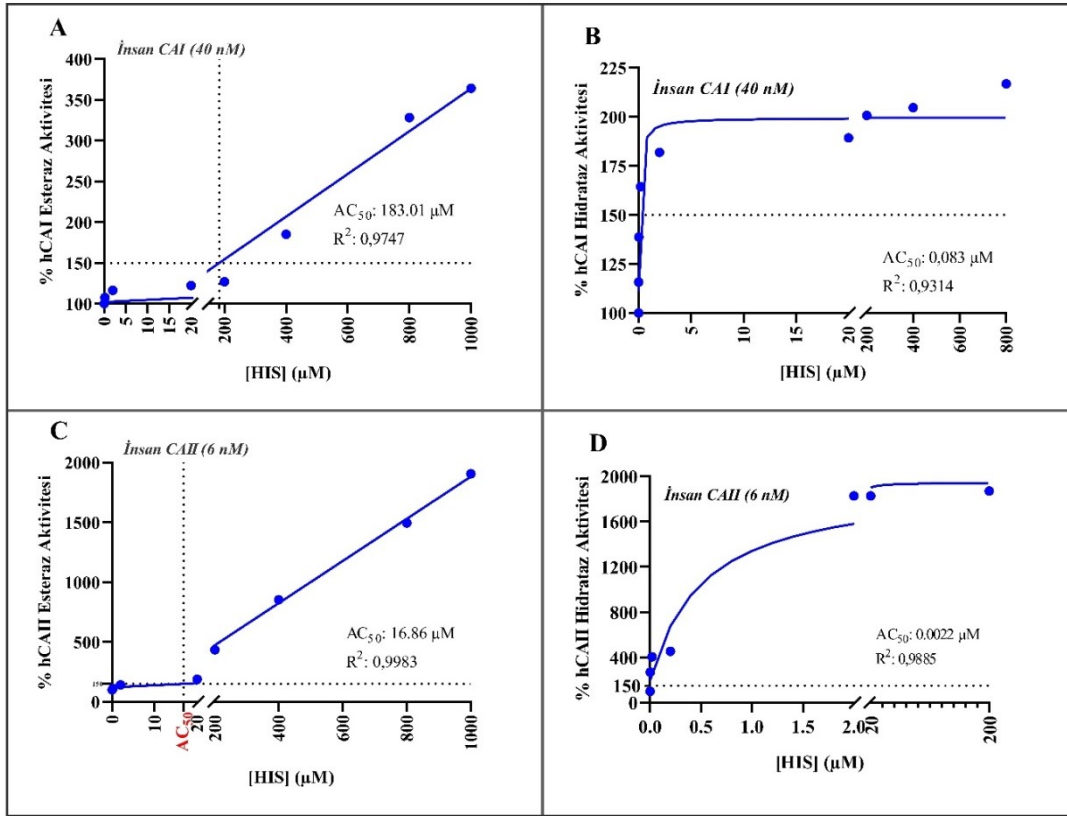
[AZM] (mM)	Aktivite (EU/ml)	% Aktivite
0	0.41	100
0.1	0.35	85.1
1	0.34	81.9
5	0.32	78.8
10	0.28	67.7
20	0.26	62.8
40	0.23	56.3
80	0.19	46.9
120	0.13	32.4
160	0.11	27.8
200	0.08	18.2
300	0.04	9.5
400	0.02	6

Tablo 19. Hidrataz yöntemiyle AZM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenzimin % aktivite değerleri

[AZM] (μ M)	Aktivite (EU/ml)	% Aktivite
0	0.27	100
0.1	0.24	88.2
2	0.2	71.7
4	0.16	58.3
8	0.09	32.8
12	0.06	21.5
16	0.04	14.5
20	0.04	14.5
24	0.01	6.6
28	0.03	9.4
32	0.01	4
36	0.03	9.4
40	0.009	3.1
44	0.01	4.8
52	0.002	0.76

4.4. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine L-Histidin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II enziminin aktivitesi üzerine L-Histidin etkisinin belirlenmesinde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCAI: 40 nM; hCAII: 6 nM) çeşitli L-Histidin konsantrasyonları kullanılarak ve aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar EAT için Tablo 20 ve Tablo 21'de; HAT için ise Tablo 22 ve Tablo 23'te gösterilmektedir. Bu sonuçlar kullanılarak L-Histidin konsantrasyonu-% Aktivite grafiği çizildi (Şekil 28). Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak AC_{50} değerleri hesaplandı.



Şekil 28. Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine HIS'nin etkisi (A) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (B) hCA I'in esteraz aktivitesi ölçümü (C) hCA II'nin esteraz aktivitesi ölçümü (D) hCA II'nin hidrataz aktivitesi ölçümü

Tablo 20. Esteraz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri

[HIS] (μM)	EA (U/L)	% Aktivite
0	6.7	100
0.2	7.2	107.5
2	7.8	116.4
20	8.2	122.4
200	8.5	126.9
400	12.4	185.1
800	22	328.4
1000	24.4	364.2

Tablo 21. Esteraz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri

[HIS] (μM)	EA (U/L)	% Aktivite
0	1.7	100
0.2	1.9	111.8
2	2.4	141.2
20	3.2	188.2
200	7.4	435.3
400	14.5	852.9
800	25.4	1 494.1
1000	32.4	1 905.9

Tablo 22. Hidrataz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri

[HIS] (μM)	Aktivite (EU/ml)	% Aktivite
0	0.06	100
0.002	0.07	115.8
0.02	0.09	138.8
0.2	0.1	164.4
2	0.12	181.9
20	0.1	189.2
200	0.13	200.7
400	0.13	204.6
800	0.14	216.8

Tablo 23. Hidrataz yöntemiyle HIS'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri

[HIS] (μM)	Aktivite (EU/ml)	%Aktivite
0	0.02	100
0.002	0.06	268.8
0.02	0.09	404.3
0.2	0.1	453.4
2	0.4	1 827.3
20	0.4	1 827.3
200	0.42	1 869.2

4.5. Karbonik Anhidraz I ve II Aktivitesi Üzerine Bergamottinin Etkisinin Belirlenmesi

Karbonik anhidraz I ve II enzim aktivitesi üzerine bergamottinin etkisinin belirlenmesinde enzim konsantrasyonları sabit tutularak (hCAI: 100 nM; hCAII: 100 nM) çeşitli Bergamottin konsantrasyonları kullanılarak aktivite ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen EAT için Tablo 24 ve 25’de; HAT için ise Tablo 26 ve Tablo 27’de gösterilmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak Bergamottin konsantrasyon-%Aktivite grafiği çizildi (Şekil 29). Grafiklere ait eğim denklemi kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

Tablo 24. Esteraz yöntemiyle BGM’nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri

[BGM] (μM)	EA (U/L)	% Aktivite
CA I (100 nM)	36.7	
CA I (100 nM) + DMSO(Derişik)	22.8	100
0.2	22.7	99.8
2	22	96.7
20	19.9	87.3
50	12.9	56.7
100	12.6	55.2
200	12.6	55.4
300	12.9	56.5
400	11.9	52.3
500	11.5	50.3

Tablo 25. Esteraz yöntemiyle BGM’nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri

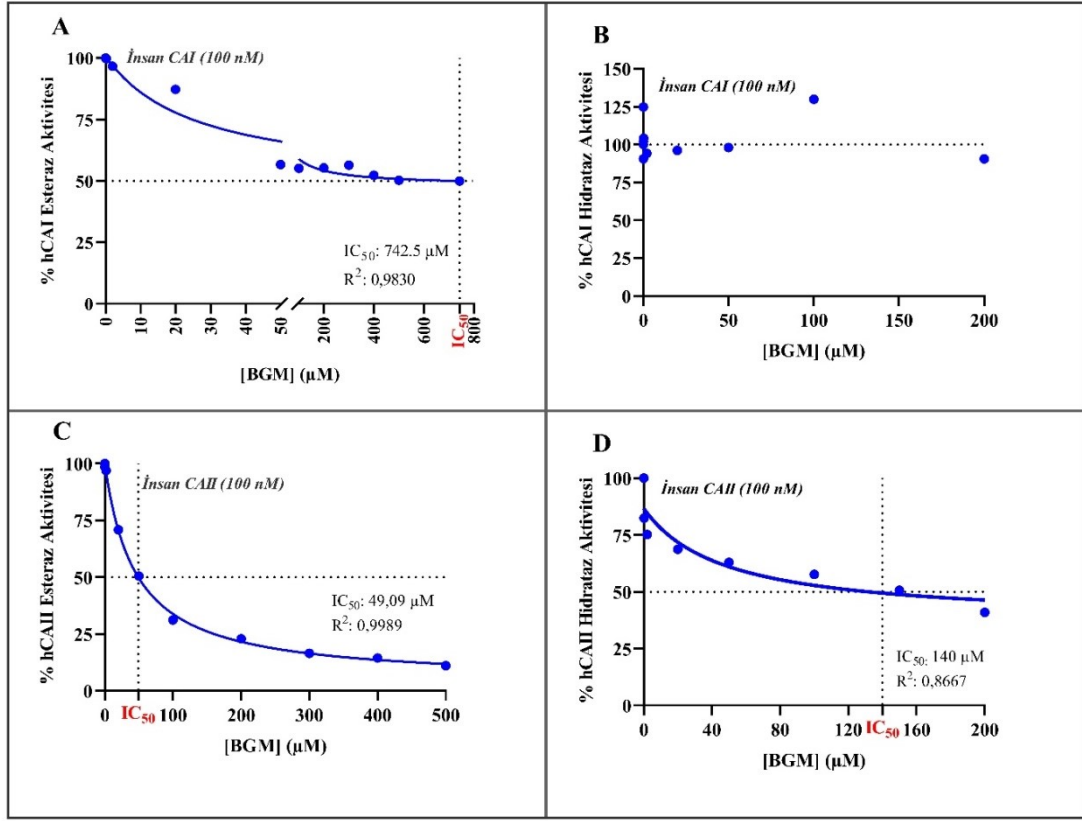
[BGM] (μM)	EA (U/L)	% Aktivite
CA II (100 nM)	42	
CA II (100 nM) + DMSO(Derişik)	38.8	100
0.2	38.2	98.5
2	37.6	96.9
20	27.5	70.9
50	19.6	50.5
100	12.1	31.2
200	8.9	22.9
300	6.4	16.5
400	5.6	14.4
500	4.3	11.1

Tablo 26. Hidrataz yöntemiyle BGM'nin farklı konsantrasyonları için hCA I izoenziminin % aktivite değerleri

[BGM] (μ M)	Aktivite (EU/ml)	% Aktivite
CA I (100 nM)		
CA I (100 nM)+DMSO(Derişik)	0.2	100
0.0002	0.2	102
0.002	0.18	90.5
0.02	0.25	124.8
0.2	0.21	104.1
2	0.19	94.2
20	0.2	96.1
50	0.2	98
100	0.27	129.9
200	0.18	90.5

Tablo 27. Hidrataz yöntemiyle BGM'nin farklı konsantrasyonları için hCA II izoenziminin % aktivite değerleri

[BGM] (μ M)	Aktivite (EU/ml)	% Aktivite
0	0.45	100
0.2	0.37	82.5
2	0.34	75.2
20	0.3	68.7
50	0.28	62.9
100	0.26	57.7
150	0.23	50.7
200	0.18	40.9



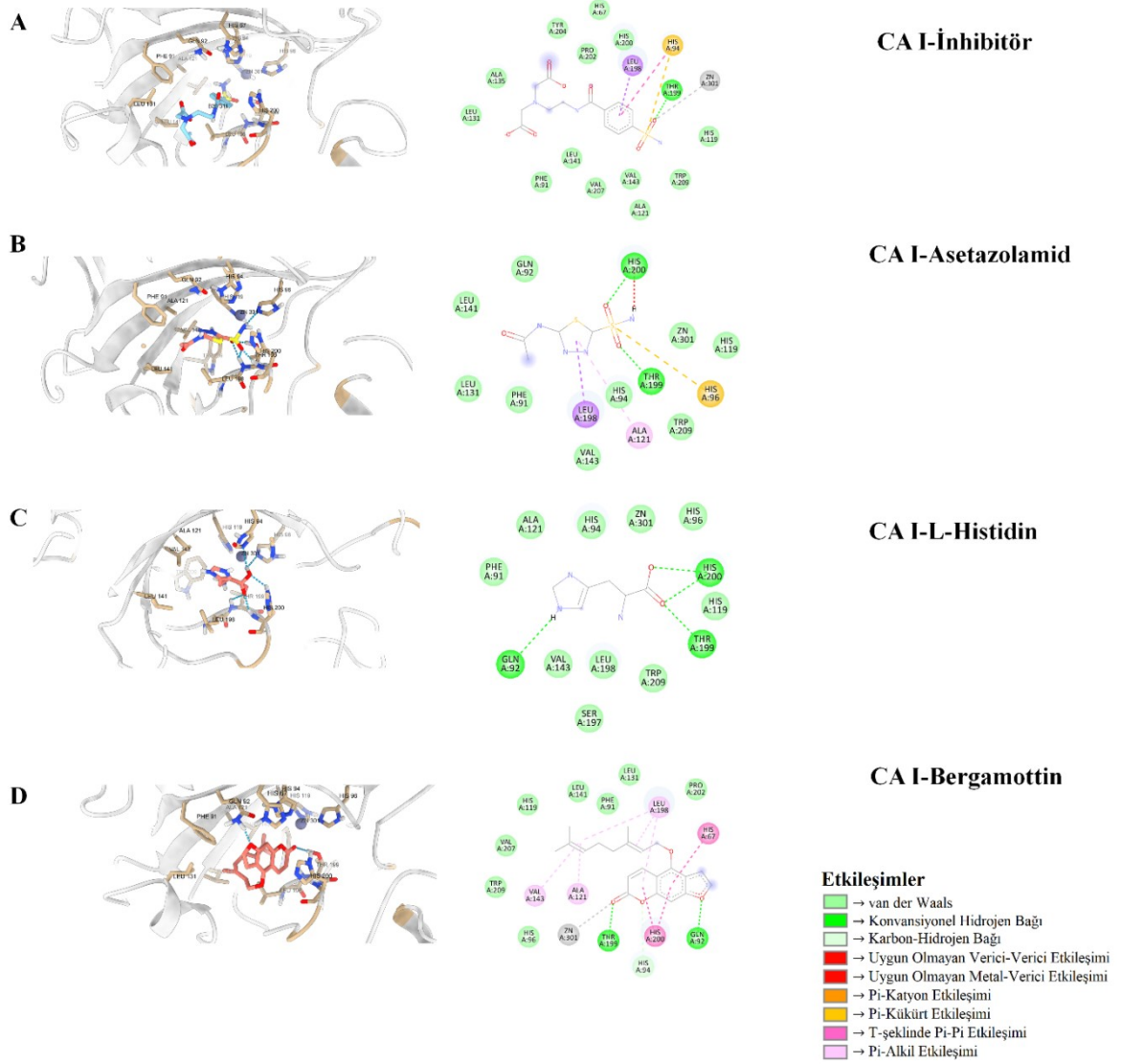
Şekil 29. Karbonik anhidraz I ve II aktivitesi üzerine BGM'nin etkisi (A) hCA I esteraz aktivitesi üzerine BGM'nin etkisi (B) hCA I'in hidrataz aktivitesi üzerine BGM'nin etkisi (C) hCA II esteraz aktivitesi üzerine BGM'nin etkisi (D)hCA II'nin hidrataz aktivitesi üzerine BGM'nin etkisi

4.6. Moleküler Kenetleme Çalışması

4.6.1. Karbonik Anhidraz I'in Asetazolamid, L-Histidin ve Bergamottin ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları

Moleküler Kenetleme analiz sonucuna göre AZM'nin CA I (2FOY) ile en iyi bağlanma afinitesi -6.3 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -6.3 kcal/mol ile -4.6 kcal/mol, ilk en iyi poz -6.3, -5.8 ve -5.8 kcal/mol olarak bulundu. Asetazolamidin CA I ile etkileşimi Şekil 30'da görülmektedir.

L Histidin ile CA I (2FOY) en iyi bağlanma afinitesi değerlendirildiğinde ise -5.8 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -5.8 kcal/mol ile -4.5 kcal/mol ve ilk en iyi poz -5.8 kcal/mol, -5.3 kcal/mol, -5.1 kcal/mol olarak hesaplandı. L-Histidinin CA I ile etkileşimi Şekil 30'da görülmektedir.



Şekil 30. Karbonik anhidraz I izoenziminin inhibitör, AZM, HIS ve BGM ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri (A) CAI-inhibitör, (B) CA I-Asetazolamid, (C) CA I-L-Histidin ve (D) CA I-Bergamottin

Bergamottinin CA I ile etkileşimini değerlendirdiğimizde ise en iyi bağlanma afinitesi -7.6 kcal/mol olarak bulundu (Tablo 28). Bergamottinin CA II ile etkileşimi Şekil 30'da görülmektedir.

Tablo 28. CA I ve CA II için moleküler kenetleme analizi ile belirlenen inhibitör ligandın ve bergamottinin bağlanma skorları

Ligand	Bağlanma Skorları (kcal/mol)	
	CAI(2FOY)	CAII(2FOU)
CA inhibitör*	-7.4	-9.0
Bergamottin	-7.6	-8.2

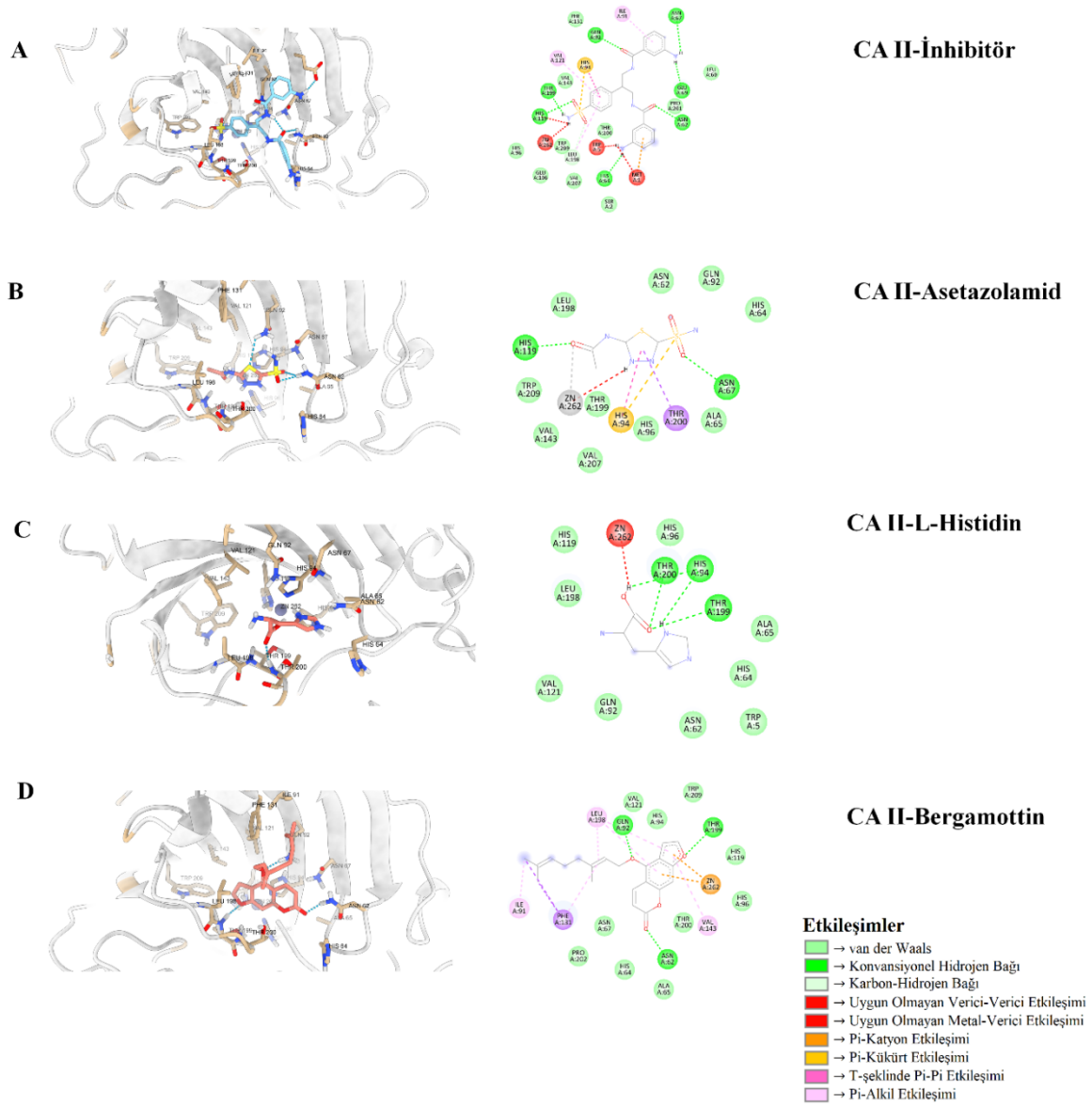
Değerler, moleküler docking simülasyonları ile hesaplanan en yüksek bağlanma afinite skorlarını göstermektedir. Daha negatif değerler, daha güçlü bağlanma afinitesini gösterir. *her protein için kendi XRAY yapısı içindeki inhibitör tercih edilmiştir.

4.6.2. Karbonik Anhidraz II'nin Asetazolamid, L Histidin ve Bergamottin ile Moleküler Kenetleme Analiz Sonuçları

Asetazolamidin CA II (2FOU) ile en iyi bağlanma afinitesi ise -6.8 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -6.8 kcal/mol ile - 4.8 kcal/mol, ilk en iyi poz -6.8 kcal/mol, -5.9 kcal/mol ve -5.8 kcal/mol olarak bulundu. Asetazolamid ile CA II etkileşimi Şekil 31'de görülebilmektedir.

L-Histidin ile CA II etkileşim sonucuna göre ise en iyi bağlanma afinitesi -5.4 kcal/mol, bağlanma afinite aralığı -5.4 kcal/mol ile -4.4 kcal/mol, ilk en iyi poz -5.4 kcal/mol, -5.4 kcal/mol, -5.2 kcal/mol olarak hesaplandı. L-Histidinin CA II ile etkileşimi Şekil 31'de görülmektedir.

Bergamottinin CA II ile etkileşimini değerlendirdiğimizde en iyi bağlanma afinitesi -8.2 kcal/mol olarak bulundu (Tablo 28). Bergamottinin CA II ile etkileşimi Şekil 31'de görülmektedir.

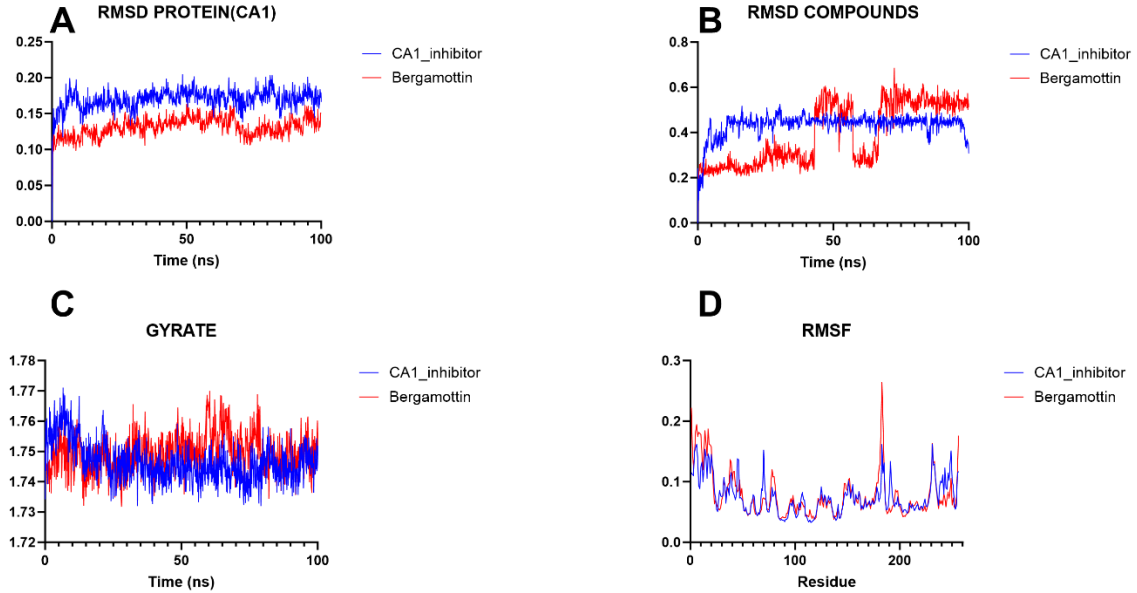


Şekil 31. Karbonik anhidraz II izoenziminin inhibitör, AZM, HIS ve BGM ile etkileşimlerine ait 3D ve 2D görüntüleri (A) CAII-inhibitör, (B) CA II-Asetazolamid, (C) CA II-L-Histidin ve (D) CA II-Bergamottin

4.6.3. Karbonik Anhidraz I ve II'nin Bergamottin ile Moleküler Dinamik Simülasyon Sonuçları

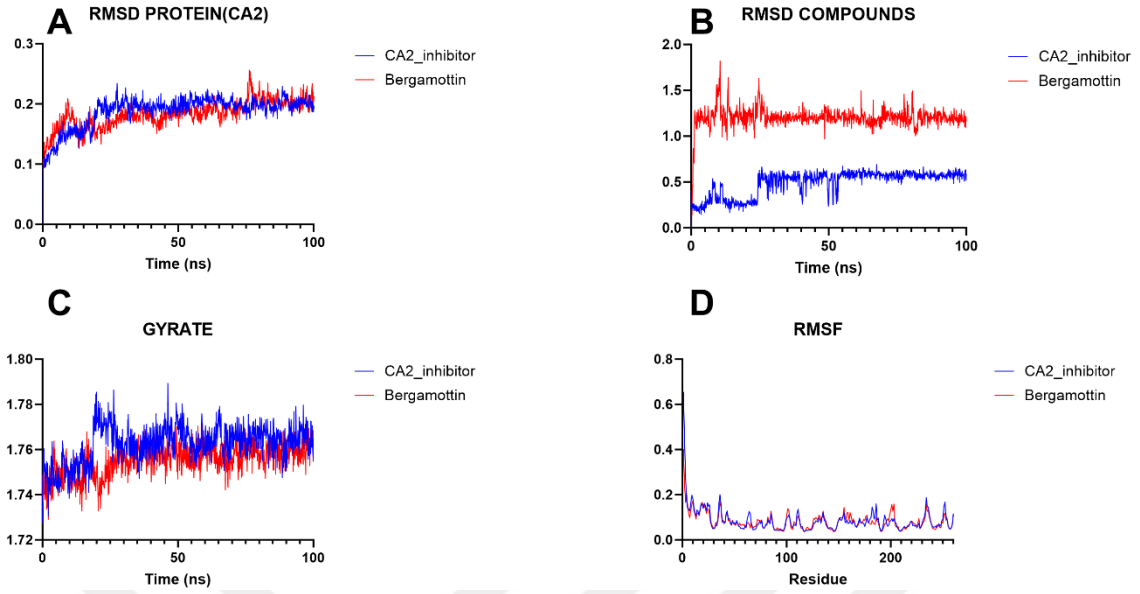
Moleküler dinamik simülasyonlarda, bergamottin-CA I kompleksinin 100 ns boyunca 0.1-0.2 nm kök ortalama kare sapması (RMSD) değerleri aralığında stabil bir davranış sergilediği görüldü. Bağlanma cebinde diğer ligandlara kıyasla daha yüksek konformasyonel esneklik göstermesine rağmen, protein yapısının kompaktlığı (jirasyon yarıçapı ~1.75 nm) korundu. Amino asit rezidülerinin dalgalanmalarını gösteren kök

ortalama kare dalgalanması (RMSF) profili, protein yapısının çoğunlukla kararlı olduğunu, ancak belirli bölgelerde (özellikle yüzey döngülerinde) beklediği gibi daha yüksek esneklik gösterdiğini ortaya koydu.



Şekil 32. CA I ile bergamottin etkileşimi (A) CA I izoenziminin iki farklı ligand varlığında protein yapısının kararlılığı (B) Ligandların bağlanma bölgesindeki RMSD değişimleri (C) Protein-ligand komplekslerinin jirasyon yarıçapı analizi (D) Protein yapısının amino asit bazında esnekliğini gösteren RMSF profili.

Karbonik anhidraz II ile etkileşiminde ise, protein yapısı 0.2 nm RMSD değerinde stabilize olurken, ligand RMSD'si 1 nm civarında seyretti ve bağlanma cebinde kararlı bir konformasyonel davranış sergiledi. Jirasyon yarıçapı analizi, protein kompaktlığının 1.75-1.77 nm aralığında korunduğunu gösterdi. Ortalama kare dalgalanması profili, protein yapısında benzer amino asit dalgalanma paternleri sergilediğini ortaya koydu. Bu bulgular, Bergamottin'in her iki enzim için de potansiyel bir inhibitör adayı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 33. CA II ile bergamottin etkileşimi (A) CA II izoenziminin iki farklı ligand varlığında protein yapısının kararlılığı (B) Ligandların bağlanma bölgesindeki RMSD değişimleri (C) Protein-ligand komplekslerinin jirasyon yarıçapı analizi (D) Protein yapısının amino asit bazında esnekliğini gösteren RMSF profili.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzimler, canlılarda biyokimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların daha hızlı gerçekleşmesini sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin katalitik aktiviteleri devir hızı, devir sayısı olarak da bilinen k_{cat} değeri ile ifade edilmektedir. Bu değer birim zamanda bir enzim molekülü tarafından ürüne dönüştürülen substrat miktarını göstermektedir. Katalitik aktivitesi en yüksek enzimlerden biri olan karbonik anhidraz enzimi, $CO_2:HCO_3^-$ dönüşümünü katalize etmektedir (2).

Karbonik anhidraz enzimi yapısında Zn, Fe gibi metalleri içeren bir metaloenzim ailesinden oluşur. Bu enzim ailesi yapısal olarak şu ana kadar bilinen 8 farklı sınıfa ayrılmaktadır ve insanlarda ise α karbonik anhidraz sınıfı bulunmaktadır. İnsanlarda α karbonik anhidrazın 15 farklı izoenzimi bulunur ve bu izoenzimlerin hücresel lokalizasyonları ve fonksiyonları farklılık göstermektedir (5).

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin farklı dokularda ve hücresel lokalizasyonlarda bulunuyor olmaları sebebiyle vücudumuzda pek çok farklı işleve sahiptir. Karbonik anhidrazlar, CO_2 ve HCO_3^- arasındaki dönüşüm reaksiyonu katalizlemesi yanında glukoneogenez, üreogenez ve lipogenez gibi biyosentetik süreçlerde, mide asidi üretiminde, elektrolit salgılanmasında, kemik rezorpsiyonunda, kalsifikasyon ve tümör oluşumu gibi süreçlerde de yer almaktadır. Karbonik anhidrazlar, fizyolojik etkilerinin yanı sıra kanser, alzheimer, glokom, epilepsi gibi patolojik durumlarla da ilişkilendirilmektedir (5, 28). Bu sebeple hCA enziminin aktivasyonu ve inhibisyonu farmakolojik hedef olarak düşünülmekte ve araştırmalar yapılmaktadır. Çalışmalar sonucunda günümüzde klinikte anti-glokom, antidiüretik, anti-epileptik ajan olarak kullanılan karbonik anhidraz inhibitörleri bulunmaktadır (104).

Klinikte kullanımda olan CA_i sülfonamid türevi inhibitörlerdir ve bunlar, hCA'nın bütün izoenzimlerini inhibe ettiği için çeşitli yan etkilere sebep olmaktadır (30). Asetozolamid epilepsi, glokom, akut dağ hastalığı gibi hastalıklarda kullanılan bir sülfonamid türevi CA_i 'dir. Bu hastalıklarda kullanımında kaşıntı, döküntü, Stevens-Johnson sendromu, metabolik asidoz gibi ciddi yan etkiler görülmektedir. Dorzolamid de glokom tedavisinde kullanılan bir başka sülfonamid türevi CA_i 'dir ve kullanımında disguzi, gözde yanma, batma, baş dönmesi gibi yan etkiler görülmektedir. Zonisamid ve topiramid ise epilepsi tedavisinde kullanılan sülfonamid türevi CA_i 'leridir. Diğer inhibitörlerde olduğu gibi kullanımında baş dönmesi, depresyon, bilişsel bozukluk ve böbrek

taşı oluşumu ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Glokom tedavisinde kullanılan diklorfenamid, brinzolamid, metazolamid, etokszolamid gibi sülfonamid türevi CA_i'lerin de kullanımında ciddi yan etkiler görülmektedir (7, 29, 33-47). Ayrıca CA izoformları, farklı hücrel lokalizasyonlara ve doku dağılımlarına sahip olmaları nedeniyle farklı patolojilerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin hCA IX ve XII izoformları kanser ile ilişkilendirilirken hCA I, II, IV ve XIV izoformları retinopatilerle; hCA II ve VII nöropatik ağrı ile ilişkilendirilmektedir (105). Bu sebeple yeni ve yan etkileri çok az olan ya da hiç olmayan izofoma özgü seçici CA inhibitörler önem kazanmakta ve araştırılmaktadır (106).

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin yan etkilerinin fazla olması nedeniyle CA enzimi üzerinde kumarinler, poliaminler ve fenoller gibi çeşitli bitki bileşenlerinin etkileri araştırılmaktadır. Bununla birlikte bitkiler ve bitkisel ürünlerin, hem yiyecek ve içecek şeklinde tüketimi hem de tıbbi tedavi amacıyla kullanımının dünya çapında giderek artmaktadır (9, 107). Bu kapsamda yapılan çalışmalarda bazı bitki kökenli bileşiklerin farklı inhibisyon mekanizmaları göstermeleri sonucu, izoenzime özgü CA_i'lerin oluşturulmasında ve çeşitli istenmeyen yan etkilerden yoksun yeni ilaç kategorilerinin keşfinde bitki kökenli bileşenlerin yardımcı olabileceği düşünülmektedir (8, 9).

Yeni ilaç kategorilerinin keşfinde Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı (Computer Aided Drug Design, CADD) yeni terapötik ajanların keşfi, tasarımı ve geliştirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem daha hızlı, ekonomik ve daha verimli bir ilaç keşfi sağlamaktadır. Geleneksel ilaç keşfi yöntemleri 10 yıldan fazla süren bir aşamayı içerirken CADD ise bu sürece katkı sağlayarak süreci kısaltmaya yardımcı olduğu için tercih edilmekte ve şu ana kadar CADD aracılığıyla geliştirilen ilaçlar bulunmaktadır. Bunlara antihipertansif ajan olarak kaptopril, karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzalamid örnek verilebilir (109).

Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı yapı tabanlı ve ligand temelli olarak ikiye ayrılabilir (109, 110). Moleküler (Docking) Kenetleme Yöntemi de yapı tabanlı bir yöntemdir. Bu yöntem moleküller arasındaki etkileşimlerin tahmini ve bağlanma afinitesi bize göstermektedir. Bu analizleri yapabilmek için geliştirilen çeşitli yazılımlar bulunmaktadır ve Auto- Dock Vina da bu yazılımlardan biridir (109, 111).

Bu doğrultuda, bir furanokumarin olan bergamottinin hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki etkileri *in vitro* deneysel yöntemler (hidrataz ve esteraz aktivitesi ölçümü) ve moleküler docking analizleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bergamottinin hCA

izoenzimlerinin aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla hCA izoenzimleri arasından hCA I izoenzimi, hemoglobinden sonra eritrositlerde en fazla bulunan ikinci protein olması nedeniyle; hCA II izoenzimi ise birçok dokuda toplam karbonik anhidraz aktivitesinin büyük bir kısmından sorumlu olması nedeniyle çalışmada tercih edilmiştir.

Aktivite ölçümlerinde kullanılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin konsantrasyon aralıklarının belirlenmesi ve deney prosedürünün test edilmesi amacıyla esteraz ve hidrataz aktivitesi ölçümleri yapıldı. Elde edilen bulgular ve aktivite-konsantrasyon grafiklerine göre belirtilen şartlar altında yöntemin doğru çalıştığı ve hCA I için 0-500 nM, hCA II için 0-50 nM enzim konsantrasyonu aralığının uygun olacağı tespit edildi. Sonrasında her iki izoenzim içinde substrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. Esteraz aktivitesi ölçümünde hCA I (100 nM) için V_{max} değeri 42.7 U/L ve hCA II (15 nM) için ise 8.4 U/L olarak hesaplandı. Aralarındaki bu fark V_{max} değerinin enzim konsantrasyonuna bağlı olmasından kaynaklanabilir. İnsan karbonik anhidraz I için K_m değeri ise 2.4 mM ve hCA II için de 0.58 mM olarak hesaplandı. Konsantrasyon farkına rağmen hCA II'nin daha düşük K_m değerine sahip olması katalitik aktivitesinin hCA I'e kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Hidrataz aktivitesi ölçümünde hCA I (100 nM) ve hCA II (15nM) için V_{max} değeri sırasıyla 0.09 EU/ml ve 0.10 EU/ml K_m değerleri ise 27.4 mM ve 25.7 mM olarak hesaplandı. Bu sonuçlar esteraz aktivite sonuçları ile benzer şekilde konsantrasyon farkına rağmen sonuçların yakın çıkması hCA II'nin katalitik aktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Literatüre bakıldığı zaman genel olarak CA_i ile ilgili araştırmalarda K_m ve V_{max} değerlerinin hesaplanmadığı görülmektedir. Bu tez çalışması bu konuda literatüre katkı sağlamaktadır.

Kinetik sabitlerin hesaplanmasından sonra her iki izoenzim için de esteraz ve hidrataz aktivitesi ölçümleri AZM, HIS ve BGM için gerçekleştirildi.

Bergamottinin hCA I izoenziminin (100 nM) hidrataz aktivitesi üzerindeki etkisi 9 farklı konsantrasyonda değerlendirdi. Yapılan *in vitro* analizlerden elde edilen bulgular sonucunda BGM'nin inhibitör etki gösterdiği belirlenmiş, ancak IC_{50} aktivitesini gösteren değer elde edilemediği için hesaplanamamıştır. Aynı deneysel düzende, AZM hCA I (100 nM) üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde IC_{50} değeri 55.63 μ M olarak belirlenmiştir. Enzimin esteraz aktivitesine yönelik ölçümler sonucunda ise AZM için IC_{50} değeri 0.236 μ M, BGM için ise 742.5 μ M olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular

doğrultusunda, her iki aktivite ölçümünde de BGM'nin hCA I izoenzimi üzerindeki inhibitör etkisinin AZM'ye kıyasla belirgin şekilde daha zayıf olduğu sonucuna varılmıştır.

Bergamottinin hCA II (100 nM) izoenziminin hidrataz aktivitesi üzerine etkisini 6 farklı konsantrasyonda değerlendirildi. Deney sonucunda BGM hCA I izoenzimi üzerine etkisiyle benzer şekilde hCA II izoenzimi için de inhibitör etkisi gösterdi. Hidrataz aktivitesi ölçümü sonuçlarına göre IC_{50} 140 μ M olarak hesaplandı.

Enzimin esteraz aktivitesi ölçümü ise 9 farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi. Deney sonucuna göre IC_{50} 49.09 μ M olarak belirlenmiştir. Asetozolamid ile karşılaştırıldığında, her iki aktivite ölçümünde de daha zayıf bir inhibitör olduğunu ve hCA I (100 nM) izoenzimine kıyasla hCA II (100 nM) izoenzimi üzerinde daha etkili olduğu belirlendi.

Moleküler kenetleme çalışmasında ise hCA I ve II izoenzimleri üzerine bergamottinin etkisini gösterebilmek amacıyla Auto-Dock Vina yazılımını kullandı. hCA I ve hCA II'nin yapıları için RCSB veritabanı, bergamottin için ise PubChem veritabanı kullanıldı. Daha sonra protein-ligand komplekslerin davranışlarını incelemek için GROMACS kullanarak yapısal analizlerini yapıldı ve görselleştirilmesini GraphPad Prism ile gerçekleştirildi.

Moleküler kenetleme çalışmasında ilk olarak hCA I ve hCA II ile L-Histidin ve asetozolamidin etkileşimi değerlendirildi. Asetazolamid izoformalar ile zayıf-orta düzeyde bağlanma afinite skoru (-6.8 kcal/mol) gösterdi. Karbonik anhidraz II'ye (-6.8 kcal/mol) CA I'e göre (-6.3 kcal/mol) biraz daha güçlü bağlandığı ancak bu farkın önemli düzeyde olmadığı görülmüştür. Genel olarak değerlendirdiğimizde bağlanma değerleri optimal etkileşim için yetersiz olduğu bulunmuştur. L-Histidin her iki izoform için oldukça zayıf bağlanma afinitesi göstermiştir. Bağlanma değerleri -5.4 ile -5.8 kcal/mol olarak bulunmuştur ve bu değerler zayıf bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak her iki bileşik de enzimlerle optimal olmayan etkileşimler göstermektedir. Asetazolamid görece daha iyi bağlanma gösterse de değerler güçlü bir inhibitör etkisi için yetersiz olduğu bulunmuştur. L-Histidinin bağlanma değerleri, etkili bir ligand olarak değerlendirilemeyeceğini göstermiştir. Bu durum her iki bileşiğin de karbonik anhidraz izoformlarıyla yeterince güçlü etkileşimler gösteremediğini ve daha etkili inhibitörler için yapısal modifikasyonlar veya tamamen farklı moleküler yapıların araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Bergamottinin etkileri değerlendirildiğinde ise CA I için -7.6 kcal/mol ve CA II için -8.2 kcal/mol değerinde bağlanma skoru hesaplandı. Karbonik anhidraz I için standart inhibitörden (-7.4 kcal/mol) daha yüksek bir afinite; CA II için ise (-9.0 kcal/mol) yine de güçlü ama standart inhibitöre kıyasla daha düşük bir bağlanma afinitesi gösterdi. Moleküler dinamik simülasyonlarda Bergamottin-CA I kompleksi 100 ns boyunca 0.1- 0.2 nm RMSD değerleri aralığında, CA II-Bergamottin kompleksi de 0.2 nm RMSD değerinde stabilize olmuştur. Bergamottin CA II için kararlı bir konformasyonel bir davranış sergilerken CA I için daha esnek bir konformasyonel davranış sergilemiştir fakat protein yapısının kompaktlığı korunmuştur. Kök ortalama kare dalgalanması (RMSF) profili, protein yapısında benzer amino asit dalgalanma paternleri sergilediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular bergamottinin her iki izoenzim için de potansiyel bir inhibitör adayı olabileceğini göstermektedir.

Çalışma sonuçlarına göre *in vitro* analizlerden ve moleküler kenetleme analizlerinden elde edilen bulgular birbirini desteklemektedir. Bergamottin iki çalışmada da benzer şekilde hCA I ve hCA II için inhibitör etkisi göstermiştir. Bu kapsamda, bitki kökenli bileşikler izoenzime özgü CA_i'lerin oluşturulmasında ve çeşitli istenmeyen yan etkilerden yoksun yeni ilaç kategorilerinin keşfi için araştırılmaktadır. Literatür incelendiğinde bu tez çalışması ile benzer şekilde bitki kökenli birçok bileşiğin CA I ve CA II izoenzimleri üzerine aktivitesinin araştırıldığı görülmektedir.

Aggul ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, mevcut karbonik anhidraz inhibitörlerinin yan etkilerinin fazla olması nedeniyle, daha etkili ve doğal kaynaklı potansiyel CA inhibitörlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, zeytinyağında (*Olea europaea* L.) bulunan biyoaktif bileşiklerden Oleuropein ve Verbascoside'in, CA I ve CA II izoenzimleri üzerindeki etkileri, enzimin esteraz aktivitesine dayalı ölçüm yöntemine göre değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, Oleuropein ve Verbascoside'in CA I izoenzimi için IC₅₀ değerleri sırasıyla 1.57 µM ve 1.73 µM; CA II izoenzimi için ise 2.23 µM ve 1.90 µM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, her iki bileşiğin de CA I ve II üzerinde inhibitör etki gösterdiği, ancak AZM ile karşılaştırıldığında daha zayıf inhibitör özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, Oleuropein'in inhibisyon etkinliğinin Verbascoside'e kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (112).

Şentürk ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada ise, CA I ve CA II izoenzimleri üzerinde bazı fenolik bileşiklerin inhibitör etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında, resveratrol, kateşin, silimarin ve kurkumin için IC_{50} değerleri sırasıyla CA I izoenzimi için 2.25, 4.29, 4.62 ve 5.63 μM ; CA II izoenzimi için ise 1.68, 4.03, 4.26 ve 4.81 μM olarak rapor edilmiştir. Elde edilen bulgular, bu bileşiklerin her iki izoenzim üzerinde de inhibitör etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak, bu inhibitör etkinin, bu çalışmada olduğu gibi, klasik sülfonamid türevi inhibitörlere kıyasla daha zayıf olduğu sonucuna varılmıştır (113).

Köksal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise karnosik asit türevlerinin asetil ve bütirilkolinesterazlara (AChE, BChE) ve karbonik anhidrazilara karşı inhibitör aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Yaptıkları çalışma sonucunda karnosik asit, 12-metoksi-karnosik asit, karnosol, rosmanol, 7-metoksi-rosmanol, izorosmanol için sırasıyla IC_{50} değerleri CA I için 3.10, 2.64, 2.40, 0.21, 4.81, 1.63 nM; CA II için 3.77, 2.64, 5.47, 4.18, 4.81, 5.78 nM olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular referans ilaç olan AZM (CA I için 98.35 nM; CA II için 104,67 nM) ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre karnosik asit türevlerinin AZM kıyasla güçlü bir inhibitör etki sergilediklerini bulunmuştur. Ayrıca en güçlü etkiyi gösteren rasmanolün, CA I üzerine CA II enzimine kıyasla daha güçlü bir etki göstermiştir. Böylece rasmanolün potansiyel bir terapötik ajan olabileceği gösterilmiştir (114).

Aggöl ve arkadaşlarının Oleuropein ve Verbascoside'nin CA I (PBM kodu: 4WR7) ve CA II (PBM kodu: 3HS4) izoenzimleri üzerine etkilerini *in vitro* olarak araştırdıkları çalışmadan daha önce bahsedilmişti. Mevcut tez çalışması ile benzer şekilde *in vitro* çalışmalarına ek olarak araştırdıkları bileşenlerin moleküler kenetleme yöntemi ile izoenzimler üzerine bağlanma afinitelerini incelenmiştir. Oleuropein CA I için -7.77 kcal/mol, CA II için -8.58 kcal/mol; Verbascoside CA I için -6.18 kcal/mol, CA II için ise -10.58 kcal/mol bulunmuştur. Bağlanma skorlarına göre CA I ile oleuropein CA II ile de verbascoside daha güçlü etkileşimler kurmaktadır. Bu sonuçlar *in vitro* deneyler ile uyumlu olarak bu bileşenlerin CA I ve CA II için inhibitör potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (112).

Köksal ve arkadaşları tarafından mevcut tez çalışmasıyla benzer şekilde *in vitro* deneysel çalışmalarına ek olarak moleküler kenetleme yöntemi de kullanılmıştır. Rosmanolün asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve CA I (PDM Kodu: 1CZM) ve CA II (PDM Kodu: 1A42) için moleküler mekanik genelleştirilmiş doğmuş yüzey alanı (MM-

GBSA) CA I ve CA II için sırasıyla -63.24 kcal/mol, -43.27 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar *in vitro* deneyler ile uyumlu şekilde rosmanolün potansiyel bir inhibitör olacağını göstermektedir (114).

Aggul ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise tirozol, hidroksitirozol, kafeik asit, luteolin, diosmetin, luteolin 7- O - glikozit ve apigenin 7- O - glikozitin CA I ve CA II izoformları üzerindeki inhibitör etkilerini incelenmiştir. Karbonik anhidraz I için IC₅₀ değerini sırasıyla 6.8 µM, 11.38 µM, 5.73 µM, 2.62 µM, 3.68 µM, 2.02 µM, 3.23 µM ve AZM için 1.01 µM, CA II için ise IC₅₀ değerini sırasıyla 9.05 µM, 6.27 µM, 5.50 µM, 3.43 µM, 2.82 µM, 2.26 µM, 2.23 µM ve AZM için de 0.22 µM olarak hesaplamıştır. Bu sonuçları göre bu bileşiklerin inhibitör etkisi gösterdiklerini fakat AZM'den daha zayıf bir etkileri olduklarını bulunmuştur. Daha sonrasında bu bileşiklerin etkilerini moleküler kenetleme yöntemi ile incelenmiş. Karbonik anhidraz I (PBM kodu:4WR7) için bağlanma afinite skorları sırasıyla -4.487 kcal/mol, -5.332 kcal/mol, -7.706 kcal/mol, -6.911 kcal/mol, -5.365 kcal/mol, -9.205 kcal/mol, -8.248 kcal/mol ve AZM için -6.167 kcal/mol olarak bulunmuştur. Karbonik anhidraz II (PBM kodu: 5AML) için ise sırasıyla -4.175 kcal/mol, -5.538 kcal/mol, -8.429 kcal/mol, -6.183 kcal/mol, -7.111 kcal/mol, -8.343 kcal/mol, -8.698 kcal/mol ve AZM için -5.601 kcal /mol olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma sonucuna göre luteolin 7- O- glikozid, diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında hCA I ve II izozimlerine karşı en iyi güçlü inhibitör etkiye (sırasıyla IC₅₀ = 2.02 ve 2.26 µM) sahiptir. Deneysel inhibisyon sonuçları ile serbest bağlanma enerjisi skorları arasında güçlü bir uyumlu bulunmuştur. Bu, luteolin 7- O -glikozidin hem 4WR7 hem de 5AML ile düşük enerjili güçlü bir etkileşimini doğrulamıştır. Yerleştirme sonuçları, bileşiğin pozitif kontrol bileşiği olan asetazolamidden daha iyi bir yerleştirme skoruna ve daha düşük serbest bağlanma enerjisine sahip olduğunu göstermiştir. Bu durumun, luteolin 7- O -glikozidin her iki izozim üzerindeki yüksek inhibitör etkisinin nedeni olabileceği sonucuna varılmıştır (4).

Sonuç olarak, mevcut tez çalışmasında BGM'nin CA I ve CAII izoenzimlerinin aktivitesi üzerine etkisi *in vitro* ve *in silico* yöntemleriyle değerlendirildi. Elde edilen bulgular her iki izoenzim içinde BGM'nin potansiyel bir inhibitör adayı olduğunu göstermektedir. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin ekspresyonunun glokom, akut dağ hastalığı gibi patolojik durumlarda arttığı bilinmektedir. Günümüzde klinikte mevcut olarak bu hastalıkların tedavisinde kullanılan sülfanamid türevi inhibitörler, Steven

Johnson sendromu, depresyon gibi ciddi yan etkilere sebep olmaktadır. Bununla birlikte literatür incelendiğinde bitki kökenli bileşenlerinin etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda artışların hız kazandığı görülmektedir. Mevcut tez çalışması bu doğrultuda yapılan ve literatür taramaları sonucu bildiğimiz kadarıyla bir furonokumarin bileşiğinin hCA I ve II izoenzimleri üzerine etkisinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular göre BGM'nin, klasik sülfanamid türevi inhibitörlerine kıyasla daha güvenli bir potansiyel farmakolojik ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte BGM'nin bu hastalıklar üzerindeki terapötik etkisinin belirlenmesi ve belirtilen izoenzimlere spesifik olup olmadığının tespiti için daha fazla araştırma yapılması ve bu sonuçların *in vivo* olarak da araştırılması gerektiği düşünülmektedir.



6. KAYNAKÇA

1. Lewis T, Stone WL (2023). Biochemistry, Proteins Enzymes. In StatPearls. StatPearls Publishing.
2. Robinson PK (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in Biochemistry 59: 1–41.
3. Lionetto MG (2023). Carbonic anhydrase and biomarker research: New Insights. International Journal of Molecular Sciences 24(11): 9687.
4. Aggul AG, Uzun N, Kuzu M, Taslimi P, Gulcin I (2022). Some phenolic natural compounds as carbonic anhydrase inhibitors: An in vitro and in silico study. Archiv der Pharmazie 355(6): 2100476.
5. Aspatwar A, Tolvanen MEE, Barker H, Syrjänen L, Valanne S, Purmonen S, Waheed A, Sly WS, Parkkila S (2022). Carbonic anhydrases in metazoan model organisms: molecules, mechanisms, and physiology. Physiological Reviews 102(3): 1327–1383.
6. Dilek E (2017). Activation of two different drugs used in alzheimer's disease treatment on human carbonic anhydrase isozymes I and II activity: an in vitro study. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences 14(2): 164–168.
7. Nocentini A, Supuran CT (2019). Advances in the structural annotation of human carbonic anhydrases and impact on future drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery 14(11): 1175–1197.
8. Karakaya S, Bingol Z, Koca M, Dagoglu S, Pınar NM, Demirci B, Gulcin İ, Brestic M, Sytar O (2020). Identification of non-alkaloid natural compounds of *Angelica purpurascens* (Avé-Lall.) Gilli. (Apiaceae) with cholinesterase and carbonic anhydrase inhibition potential. Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: the Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society 28(1): 1–14.
9. Karioti A, Carta F, Supuran CT (2016). Phenols and Polyphenols as Carbonic Anhydrase Inhibitors. Molecules (Basel, Switzerland). 21(12), 1649.
10. Agarwal PK (2006). Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. Microbial Cell Factories 5: 1-12.

11. Narváez A, Domínguez E (2005). 'Enzymes Overview'. in Worsfold P, Townshend A, Poole C (eds.) *Encyclopedia of Analytical Science*. 2nd ed. Oxford: Elsevier, Sayfa: 508–523.
12. Blanco A, Blanco G (2017). 'Enzymes', in *Medical Biochemistry*. Amsterdam: Academic Press, Sayfa: 153–175.
13. Martínez Cuesta S, Rahman SA, Furnham N, Thornton JM (2015). The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical Journal* 109(6): 1082–1086.
14. Balaji S (2022). The transferred translocases: An old wine in a new bottle. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 69(4): 1587–1610.
15. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (2023). Enzyme classification. The Enzyme Database. Available from: <https://www.enzyme-database.org/class.php>. [Accessed 19 June 2025].
16. McDonald AG, Tipton KF (2023). Enzyme nomenclature and classification: the state of the art. *The FEBS journal* 290 (9): 2214–2231.
17. Roberts SM, Gibb AJ (2013). Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. In *Introduction to biological and small molecule drug research and development* Elsevier, Sayfa: 1-55.
18. Miyanaga K, Unno H (2011). Reaction kinetics and stoichiometry. *Comprehensive Biotechnology* Sayfa: 33–46.
19. Talens-Perales D, Marín-Navarro J, Polaina J (2016). Enzymes: Functions and characteristics. Reference Module in Food Science. In: *Encyclopedia of Food and Health* 2016 1(1): 532-538.
20. Engelking LR (2015). Enzyme Kinetics. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* Sayfa: 32–38.
21. Roughton FJW, Booth VH (1946). The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal* 40(2): 319.
22. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(6): 1570–1582.

23. Poggetti V, Salerno S, Baglini E, Barresi E, Da Settimo F, Taliani S (2022). Carbonic anhydrase activators for neurodegeneration: An overview. *Molecules* (Basel, Switzerland) 27(8): 2544.
24. DeGrado WF, Summa CM, Pavone V, Nastri F, Lombardi A (1999). De novo design and structural characterization of proteins and metalloproteins. *Annual Review of Biochemistry* 68: 779–819.
25. Paul TK, Taraphder S (2021). Molecular modelling of two coordination states of Zn(II) ion at the active site of human carbonic anhydrase II. *Chem. Phys* 549:111281.
26. Zamanova S, Shabana AM, Mondal UK, Ilies MA (2019). Carbonic anhydrases as disease markers. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 29(7): 509–533.
27. Türkeş C (2023). Carbonic anhydrase inhibition by antiviral drugs in vitro and in silico. *Journal of Molecular Recognition* 36(12):e3063.
28. Chegwiddden WR (2021). The carbonic anhydrases in health and disease. In: *The Carbonic Anhydrases: Current and Emerging Therapeutic Targets*: Chegwiddden WR, Carter ND (Eds), Springer International Publishing 2021: (75): 1-12.
29. Supuran CT (2016). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31(3): 345–360.
30. Nocentini A, Angeli A, Carta F, Winum JY, Zalubovskis R, Carradori S, Capasso C, Donald WA, Supuran CT (2021). Reconsidering anion inhibitors in the general context of drug design studies of modulators of activity of the classical enzyme carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1): 561–580.
31. McDonald PC, Chia S, Bedard PL, Chu Q, Lyle M, Tang L, Singh M, Zhang Z, Supuran CT, Renouf DJ, Dedhar S (2020). A phase 1 study of SLC-0111, a novel inhibitor of carbonic anhydrase IX, in patients with advanced solid tumors. *American Journal of Clinical Oncology* 43(7): 484–490.
32. Aslam S, Gupta V. Carbonic Anhydrase Inhibitors. [Updated 2023 Apr 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557736/>. [Accessed 10 May 2025].

33. Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R (2013). Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 23(6): 717–724.
34. Kester M, Karpa KD, Vrana KE (2012). Renal system. *Elsevier's Integrated Review Pharmacology* Sayfa: 153–160 .
35. Ciccone L, Cerri C, Nencetti S, Orlandini E (2021). Carbonic Anhydrase Inhibitors and Epilepsy: State of the Art and Future Perspectives. *Molecules (Basel, Switzerland)* 26(21): 6380.
36. Her Y, Kil MS, Park JH, Kim CW, Kim SS (2011). Stevens-Johnson syndrome induced by acetazolamide. *The Journal of Dermatology* 38(3): 272–275.
37. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: 2012. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548664/> [Updated 2021 Oct 13].
38. Schmidl D, Schmetterer L, Garhöfer G, Popa-Cherecheanu A (2015). Pharmacotherapy of Glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: the Official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 31(2): 63–77.
39. Lu H, Zhang H, Jiang Y (2020). Methazolamide in high-altitude illnesses. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 148: 105326.
40. Abutaleb NS, Elhassanny AEM, Nocentini A, Hewitt CS, Elakashif A, Cooper BR, Supuran CT, Seleem MN, Flaherty DP (2022). Repurposing FDA-approved sulphonamide carbonic anhydrase inhibitors for treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 37(1): 51–61.
41. Kherada NI, Gonzalez W, Rosendorff C (2014). Diuretics. *A Worldwide Yearly Survey of New Data in Adverse Drug Reactions* 289–296.
42. Özer MA (2014) Glokomda sabit kombine tedaviler. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 3(1): 33-38.

43. Baykara M, Poroy C, Budak B, Asodova V, Can B, Çiçek B (2014). Dorzolamid-timolol ve brinzolamid-timolol kombinasyonlarının karşılaştırılması: yan etki profili ve hastaların tercihi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 40 (2): 53-55.
44. Ciafaloni E, Cohen F, Griggs R (2019). Efficacy and safety of dichlorphenamide for primary periodic paralysis in adolescents compared with adults. *Pediatric Neurology* 101: 43–46.
45. National Center for Advancing Translational Sciences (n.d.) Ethoxzolamide (UNII Z52H4811WX). Inxight Drugs. Available from: <https://drugs.ncats.io/drug/Z52H4811WX> [Accessed 1 August 2025].
46. Trubiano JA, Ostrov DA, Phillips EJ (2019). Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis associated with carbonic anhydrase inhibitors: epidemiology, genetics, and insights into mechanisms. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. in Practice* 7(8): 2854–2856.
47. Kim SH, Kim M, Lee KW, Kim SH, Kang HR, Park HW, Jee YK (2010). HLA-B*5901 is strongly associated with methazolamide-induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Pharmacogenomics* 11(6): 879–884.
48. Vullo D, Carta F (2019). Mechanisms of action of carbonic anhydrase inhibitors. *Carbonic Anhydrases* 187–222.
49. Nocentini A, Cuffaro D, Ciccone L, Orlandini E, Nencetti S, Nuti E, Rossello A, Supuran CT (2021). Activation of carbonic anhydrases from human brain by amino alcohol oxime ethers: towards human carbonic anhydrase VII selective activators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1): 48–57.
50. Supuran CT (2018). Carbonic anhydrase activators. *Future Medicinal Chemistry* 10(5): 561–573.
51. Cuffaro D, Di Leo R, Ciccone L, Nocentini A, Supuran CT, Nuti E, Rossello A (2023). New isoxazolidinyl-based *N*-alkylethanolamines as new activators of human brain carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 38(1): 2164574.

52. Barresi E, Ravichandran R, Germelli L, Angeli A, Baglini E, Salerno S, Marini AM, Costa B, Da Pozzo E, Martini C, Da Settimo F, Supuran C, Cosconati S, Taliani S (2021). Carbonic anhydrase activation profile of indole-based derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 36(1): 1783–1797.
53. Deutsch HF (1987). Carbonic anhydrases. *International Journal of Biochemistry*, 19(2): 101–113.
54. Andersson B, Nyman PO, Strid L (1972). Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 48(3): 670–677.
55. Armstrong JM, Myers DV, Verpoorte JA, Edsall JT (1966). Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry* 241(21): 5137–5149.
56. Lowe N, Brady HJ, Barlow JH, Sowden JC, Edwards M, Butterworth PH (1990). Structure and methylation patterns of the gene encoding human carbonic anhydrase I. *Gene* 93(2): 277–283.
57. Cabaleiro-Lago C, Lundqvist M (2020). The effect of nanoparticles on the structure and enzymatic activity of human carbonic anhydrase I and II. *molecules (Basel, Switzerland)* 25(19): 4405.
58. Bánová Vulić R, Zdurienčíková M, Tyčiaková S, Benada O, Dubrovčáková M, Lakota J, Škultéty L (2019). Silencing of carbonic anhydrase I enhances the malignant potential of exosomes secreted by prostatic tumour cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23(5): 3641–3655.
59. Gambhir KK, Ornasir J, Headings V, Bonar A (2007). Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. *Biochemical Genetics* 45(5-6): 431–439.
60. Liu X, Lu D, Bowser R, Liu J (2016). Expression of carbonic anhydrase 1 in motor neurons and alterations in ALS. *International Journal of Molecular Sciences* 17(11): 1820.

61. O'Herin CB, Moriuchi YW, Bemis TA, Kohlbrand AJ, Burkart MD, Cohen SM (2023). Development of human carbonic anhydrase II heterobifunctional degraders. *Journal of Medicinal Chemistry* 66(4): 2789–2803.
62. Liljas A, Kannan KK, Bergstén PC, Waara I, Fridborg K, Strandberg B, Carlbom U, Järup L, Lövgren S, Petef M (1972). Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nature: New biology* 235(57): 131–137.
63. Merz KM, Banci L (1997). Binding of bicarbonate to human carbonic anhydrase II: A continuum of binding states. *Journal of the American Chemical Society* 119(5): 863–871.
64. Melough MM, Cho E, Chun OK (2018). Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 113: 99–107.
65. Sumorek-Wiadro J, Zając A, Maciejczyk A, Jakubowicz-Gil J (2020). Furanocoumarins in anticancer therapy - for and against. *Fitoterapia* 142: 104492.
66. Limones-Mendez M, Dugrand-Judek A, Villard C, Coqueret V, Froelicher Y, Bourgaud F, Olry A, Hehn A (2020). Convergent evolution leading to the appearance of furanocoumarins in citrus plants. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology* 292: 110392.
67. Hung WL, Suh JH, Wang Y (2017). Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *J Food Drug Anal* 25(1): 71–83.
68. Peroutka R, Schulzová V, Botek P, Hajšlová J (2007). Analysis of furanocoumarins in vegetables (Apiaceae) and citrus fruits (Rutaceae). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(11): 2152–2163.
69. Arigò A, Rigano F, Russo M, Trovato E, Dugo P, Mondello L (2021). Dietary intake of coumarins and furocoumarins through citrus beverages: a detailed estimation by a HPLC-MS/MS method combined with the linear retention index system. *Foods (Basel, Switzerland)* 10(7): 1533.

70. Schulzová V, Hajšlová J, Botek P, Peroutka R (2007). Furanocoumarins in vegetables: Influence of farming system and other factors on levels of toxicants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(15): 2763-2767.
71. Santos Junior CM, Silva SMC, Sales EM, Velozo EDS, Dos Santos EKP, Canuto GAB, Azeredo FJ, Barros TF, Biegelmeyer R (2023). Coumarins from Rutaceae: chemical diversity and biological activities. *Fitoterapia* 168: 105489.
72. Groppo M, Afonso LF, Piran JR (2022). A review of systematics studies in the *Citrus* family (Rutaceae, Sapindales), with emphasis on American groups. *Braz. J. Bot* 45: 181–200
73. Messer A, Raquet N, Lohr C, Schrenk D (2012). Major furocoumarins in grapefruit juice II: phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 50(3-4): 756–760.
74. Ko JH, Arfuso F, Sethi G, Ahn KS (2018). Pharmacological utilization of bergamottin, derived from grapefruits, in cancer prevention and therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 19(12): 4048.
75. Villalaín J (2023). Bergamottin: location, aggregation and interaction with the plasma membrane. *Journal of Biomolecular Structure Dynamics* 1–12.
76. Luo W, Song Z, Sun H, Liang J, Zhao S (2018). Bergamottin, a natural furanocoumarin abundantly present in grapefruit juice, suppresses the invasiveness of human glioma cells via inactivation of Rac1 signaling. *Oncology Letters* 15(3): 3259–3266.
77. Bailey DG, Dresser GK, Bend JR (2003). Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 73(6): 529–537.
78. Rossi M, Aktar S, Davis M, Hefter Feuss E, Roman-Holba S, Wen K, Gahn C, Caruso F (2020). The grapefruit effect: interaction between cytochrome P450 and coumarin food components, bergamottin, fraxidin and osthole. X-ray crystal structure and DFT studies. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25(14): 3158.

79. Zhang H, Yang S, Lin T (2022). Bergamottin exerts anticancer effects on human colon cancer cells via induction of apoptosis, G2/M cell cycle arrest and deactivation of the Ras/Raf/ERK signalling pathway. *Archives of Medical Science* 18(6): 1572-1581.
80. Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Kang KW, Jeong HG (2010). Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by bergamottin via the inhibition of protein kinase C δ /p38 mitogen-activated protein kinase and JNK/nuclear factor- κ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Molecular Nutrition Food Research* 54(7): 977–990.
81. Kim SM, Lee JH, Sethi G, Kim C, Baek SH, Nam D, Chung WS, Kim SH, Shim BS, Ahn KS (2014). Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells. *Cancer Letters* 354(1): 153–163.
82. Vetrivelvan O, Gorjala P, Goodman O Jr, Mitra R (2021). Bergamottin a CYP3A inhibitor found in grapefruit juice inhibits prostate cancer cell growth by downregulating androgen receptor signaling and promoting G0/G1 cell cycle block and apoptosis. *PloS One* 16(9): e0257984.
83. Ko JH, Nam D, Um JY, Jung SH, Ahn KS (2018). Bergamottin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells and weight regulation in diet-induced obese mice. *Am J Chin Med* 46(3): 601-615.
84. Liu Y, Ren C, Cao Y, Wang Y, Duan W, Xie L, Sun C, Li X (2017). Characterization and purification of bergamottin from citrus grandis (L.) osbeck cv. yongjiazaoxiangyou and its antiproliferative activity and effect on glucose consumption in HepG2 cells. *Molecules* 22(7): 1227.
85. Yazıcı E, Şahin E, Alvuroğlu E, Yuluğ E, Menteşe A, (2023). Bergamottin reduces liver damage by suppressing inflammation, endoplasmic reticulum and oxidative stress in cafeteria diet-fed mice. *Food Bioscience* vol.52.
86. Eldeeb AH, Abo-Ashour MF, Angeli A, Bonardi A, Lasheen DS, Elrazaz EZ, Nocentini A, Gratteri P, Abdel-Aziz HA, Supuran CT (2021). Novel benzenesulfonamides aryl and arylsulfoneconjugates adopting tail/dual tail approaches: Synthesis, carbonic anhydrase inhibitory activity and molecular modeling studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 221: 113486.

87. Parkes JL, Coleman PS (1989). Enhancement of carbonic anhydrase activity by erythrocyte membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 275(2): 459–468.
88. Catalano R, Procopio F, Chavarria D, Benfeito S, Alcaro S, Borges F, Ortuso F (2022). Molecular modeling and experimental evaluation of non-chiral components of bergamot essential oil with inhibitory activity against human monoamine oxidases. *Molecules* 27(8):2467.
89. Li M, Zhang Y, Zeb A, Wu Y, Cheng L (2022). Bergamottin and PAP-1 Induced ACE2 degradation to alleviate infection of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci* 23(20):12565.
90. Wilbur KM, Anderson NG (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *The Journal of Biological Chemistry* 176(1): 147–154
91. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28(1): 235–242.
92. Jude KM, Banerjee AL, Haldar MK, Manokaran S, Roy B, Mallik S, Christianson DW (2006). Ultrahigh resolution crystal structures of human carbonic anhydrases I and II complexed with “two-prong” inhibitors reveal the molecular basis of high affinity. *Journal of the American Chemical Society* 128(9): 3011-3018.
93. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE (2021). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Research* 49(D1): D1388–D1395.
94. Dallakyan S, Olson AJ (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 1263: 243–250.
95. Trott O, Olson AJ (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 31(2): 455–461.
96. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, Lindahl E (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1: 19-25.
97. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25(13): 1605–1612.

98. Eastman P, Swails J, Chodera JD, McGibbon RT, Zhao Y, Beauchamp KA, Pande VS (2017). OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics. *PLoS computational biology* 13(7): e1005659.
99. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78(8): 1950-1958.
100. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 79(2): 926-935.
101. Sousa da Silva AW, Vranken WF (2012). ACPYPE-Antechamber python parser interface. *BMC Research Notes* 5: 1-8.
102. Jakalian A, Jack DB, Bayly CI (2002). Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *Journal of Computational Chemistry* 23(16): 1623-1641.
103. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 25(9): 1157-1174.
104. Supuran CT (2022). Anti-obesity carbonic anhydrase inhibitors: challenges and opportunities. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 37(1): 2478–2488.
105. Supuran CT (2025). Multi- and polypharmacology of carbonic anhydrase inhibitors. *Pharmacological Reviews* 77(1): 100004.
106. Supuran CT (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 7: 168–181
107. Pilla Reddy V, Jo H, Neuhoff S (2021). Food constituent–and herb–drug interactions in oncology: influence of quantitative modelling on drug labelling. *British Journal of Clinical Pharmacology* 87(10): 3988-4000.

108. Yildirmis S, Alver A, Yandi YE, Demir S, Senturk A, Bodur A, Mentese A (2016). The effect of erythrocyte membranes from diabetic and hypercholesterolemic individuals on human carbonic anhydrase II activity. *Archives of Physiology and Biochemistry* 122(1): 14–18.
109. Muhammed MT, Aki-Yalcin E (2024). Molecular docking: Principles, advances, and its applications in drug discovery. *Letters in Drug Design Discovery* 21(3): 480-495.
110. Macalino SJY, Gosu V, Hong S, Choi S (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research* 38: 1686-1701.
111. Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezech EM, Ofoke IH, Ogbu CO, Aja PM (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports* 13(1): 13398.
112. Aggul AG, Taslimi P, Kuzu M, Uzun N, Bilginer S, Gulcin I (2021). Oleuropein and verbascoside-Their inhibition effects on carbonic anhydrase and molecular docking studies. *Journal of Oleo Science* 70(9): 1275-1283.
113. Sentürk M, Gülçin I, Beydemir S, Küfrevioğlu Oİ, Supuran CT (2011). In Vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology Drug Design* 77(6): 494–499.
114. Köksal Z, Şenol H (2025). Anticholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory activities of natural carnosic acid derivatives: A comprehensive in vitro and in silico study. *Archiv der Pharmazie* 358(3): e2400909.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşe TEKİN
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Tarihi ve Yeri :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş)

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2025
Lisans	Artvin Çoruh Üniversitesi	2020
Lise	15 Temmuz Şehitleri Anadolu Lisesi	2015

HOBİLER

Kitap Okumak