T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENMİŞ KROMON TEMELLİ SÜLFONAMİDLERİN (KTS) SİTOZOLİK KARBONİK ANHİDRAZ I-II (CA I-II) VE TÜMÖR İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX-XII (CA IX-XII) İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Ecem ÖZ

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2015

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YENİ SENTEZLENMİŞ KROMON TEMELLİ SÜLFONAMİDLERİN (KTS) SİTOZOLİK KARBONİK ANHİDRAZ I-II (CA I-II) VE TÜMÖR İLİŞKİLİ KARBONİK ANHİDRAZ IX-XII (CA IX-XII) İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyza Ecem ÖZ

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2015

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Yeni Sentezlenmiş, Kromon Temelli Sülfonamidlerin Sitozolik Karbonik Anhidraz I-II (CA I-II) ve Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX-XII (CA IX-XII) İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması

Beyza Ecem ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

13.08.2015

Danışman
Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER

Eş Danışman
Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER
Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ
Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN
Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK
Yrd. Doç. Dr. Gülsüm AKDENİZ

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Özen Özensoy GÜLER
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, yabancı kaynaklardan alınan tüm bilgilerin tarafımdan çevrildiğini, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

13/08/2015



Beyza Ecem ÖZ

Bugünlere gelmemi sağlayan Canım Annem ve Babam'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, İtalya/Floransa Üniversitesi Biyoorganik Kimya Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Claudiu T. Supuran yönetiminde gerçekleşmiştir.

Bana her türlü yardım ve desteği sağlayan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, İtalya'da bu donanımlı ekiple çalışma fırsatını sunan değerli hocam Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e en derin minnet ve şükranlarımı sunmak isterim. Ayrıca, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli eş danışmanım Doç. Dr. Ahmet ÇARHAN ve değerli bölüm hocam Yrd. Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkür ederim.

İtalya'daki deneysel çalışmalarımda beni yönlendiren, Prof. Dr. Claudiu T. Supuran, Dr. Mariangela Ceruso, ve İtalya'da bulunduğum süre içinde yanımda olan tüm arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim.

Bu tezin her aşamasında yanımda olan, en zor zamanlarımda bir an olsun yalnız bırakmayan kardeşten öte olan canım arkadaşlarıma bana göstermiş oldukları sabır ve sonsuz destek için çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayallerim için benden çok mücadele eden, bütün eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bütün sıkıntılı anlarımda yanımda olan ve beni ayakta tutan sevgili anneme ve babama sonsuz teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. Kanser 3

2.1.1. Kanser Tedavisi 6

2.1.2. Tümör Mikroçevresi 7

2.1.3. Hipoksi 8

2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi 11

2.2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Tarihçesi 13

2.2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Gen Aileleri ve Dağılımı 13

2.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı 15

2.2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması 15

2.2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Fonksiyonları 16

2.2.6. Sitozolik Karbonik Anhidraz Enzimleri CA-I ve CA-II 17

2.2.7. Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz Enzimleri CA-IX ve CA-XII 19

2.2.8. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayin Yöntemleri 23

2.2.8.1. CO_2-Hidrataz Aktivitesi 23

2.2.8.2. Esteraz Aktivitesi 24

2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 24

2.3.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması 25

2.3.1.1. Sistemik Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 25

2.3.1.2. Topikal Karbonik Anhidraz İnhibitörleri 26

2.3.2. Sülfonamidler 27

2.3.3. Benzensülfonamidler 30

2.3.4. Kromonlar 31

3. MATERYAL ve YÖNTEM 35

3.1. Materyal 35

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler 35

3.1.2. Çalışmada İnhibitör Etkisi İncelenen Bileşikler..... 35

3.1.3. Çalışmada Yararlanılan Alet ve Cihazlar 43

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları..... 43

3.2. Yöntem 44

3.2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivitesinin Tayini 44

3.2.1.1. CO_2-Hidrataz Aktivitesi Tayini (Stopped-Flow Kinetik Aleti ile) 44

3.3. KTS Türevi Olan Bileşiklerin I_{50} Değerlerinin Saptanması 47

3.4. KTS Türevi Olan Bileşiklerin Sitozolik CA-I, CA-II ve Tümör İlişkili CA-IX, CA-XII İzoenzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi 47

4. BULGULAR 49

4.1. KTS Türevi Olan Bileşiklerin Sitozolik CA-I, CA-II ve Tümör İlişkili CA-IX, CA-XII İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi 49

4.1.1. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-I İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi 49

4.1.2. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-II İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi 55

4.1.3. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-IX İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi 61

4.1.4. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-XII İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi 67

5. TARTIŞMA 73

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 78

7. KAYNAKLAR 80

8. EKLER 94

EK-1. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Fonksiyonları ve Ekspresyon Bölgeleri 94

EK-2. Özgeçmiş 95

EK-3. Tezden Üretilen Yayın 96

EK-4. Uluslararası Platformda Sunulmuş Bildiri (Poster) 97

ÖZET

Yeni Sentezlenmiş Kromon Temelli Sülfonamidlerin (KTS) Sitozolik Karbonik Anhidraz I-II (CA I-II) ve Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz IX-XII (CA IX-XII) İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması

Karbonik anhidraz (CA, EC. 4. 2. 1. 1) enzimi, karbondioksit/bikarbonat'ın hidratasyon/dehidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize eden, çinko iyonu içeren metalloenzimlerden biridir. Sitozolik CA izoenzimlerinden CA I, eritrositlerde en bol miktarda bulunan enzim iken, diğer bir sitozolik izoenzim olan CA II çoğu organda yüksek eksprese olup birçok önemli fizyolojik sürece katkı sağlar. Tümör ilişkili izoenzimler CA IX ve CA XII ise hipoksi ile indüklenen, kanser süreci ile ilişkili olan ve birçok tümörde yüksek eksprese edilen tümör ilişkili proteinlerdir.

Bu çalışmada on iki adet yeni sentezlenmiş kromon temelli sülfonamid (KTS) türevi bileşiklerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi in vitro olarak incelemiştir. CA aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz aktivitesi kullanılmış ve Stopped flow kinetik cihazı ile ölçüm yapılmıştır.

Yeni sentezlenmiş kromon temelli sülfonamidler ile yapılan inhibisyon çalışmalarına göre, tümör ilişkili CA-IX için 7a ve 11a bileşikleri, tümör ilişkili CA-XII için ise 4a ve 10a bileşikleri en etkin bileşikler olmuştur. CA-IX için kinetik değerler, 7a ve 11a bileşikleri için sırasıyla K_i= 14.26 nM ve K_i= 18.39 nM'dır. CA-XII için kinetik değerler, 4a ve 10a bileşikleri için sırasıyla K_i= 4.54 nM ve K_i= 5.23 nM'dır. Kromon temelli sülfonamid türevi olan söz konusu bu bileşiklerin tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimlerine karşı seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir. Seçicilik gösteren bu bileşiklerin bazı klinik uygulamalarda tedavilere yeni yaklaşımlar getirebilecekleri düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnhibisyon, Karbonik anhidraz, Kromon, Tümör

ABSTRACT

Differential Inhibition Effects of Novel Chromone-Based Sulfonamides in Cytosolic Carbonic Anhydrase (CA-I and CA-II) and Tumor-Associated Carbonic Anhydrase (CA-IX and CA-XII) Isoenzymes

Carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) are one of the zinc enzymes which catalyze the reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate ion and proton. Cytosolic carbonic anhydrase isoenzyme CA-I is the most abundant enzyme in red blood cells and the other cytosolic isoenzyme CA-II is highly expressed in several organs and contributes to most important physiological processes. CA-IX and CA-XII are transmembrane tumor-associated isoenzymes because their extracellular enzyme domains are highly active and their expressions are induced by hypoxia.

In this preliminary study, differential in vitro inhibiton effects of twelve novel chromone-based sulfonamide derivatives were investigated for CA-I, CA-II, CA-IX and CA-XII. CA activities were determined by hydratase activity with using Stopped-Flow Instrument.

According to inhibition studies of novel chromone sulfonamides, 7a and 11a compounds were most potent for tumor associated isoenzyme CA-IX. Also, 4a and 10a compounds were most potent for tumor associated isoenzyme CA-XII. These results were given with kinetic constants as CA-IX, K_i=14.26 nM, K_i=18.39 nM for compound 7a and 11a respectively. Besides, the other kinetic constants as CA-XII, K_i= 4.54 nM, K_i= 5.23 nM for 4a and 10a respectively. This study shows that 4a, 7a, 10a and 11a compounds are selective against to CA-IX and CA-XII. From this point of view these derivative compounds could prove in potential pharmaceutical applications such a new approach for the treatment in some clinical applications.

Keywords: Carbonic anhydrase, Chromone, Inhibition, Tumor

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CA	: Karbonik Anhidraz Enzimi
hCA	: İnsan Karbonik Anhidraz Enzimi
CA-I	: Karbonik Anhidraz Enzimi-I
CA-II	: Karbonik Anhidraz Enzimi-II
CA-III	: Karbonik Anhidraz Enzimi-III
CA-IV	: Karbonik Anhidraz Enzimi-IV
CA-VA	: Karbonik Anhidraz Enzimi-VA
CA-VB	: Karbonik Anhidraz Enzimi-VB
CA-VI	: Karbonik Anhidraz Enzimi-VI
CA-VII	: Karbonik Anhidraz Enzimi-VII
CARP-VIII	: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein-VIII
CA-IX	: Karbonik Anhidraz Enzimi-IX
CARP-X	: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein-X
CARP-XI	: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein-XI
CA-XII	: Karbonik Anhidraz Enzimi-XII
CA-XIII	: Karbonik Anhidraz Enzimi-XIII
CA-XIV	: Karbonik Anhidraz Enzimi-XIV
CA-XV	: Karbonik Anhidraz Enzimi-XV
CAİ	: Karbonik Anhidraz Enzimi İnhibitörü
Zn^{+2}	: Çinko iyonu
HCO_3^-	: Bikarbonat iyonu
CO_2	: Karbondioksit
kDA	: Kilodalton
HRE	: Hipoksi yanıt elementi
HIF	: Hipoksi ile indüklenen faktör
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenen faktör-1α

HIF-2α : Hipoksi ile indüklenen faktör-2α

HIF-3α : Hipoksi ile indüklenen faktör-3α

HIF-1β : Hipoksi ile indüklenen faktör -1β

pVHL : Hippel-Lindau tümör baskılayıcı protein

TMÇ : Tümör Mikroçevresi

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

TCA : Trikarboksilik asit döngüsü

AZA : Asetazolamid

I_{50} : Yarı maksimal inhibitör konsantrasyonu

K_i : İnhibitör sabiti

KTS : Kromon temelli sülfonamid

3b bileşiği : 4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-*N*-(5-metil-izoksazol-3-il)-benzensülfonamid

3d bileşiği : *N*-(4,6-Dimetil-pirimidin-2-il)-4-[(2-etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-benzensülfonamid

3e bileşiği : 4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-*N*-tiazol-2-il-benzensülfonamid

3f bileşiği : 4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidinmetil)-amino]-*N*-piridin-2-il-benzensülfonamid

4a bileşiği : 4-[(4-Okso-4*H*-kromen-3-ilmetil)-amino]-benzensülfonamid

4b bileşiği : *N*-(5-Metil-izoksazol-3-il)-4-[(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetil)-amino]-benzensülfonamid

7a bileşiği : 4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-benzensülfonamid

7c bileşiği : 4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-*N*-pirimidin-2-il-benzensülfonamid

7f bileşiği : 4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-*N*-piridin-2-il-benzensülfonamid

10a bileşiği : 4-[5-Okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-2-fenil-4,5-dihidro-

imidazol-1-il]-benzensülfonamid

10b bileşiği : *N*-(5-Metil-izoksazol-3-il)-4-(5-okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-2-fenil-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid

11a bileşiği : 4-[2-(4-Kloro-fenil)-5-okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tümör gelişiminin evreleri 3
Şekil 2.2. Kanserin karakteri 4
Şekil 2.3. Tümör hücresinde pH düzenlenmesi 8
Şekil 2.4. Kanser hücrelerinde HIF'in rolü 10
Şekil 2.5. HIF transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği hipoksi indüklü gen ekspresyonunun mekanizması 11
Şekil 2.6. CA enziminin katalizlediği temel reaksiyon 12
Şekil 2.7. Katalitik olarak aktif insan α-CA'larının hücre içi yerleşimleri ve bölge kompozisyonlarının şematik gösterimi 14
Şekil 2.8. CA bağlama bölgesinin gösterimi 15
Şekil 2.9. α-CA'ların katalitik mekanizmanın şematik gösterimi 16
Şekil 2.10. hCA-II enziminin yapısı 18
Şekil 2.11. CA-IX ve CA-XII katalitik bölgesinin dimerik yapısı 19
Şekil 2.12. CA-IX ve CA-XII yapılarının şematik görünümü 20
Şekil 2.13. Tam-boy CA-IX dimerinin yapısal düzeninin önerilen modelinin gösterimi 21
Şekil 2.14. CA-IX proteinin yapısal organizasyonu 21
Şekil 2.15. Membranda CA-XII dimerinin şematik gösterimi 22
Şekil 2.16. Asetazolamid'in kimyasal yapısı 25
Şekil 2.17. Metazolamid'in kimyasal yapısı 25
Şekil 2.18. Diklorfenamid'in kimyasal yapısı 26
Şekil 2.19. Etokzolamid'in kimyasal yapısı 26
Şekil 2.20. Dorzolamid'in kimyasal yapısı 27
Şekil 2.21. Brinzolamid'in kimyasal yapısı 27
Şekil 2.22. hCA-II aktif bölgesi ve genel sülfonamid inhibitörü arasındaki anahtar etkileşimin şematik gösterimi 28
Şekil 2.23. Benzenesülfonamid'in kimyasal yapısı 30

Şekil 2.24. Benzenesülfonamid'in hCAII aktif bölgesi ile bağlanmasının şematik gösterimi 31
Şekil 2.25. Kromonların kimyasal yapısı 32
Şekil 2.26. Farmakolojik ajanlar olarak kullanılan kromon temelli bileşiklere örnekler 33
Şekil 3.1. Stopped-flow kinetik aleti 44
Şekil 3.2. Stopped-flow kinetik aletinin çalışma anındaki şematik gösterimi 46
Şekil 3.3. Stopped-flow kinetik aletinde örnek tutucu bölüm 46
Şekil 4.1. 3b bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 49
Şekil 4.2. 3d bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 50
Şekil 4.3. 3e bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 50
Şekil 4.4. 3f bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 50
Şekil 4.5. 4a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 51
Şekil 4.6. 4b bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 51
Şekil 4.7. AZA inhibitörünün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I) 51
Şekil 4.8. 7a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 52
Şekil 4.9. 7c bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 52
Şekil 4.10. 7f bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 52
Şekil 4.11. 10a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 53
Şekil 4.12. 10b bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 53
Şekil 4.13. 11a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 53
Şekil 4.14. AZA inhibitörünün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II) 54
Şekil 4.15. 3b bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 55
Şekil 4.16. 3d bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 55
Şekil 4.17. 3e bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 56
Şekil 4.18. 3f bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 56
Şekil 4.19. 4a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 56

Şekil 4.20. 4b bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 57
Şekil 4.21. AZA inhibitörünün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I)..... 57
Şekil 4.22. 7a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 57
Şekil 4.23. 7c bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 58
Şekil 4.24. 7f bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 58
Şekil 4.25. 10a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 58
Şekil 4.26. 10b bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 59
Şekil 4.27. 11a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 59
Şekil 4.28. AZA inhibitörünün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II) 59
Şekil 4.29. 3b bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 61
Şekil 4.30. 3d bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 61
Şekil 4.31. 3e bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 62
Şekil 4.32. 3f bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 62
Şekil 4.33. 4a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 62
Şekil 4.34. 4b bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 63
Şekil 4.35. AZA inhibitörünün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I) 63
Şekil 4.36. 7a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 63
Şekil 4.37. 7c bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 64
Şekil 4.38. 7f bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 64
Şekil 4.39. 10a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 64
Şekil 4.40. 10b bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 65
Şekil 4.41. 11a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 65
Şekil 4.42. AZA inhibitörünün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II)..... 65
Şekil 4.43. 3b bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 67
Şekil 4.44. 3d bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 67

Şekil 4.45. 3e bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 68
Şekil 4.46. 3f bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 68
Şekil 4.47. 4a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 68
Şekil 4.48. 4b bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 69
Şekil 4.49. AZA inhibitörünün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I) 69
Şekil 4.50. 7a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 69
Şekil 4.51. 7c bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 70
Şekil 4.52. 7f bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi 70
Şekil 4.53. 10a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi ... 70
Şekil 4.54. 10b bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi ... 71
Şekil 4.55. 11a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi ... 71
Şekil 4.56. AZA inhibitörünün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II) 71
Şekil 5.1. KTS türevi olan bileşiklerin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin dağılımları 76

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. α-CA'nın katalizlediği bazı reaksiyonlar 12
Tablo 2.2. Yüksek omurgalı α-CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfonamidlere olan affiniteleri ve hücre içi yerleşimleri 29
Tablo 3.1. Çalışmada inhibisyon etkisi incelenen bileşikler ve sülfonamid yapıları 36
Tablo 4.1. KTS türevi olan bileşiklerin CA-I izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri 54
Tablo 4.2. KTS türevi olan bileşiklerin CA-II izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri..... 60
Tablo 4.3. KTS türevi olan bileşiklerin CA-IX izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri..... 66
Tablo 4.4. KTS türevi olan bileşiklerin CA-XII izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri..... 72
Tablo 5.1. KTS türevi olan inhibitörlerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde gözlenen I_{50} değerleri. 75
Tablo 5.2. KTS türevi olan inhibitörlerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde gözlenen K_i değerleri 76

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik sistemlerin tepkime katalizörleri olup sentetik ve inorganik katalizörlerden çok daha iyi düzeyde katalitik güce sahiptir (1). Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. İnhibitörler, genellikle küçük mol kütlelerine sahip bileşik veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Birçok ilaç ve zehirli bileşik fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında biyokimyacılar için çok önemlidir (2).

Bir enzim olarak karbonik anhidraz (CA) çok ilgi görmektedir çünkü bilinen en hızlı enzimlerden biridir (3). Bu enzimler CO_2/HCO_3^-'ın hidratasyon/dehidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize ederek hücresel pH düzenlemesine anlamlı derecede katkı yapar (4).

CA-I ve CA-II memeli eritrositlerinde bulunan iki ana izoformdur (5). CA-IX ve CA-XII ise hipoksi ile indüklenen, tedaviye yanıt ve kanser süreci ile ilişkili olan kritik süreçlerde yer alan, birçok tümörde yüksek eksprese edilen tümör ilişkili proteinlerdir (6). CA'ların çeşitli fizyolojik süreçlerdeki önemli rolleri gösterilmiş ve bu enzimlerin anormal düzeyinin veya aktivitesinin çoğunlukla farklı insan hastalıkları ile olan ilişkisi ortaya konulmuştur (7).

Bu enzimlerin inhibitörleri altmış yıldan uzun süredir araştırılmakta olup (8) yaklaşık otuz adet CA inhibitörü (CAİ) antiglokom, antikonvülsant ve antiobezite ajanı olarak kliniklerde kullanılmaktadır (9). Son yıllarda ise CAİ'ler antikanser ajanları olarak klinik ve farmakolojik uygulamalarda yer almaya başlamışlardır (8).

Klinik olarak kullanılan CAİ'lere örnek olarak: Asetazolamid, Metazolamid, Etokzolamid, Diklorfenamid, Dorzolamid, Brinzolamid verilebilir (10). Ancak çoğu CAİ seçicilikten yoksundur ve sayısız istenmeyen yan etkileri vardır. Buna engel olabilmenin bir yolu da spesifik izoenzimleri inhibe eden inhibitörler sentez etmektir (11, 12).

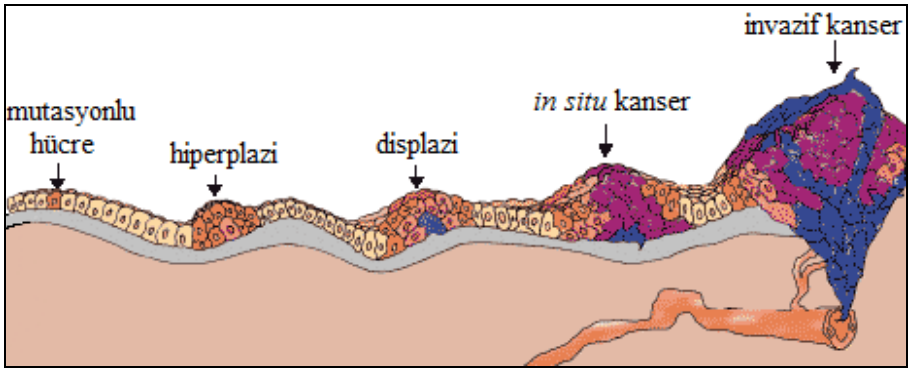
Çalışmamızda yeni sentezlenmiş olan on iki adet kromon temelli sülfonamid (KTS) türevi olan bileşiklerin, CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA-IX, CA-XII üzerine inhibisyon etkisi incelenecek ve bu KTS bileşiklerinin klasik CAİ'ü olan Asetazolamid'e göre üstünlüğünün olup olmadığı araştırılacaktır.

İnhibisyon etkisi incelenecek orijinal bileşiklerin klasik bir inhibitör olan Asetazolamid'e göre etkilerinin güçlü olması, bu bileşiklerin CA enziminin rol aldığı çeşitli insan hastalıkları için geliştirilen ilaç sentezlerinde yol gösterici bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

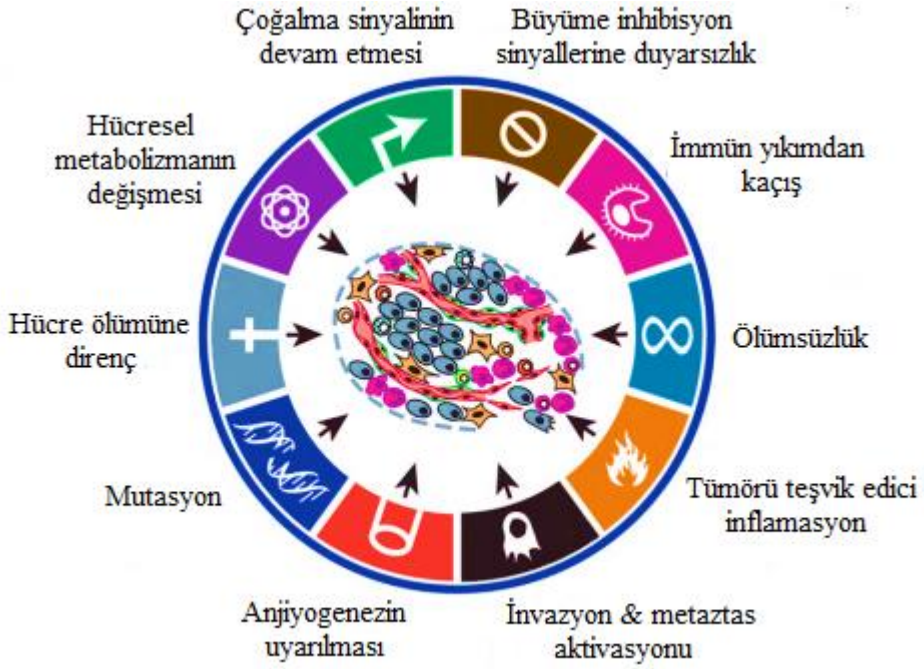
2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve belirli bir primer bölgeden ya da orijinden köken alarak vücuttaki başka bölgelere yayılması ve invazyonu ile karakterize olan bir grup hastalıktır (13). Çok hücreli bir organizmada hücrelerin üreme, çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalmalarını düzenleyen genlerdeki mutasyonlar kanserin sebebi olabilir (14). Mutasyon ile başlayan süreç hücreyi bölünmesi için mümkün hale getirir. Değişmiş hücre ve onun beraberindeki hücreler çoğunlukla büyür ve bölünür, bu duruma hiperplazi adı verilir. Herhangi bir anda, bu hücrelerden biri daha fazla bölünme eğilimini arttıran başka bir mutasyon geçirir ve bu hücrelerin beraberindeki hücreler de aşırı bölünür, bunun sonucunda anormal bir görünüm ortaya çıkar, bu duruma ise displazi adı verilir. Zaman geçtikçe, bu hücrelerden biri, farklılaşmanın ve hücreler arasındaki bağlantının kaybolmasına sebep olan bir başka mutasyon geçirir; ancak hala epitelyal tabakayla sınırlıdır, buna kanser in situ denir. Zamanla komşu dokulara istila edebilmeyi ve kan veya lenf içine hücreleri dökmeyi sağlayan ek mutasyonlar olabilir. İnvazif kanser yani malignant bu duruma verilen addır. Kaçan hücreler vücutta diğer bölgelerde yeni tümörler oluşturabilir. Bu durum ise metaztas olarak adlandırılır (Şekil 2.1) (15).



Şekil 2.1. Tümör gelişiminin evreleri (15)

Tüm kanserler, kanserin karakteri olduğu düşünülen bazı değişimler gösterirler (16). Bu değişimler Şekil 2.2'de gösterilmiştir (17).



Şekil 2.2. Kanserin karakteri (17)

Büyüme Sinyallerinde Kendine Yetebilme: Tümörler dış uyaran olmadan çoğalma kapasitesine sahiptir. Kanser hücrelerinde otonom hücre büyümesini teşvik eden genler onkogenlerdir. Onkogenlerin mutasyona uğramamış hücresel benzerleri protoonkogenlerdir. Onkogenler, protoonkogenlerden mutasyonla oluşurlar ve normal büyümeye teşvik sinyalleri yokluğunda hücre büyümesini teşvik etme yeteneği olan onkoproteinleri kodlarlar. Protoonkogenler, proliferasyonu ilerleten sinyal yolaklarında çoklu rollere sahiptir olup büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal ileticileri, transkripsiyon faktörleri veya hücre siklus komponentlerini kodlarlar. (EGFR, RAS, PI3K, BRAF, MYC, CDK'lar ve CDK inhibitörleri) (16).

Büyüme İnhibisyon Sinyallerine Duyarsızlık: Tümörler, normal hücrelerin proliferasyonunu inhibe eden moleküllere cevap vermeyebilir. Bu durum, genellikle büyüme inhibisyon yolaklarındaki bileşenleri kodlayan tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonundan dolayı gerçekleşir. Tümör baskılayıcı genlere örnek olarak RB, TP53 ve VHL verilebilir (16).

Hücresel Metabolizmanın Değişmesi: Oksijen yokluğunda kanser hücrelerinin hücresel metabolizması kendine özgü bir hal alır. Bu hücresel metabolizmada, yüksek düzeyde glikoz alımı gerçekleşirken, glikolitik yolak aracılığı ile glukozun laktoza dönüşümünde de artış gözlenir. Bu etki de Warburg etkisi olarak bilinir. Aerobik glikoliz tümör hücrelerinin hızlıca bölünmesini sağlar (16).

Apoptoz'dan kaçış: Tümörler programlanmış hücre ölümüne dirençlidir. Neoplastik hücrelerin birikimi apoptozu düzenleyen genlerin mutasyonu ile sonuçlanabilir. Apoptoz intrinsik ve ekstrinsik yolaklar ile başlar. Her ikisi de hücreye zarar veren kaspazların proteolitik kaskatının aktivasyonu ile sonuçlanır. Kanser hücrelerinde bu iki yolakta da anormallikler bulunmuştur (16).

Limitsiz Çoğalma Potansiyeli: Tümörler sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptir. Tüm kanserler, replikasyon potansiyeli sınırsız ve ölümsüz hücreler içerirler. Normal hücrelerde her bir bölünmede telomerler kısalırken, kanser hücrelerinin ekprese olmaya devam eden telomerleri vardır (16).

Anjiyogenez: Tümör hücreleri, normal hücreler gibi besin ve oksijeni almak için vasküler kaynak olmadan büyüme ve atıkları atma yeteneğine sahip değildir. Bu nedenle tümörler anjiyogenezi uyarmak zorundadırlar (16).

İnvazyon ve Metaztas: Tümör metaztasları kanser ölümlerinin sık görülen ana kaynağıdır. İnvazyon ve metaztas kanser hücreleri ve normal stroma arasındaki kompleks etkileşimlerin sonucudur ve kansere bağlı morbidite ve mortalitenin ana sebebidir (16).

Konakçının İmmün Cevabından Kaçma Yeteneği: Doğal ve kazanılmış immün sistemin hücreleri anormal antijenleri gösteren hücreleri tanır ve elemine eder. Kanser hücreleri ise ortamın immün cevabından kaçmak için sayısız değişimler geçirirler (16).

2.1.1. Kanser Tedavisi

Kanser tedavileri kemoterapi, radyoterapi, cerrahi, immünoterapi, ve kişiye özel tedavidir (18).

Kemoterapi, kan dolaşımı üzerinden etki eden sistemik bir tedavi şeklidir. Bu tedavide kullanılan antineoplastik ilaçlar sitotoksik etkileri sebebiyle malign hücrelerin çoğalmasını önler ve bu hücrelerin ölümüne yol açar. Antineoplastik kemoterapinin uygulaması ile hastanın sağlıklı hücrelerine zarar vermeden, tümörün büyümesini ve çoğalmasını durdurmak ya da yok etmek amaçlanmaktadır (19).

Radyoterapi, ışın tedavisi olarak adlandırılan yüksek enerjili parçacıkların hücre üzerinde yarattığı etkiden yararlanılarak yapılan bir tedavi biçimidir. Bu tedavide, yüksek doğrulukta radyasyon dozu uygulanarak, tanımlanmış tümör hacmine ve tümörü çevreleyen sağlıklı dokulara en az zarar verilerek kanser hücrelerinin proliferasyonu durdurulur (20).

Cerrahi tedavi, bölgesel bir tedavi şeklidir. Bu tedavi komşu doku ve organlara yayılmamış küçük tümörlerde başarılıdır. Bazı tip kanserler için cerrahi tedavi tek tedavi yöntemi olabilir (20).

İmmünoterapi, vücutta kansere karşı immün mekanizmaların güçlendirilmesi demektir. İmmünoterapi geçmişte ‘minör bir tedavi yaklaşımı’ olarak tanımlanırken günümüzde kanser tedavisinde giderek daha fazla yer almaktadır (19). Faz III klinik denemelerinde immünoterapinin metastatik melanom ve prostat kanser hastalarının yaşam süresini uzatabildiği gösterilmiştir (21).

Kişiye özel tedavi yaklaşımında, aynı hastalık tanısı konulmuş hastaların, aynı tedavi yöntemine farklı şekillerde cevap verdiği gözlemine dayanmaktadır. Bir ilaç bir hastada etkili sonuçlara yol açarken aynı ilaç bir başka hastada etkisiz olup ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir (22).

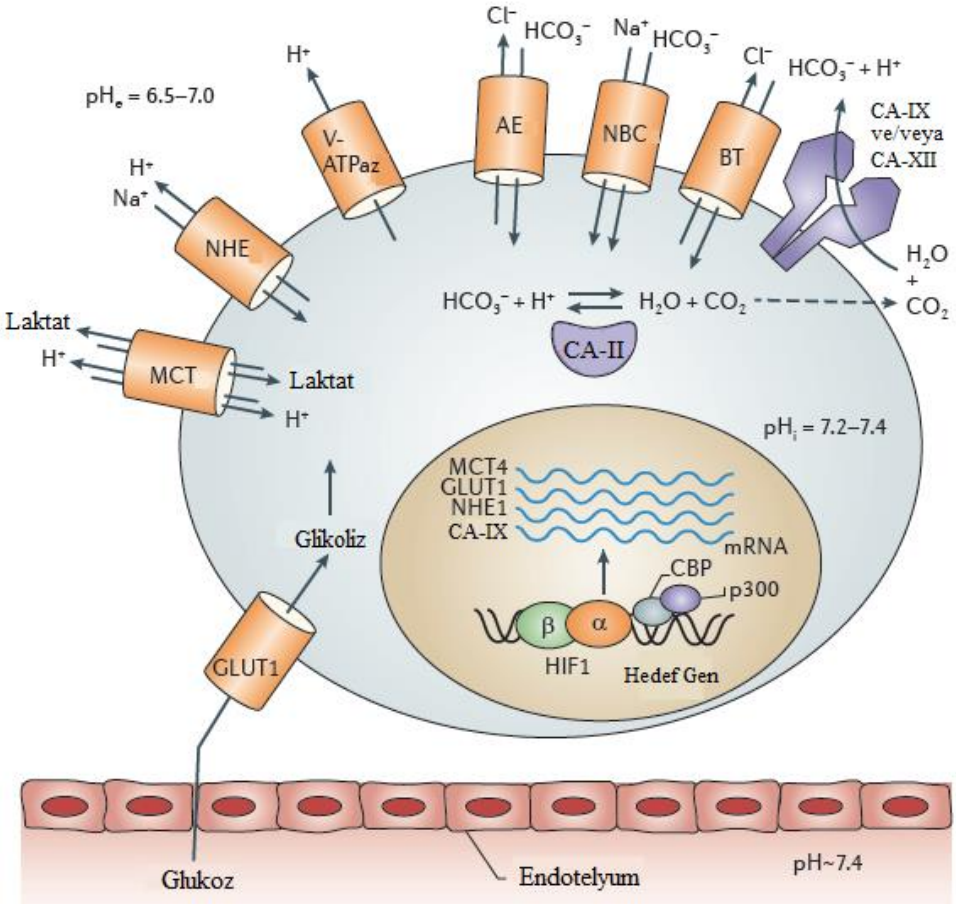
Hastaların ilaçlara verdikleri cevapta görülen çeşitliliğin genetik temellerini ortaya çıkarmak için genom dizileme ve yapılan genetik testler sonucu elde edilen

verilerin yorumlanmasında kullanılan biyoinformatik teknolojiler geliştirilmiştir. İlaç yanıtının öngörülmesinde, farmakogenetik testlerin sayısı her geçen gün hızla artmaktadır. Özellikle yüksek maliyetli kanser tedavilerinde bu tür yaklaşımlar çok önemlidir. Bu şekilde tedaviden hangi hastanın daha fazla yararlanacağı öngörülebilir ve faydası olmayacak tedavilerden kaçınılabilinir (23).

2.1.2. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresinin (TMÇ) çok iyi anlaşılması ile onkojenik etkinin nötralize edilmesi için stratejiler ve yeni tedavi seçenekleri geliştirilebilir (24). TMÇ, çeşitli hücre tiplerinin birleşimiyle meydana gelen kompleks heterojen bir düzendir (25). Bu düzende endoteliyal hücreler, perisitler, fibroblastlar, inflamatuvar hücreler, lökositler ve ekstraselüler matriksin elementlerini içeren bileşenler bulunmaktadır (26). TMÇ, tümör oluşması, proliferasyonu, gelişimi ve metaztası sırasında tümör hücreleri, stromal doku ve ekstraselüler matriks arasındaki etkileşimleri kurarak önemli bir rol oynar (27). TMÇ'deki asidozis ve hipoksi tümör gelişimi ve metaztasın oluşmasına katkı yapar (28). Bu çevrenin asidifikasyonu, aşırı laktat, proton ve CO_2 üretimine sebep olan hipoksi başlangıçlı onkojenik metabolizma ile oluşur. Asidik doku mikroçevresi anjiyojenik faktörlerin ve proteazın aktivasyonu ile, hücre-hücre adezyonunun azalması, migrasyon ve invazyonun artmasını içeren çoklu etkiler aracılığı ile tümör oluşumuna sebep olur. Tümör hücreleri, asidik metabolik ürünlerin intraselüler birikiminden kaçınmak için pH düzenleyen bir sistemi aktive eder (29). Şekil 2.3'te pH düzenleyen sistemde görev alan çeşitli proteinler gösterilmiştir (30). Bu proteinler, monokarboksilat taşıyıcılar (MCT'ler) (Glikozun gliokolitik degredasyonu tarafından oluşturulan diğer monokarboksilatların ve laktik asitin taşınmasında görev alır); Na^+/H^+ değiştiricileri (NHE'ler); Plazma membran proton pompası Vakuolar ATPaz (V-ATPaz); Anyon değiştiriciler (AE'ler); Na^+/HCO_3^- kotransportırları (birlikte taşıyıcıları) (NBC'ler); Karbonik anhidrazlar (CA-II, CA-IX ve/veya CA-XII) bu sistemde yer almaktadır. Sistemin diğer elemanları ise, BT-HCO_3^- taşıyıcısı; CBP, siklik AMP-cevap element-bağlayıcısı (CREB) protein; HIF-1, Hipoksinin indüklediği transkripsiyon faktör-1; p300, histon asetiltransferaz p300'dür. Glukoz taşıyıcısı GLUT1 (çoğu

tümörde upregüle olan) tümör hücrelerine glukoz taşır. İntraselüler pH (pH_i) hafif alkali iken (pH 7.2–7.4), ekstraselüler pH (pH_e) hafif asidiktir (pH 6.5–7.0) (30).



Şekil 2.3. Tümör hücresinde pH düzenlenmesi (30)

2.1.3. Hipoksi

Hipoksi, TMÇ'nin karakteristik bir özelliği olup çoğalan tümör hücrelerini desteklemede kan kaynağının yetersizliği sonucunda oluşur (31). Hipoksik ortam %2'den az O_2 ile tanımlanırken, sağlıklı dokularda bu oran, % 2-9'dur (32). Tümör hipoksisi kanserin seyrinde önemli bir belirteç olup, agresif büyüme, metaztas ve tedaviye kötü yanıt ile ilişkilidir (33). Tümör hücreleri hipoksik bir ortamda gelişmek ve büyüyebilmek için çeşitli adaptasyonlar geliştirirler. Bu hücreler, glikolitik metabolizmaya dönerler, proliferasyonu artırırlar, apoptozise dirençli hale gelirler, sınırsız bir replikasyon potansiyeli ve genomik kararsızlık kazanırlar, immün ataktan

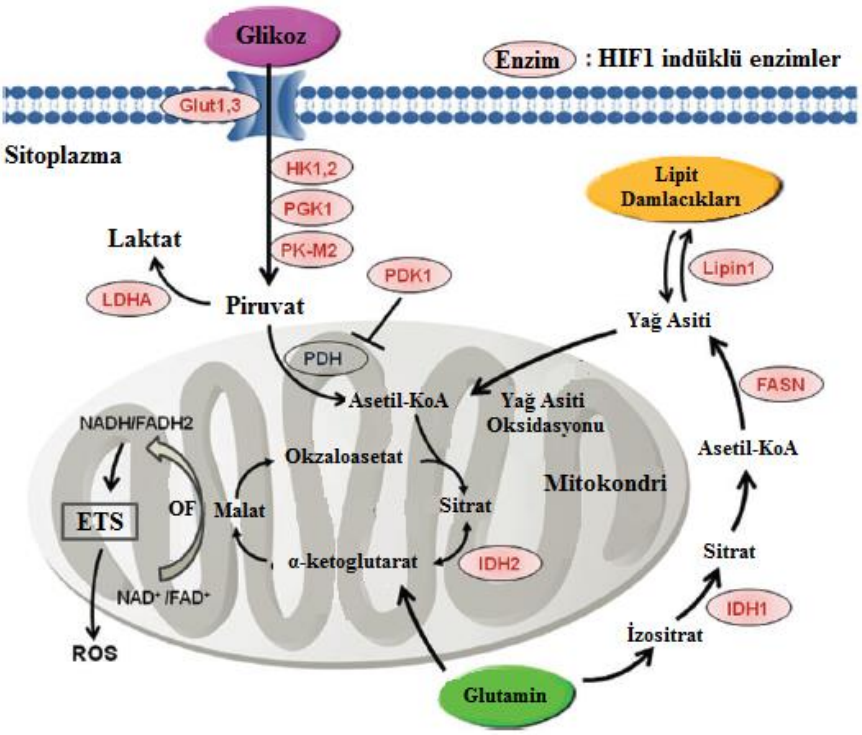
kaçarlar, anjiyogenezi indüklerler ve vücudun daha az hipoksik bölgelerine migrasyon yaparlar (34).

Yaklaşık seksen yıl önce Otto Warburg, O_2 yeterliliğinin azlığında normal hücrelere göre kanser hücrelerinin laktik asit üretmek için daha fazla glukoz tükettiğini gözlemlemiştir. Bu duruma aerobik glikoliz veya Warburg Etkisi denmiştir ve bu şekilde kanser hücrelerinde glukoz metabolizmasının değişimi ilk kez tanımlanmıştır. Hipoksi, glukozun TCA siklusuna girişini engeller ve oksidatif fosforilasyondan glikolize enerji üretimini, etkisi az ama daha hızlı ve güvenilir şekilde sağlar. Aynı zamanda, hipoksi, hücre sağkalımı ve proliferasyonu için lipit sentezini uyarır (35). Tümör metabolizması glukozu laktik asite çevirerek büyük miktarda asit üretirken, glikoliz aracılığıyla proton, oksidatif fosforilasyon ve pentoz fosfat yolağı aracılığıyla da CO_2 üretir (36). Bağımsız negatif hastalık seyri belirteci olarak düşünülen ve hem kanser hem de stromal hücreleri etkileyerek kanser sürecine katkı yapan mikroçevresel bir faktör olan (37) hipoksi, birçok kanserde oldukça sık görünür (38).

Hipoksi ile İndüklenen Faktörler

Hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF'ler), anjiyogenez, hücre sağkalımı, proliferasyon, apoptoz, adezyon ve metabolizmanın düzenlenmesinde rol alırlar (35). HIF'ler O_2 düzenleyici HIF-α altünitesinden (HIF-1α, HIF-2α ve HIF-3α) ve O_2 bağımsız HIF-1β altünitesinden oluşur (39). HIF-1α tüm hücrelerde yaygın şekilde eksprese edilirken, HIF-2α endotel hücreler gibi belli hücrelerde eksprese olur. HIF-3α'nın ekspresyon profili ve fonksiyonları büyük ölçüde bilinmemektedir (40). HIF-1α, HIF-2α veya HIF-3α, HIF-1β ile temel sarmal-döngü-sarmal şeklinde dimerize olarak heterodimerik kompleks oluşturur. Bu kompleks, genomdaki hipoksi cevap elementine bağlanır (39). HIF-1α, çeşitli hedef genleri uyararak memeli hücrelerinin hipoksiye cevabını kontrol eden temel düzenleyicidir. HIF-1α'nın ekspresyonu bir çok tümörün malignant sürecine ve gelişimine katkı yapar (41). HIF-1 ekspresyonu, hedef genler aracılığıyla, glikolitik metabolizmayı arttırır. Bunun sonucu olarak, kanser hücreleri, oksijen kaynağı sınırlı olduğunda, elektron transport zincirinden (ETS) üretilen aşırı ROS stresine karşı korunur. TCA siklusunu sürdürmek ve

biyosentetik talepleri karşılamak için, HIF-1, TCA siklusuna girip, hücre büyümesi ve bölünmesi için yağ asidi sentezini ve glutamin kullanımını uyarır (Şekil 2.4) (35).



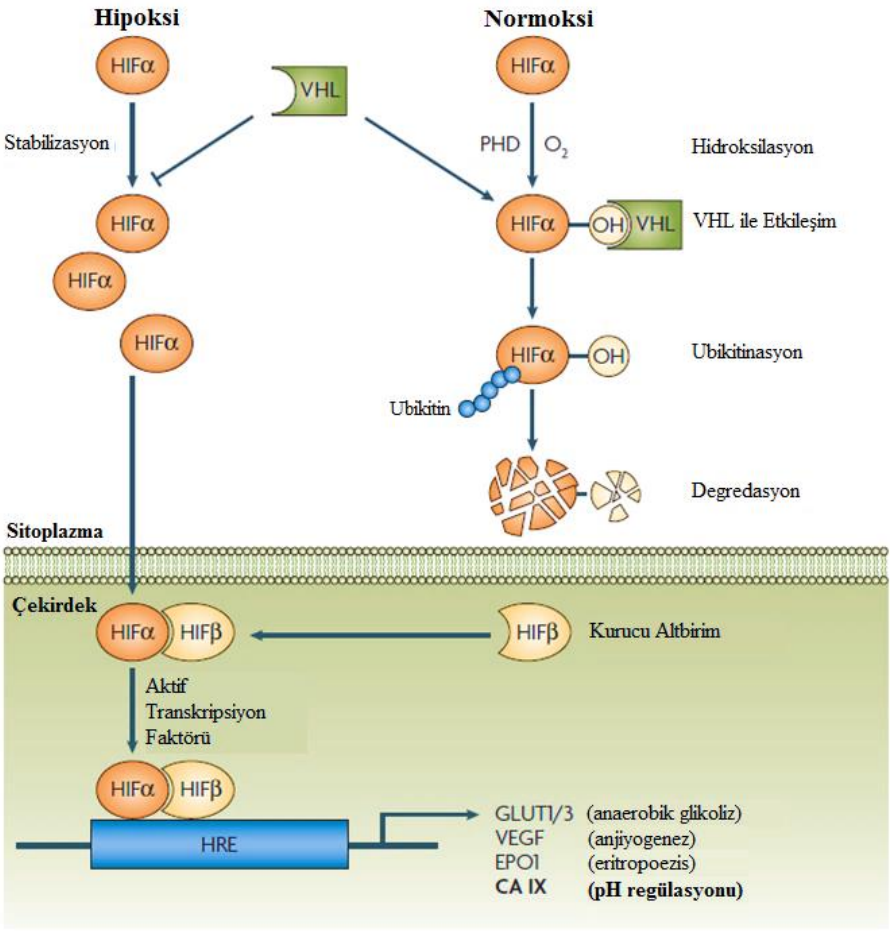
Şekil 2.4. Kanser hücrelerinde HIF'in rolü (35)

HIF-1 Düzenlenmesi

Hipoksi, HIF-1 yolağı aracılığı ile CA-IX izoenzimini de içeren birçok genin ekspresyonunu düzenler. CA-IX ekspresyonu hipoksi ile güçlü şekilde uyarılır ve yabanıl-tip von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı proteini (pVHL) ile downregüle edilir (Şekil 2.5) (7).

Normal oksijen düzeylerinde (Normoksi), prolil-4-hidroksilaz (PHD), HIF-α'daki p564'ü hidroksiller. von Hippel-Lindau proteini (VHL) hidroksillenmiş HIF-α'ya bağlanır ve ubikitin-proteozom sistem tarafından degredasyon için hedeflenir. Hipoksi altında, HIF-α hidroksillenemez, çünkü PHD oksijenin yokluğunda inaktiftir. Hidroksillenmemiş HIF-1, VHL proteini tarafından tanınmaz; stabilize kalır ve birikir. Nükleusa taşınmasından sonra, aktif transkripsiyon faktörü oluşturmak için HIF-α, HIF-β yapısal alt birimi ile dimerleşir. Sonra hedef genlerde

HIF transkripsiyon faktörü hipoksi cevap elementine (HRE) bağlanır ve transkripsiyonu aktive eder. Hedef genler; Glukoz metabolizmasına katılan glukoz taşıyıcılarını (GLUT1 ve GLUT3), neoanjiyogenezi başlatan vasküler endoteliyal büyüme faktörünü (VEGF), eritropoieziste yer alan eritropoietini (EPO1), pH düzenlenmesinde ve tümörogeneziste yer alan CA-IX'u, hücre sağkalımında, proliferasyonda, metabolizmada ve diğer süreçler ile ilişkili diğerlerini içerir (7).

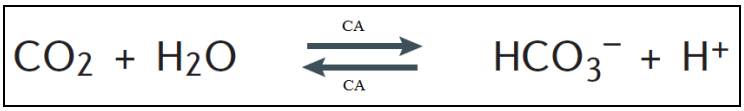


Şekil 2.5. HIF transkripsiyon faktörünün aracılık ettiği hipoksi indüklü gen ekspresyonunun mekanizması (7)

2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA) (EC 4.2.1.1) enzimleri, CO_2/HCO_3^-'ın hidratasyon/dehidratasyonunu geri dönüşümlü olarak katalize eden, hemen hemen

yaşayan tüm organizmalarda yaygın olarak bulunan metalloenzimlerdir (10). CA'ların katalizlediği reaksiyon Şekil 2.6'da gösterilmiştir (7).



Şekil 2.6. CA enziminin katalizlediği temel reaksiyon (7)

CO_2'in bikarbonata geri dönüşümlü hidratasyon reaksiyonuna (Reaksiyon 1.1) ek olarak, α-CA'lar çeşitli diğer reaksiyonları da katalize eder. Bunlar; Siyanat'tan karbamik asite hidrasyon veya siyamit'ten üreye (Reaksiyon 1.2 ve 1.3), aldehitin gem-diollere hidrasyonu (Reaksiyon 1.4), karboksilik esterlerin veya sülfonik esterlerin hidrolizi (Reaksiyon 1.5 ve 1.6) ve diğer az araştırılmış hidrolitik süreçlerdir (Reaksiyon 1.7-1.9) (Tablo 2.1) (4).

Tablo 2.1. α-CA'nın katalizlediği bazı reaksiyonlar (4)

$O=C=O + H_2O <=> HCO_3^- + H^+$	(1.1)
$O=C=NH + H_2O <=> H_2NCOOH$	(1.2)
$HN=C=NH + H_2O <=> H_2NCONH_2$	(1.3)
$RCHO + H_2O <=> RCH(OH)_2$	(1.4)
$RCOOAr + H_2O <=> RCOOH + ArOH$	(1.5)
$RSO_3Ar + H_2O <=> RSO_3H + ArOH$	(1.6)
$ArF + H_2O <=> HF + ArOH$	(1.7)
(Ar = 2,4-dinitrofenil)	
$PhCH_2OCOCl + H_2O <=> PhCH_2OH + CO_2 + HCl$	(1.8)
$RSO_2Cl + H_2O <=> RSO_3H + HCl$	(1.9)
(R = Me; Ph)	

Bir enzim olarak CA çok ilgi görmektedir çünkü bilinen en hızlı enzimlerden biridir (3). Hidratasyon reaksiyonu için en aktif CA'nın turnover sayısı (k_{cat}) 10^5-10^6 s^{-1} aralığındadır (42).

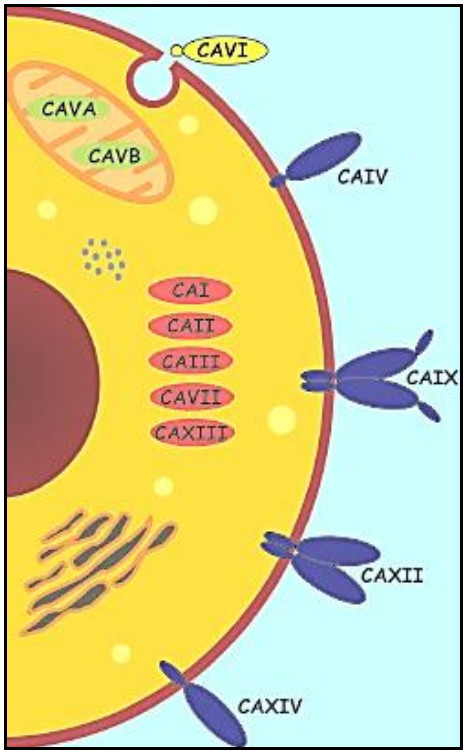
2.2.1. Karbonik Anhidraz Enziminin Tarihçesi

CA enziminin, CO_2 ve suyun geri dönüşümlü reaksiyonunu katalize eden çinko metalloenzim olduğu 1932 yılında keşfedildi (43). Bu enzim, 1933 yılında ilk kez eritrositlerden saflaştırıldı (44). O tarihten bu zamana kadar araştırılan bu enzimin, birçok memeli izoenzimleri tanımlandı. CA'nın, CO_2 fiksasyonu için gerekli olduğu yer olan bitkilerde yaygın olarak bulunuşu ise 1940'lardan beri bilinmektedir (45). Ökaryotik kan ve bitki hücrelerinde CA'nın varlığı, erken dönemlerden bu yana bilinir. Prokaryotlarda ise varlığı 1963 yılında saptanmıştır (46). Memeli α-CA'nın kristal yapısı ilk kez yaklaşık 40 sene önce tanımlanmıştır (43) ve 1994 yılında Smith ve Ferry adlı araştırmacıların enzimi karakterize etmeye başlaması sonucunda CA enzimi büyük ölçüde önem kazanmıştır (46).

2.2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Gen Aileleri ve Dağılımı

CA enziminin altı temel sınıfı vardır: α-, β-, γ-, δ-, ζ- ve η-CA'lar (47). Daha önce yapılan çalışmalarda, CA enzim ailesinin beş gen ailesinden oluştuğu belirtiliyordu (10). Ancak, CA'nın α sınıfına ait olduğu düşünülen insan sıtmasının en öldürücü tipinin etkeni olan protozoan parazit *Plasmodium falciparum*'un genomunun sekans dizisi ve diğer plazmodyum alttürlerine ait olan CA'lar yakından incelendiğinde ve filogenetik analizleri yapıldığında, *Plasmodium falciparum*'un henüz açıklanmayan bir kodlama olan η-CA sınıfı olarak ifade edilen yeni genetik aileye ait olduğu saptanmıştır (48). α-CA'lar genellikle hayvanlar arasında yaygınlardır ve vertabralılarda eksprese olan tek gen ailesidir. α-CA genleri çoğu bakteri, bitki ve algde bulunmasına ek olarak bu gruplarda β-CA'lar da bulunmaktadır. Ayrıca bazı invertabralılarda β-CA genleri eksprese eder. γ-CA'lar, çoğunlukla arkea ve bazı bakterilerde bulunur. δ ve ζ- CA'lar ise sadece deniz diatomlarında eksprese olur (4,49).

Memelilerden önemli fizyolojik rolleri olan on altı farklı α-CA izoformu izole edilip karakterize edilmiştir. Bunlardan bir kısmı sitozolik (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII, CA-XIII), bir kısmı ise membran-bağımlıdır. (CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV ve CA-XV), CA-VA ve CA-VB mitokondriyal olup, CA-VI ise tükrük bezinden sekrete edilmektedir. CA-XV izoformu insanlarda veya diğer primatlarda eksprese edilmemektedir ancak rodent ve diğer yüksek vertebralarda bol miktardadır. Ayrıca, CA enzimlerinin üç akatalitik formu bilinmektedir. Bunlar CA ilişkili proteinlerdir (CARP), CARP-VIII, CARP-X ve CARP-XI (50). α-CA'ların hücre içi yerleşimleri ve bölge kompozisyonları Şekil 2.7'de gösterilmiştir (10).

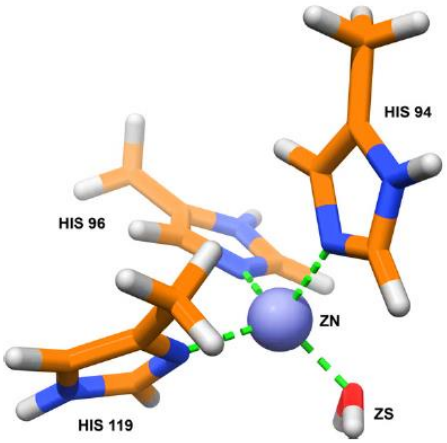


Şekil 2.7. Katalitik olarak aktif insan α-CA'larının hücre içi yerleşimleri ve bölge kompozisyonlarının şematik gösterimi (10)

İnsanlarda, CA'lar üreme kanalı, sindirim sistemi, böbrekler, sinir sistemi, deri, gözler, akciğerler ve diğer bazı dokuları içeren farklı bölgelerde dağılım gösterir (10). Ek-1'de CA enzimlerinin ekspresyon bölgeleri gösterilmiştir (51).

2.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

X-ray kristollografik bilgilerden elde edilen veriler, metal iyonunun CA enziminin aktif bölgesinin yarığında 15 Å derinliğin dibine yerleştiğini, üç histidin rezidüsü (His94, His96 and His119) ve bir su molekülü/hidroksit iyonu tarafından koordine edildiğini gösterir (7). Zn^{+2} iyonu üç korunmuş histidin rezidüsü ile tetrahedral durumda senkronize olmuştur ve H_2O veya OH^- dördüncü ligand olarak bağlanmıştır (52). Şekil 2.8'de CA bağlama bölgesi gösterilmiştir (53).



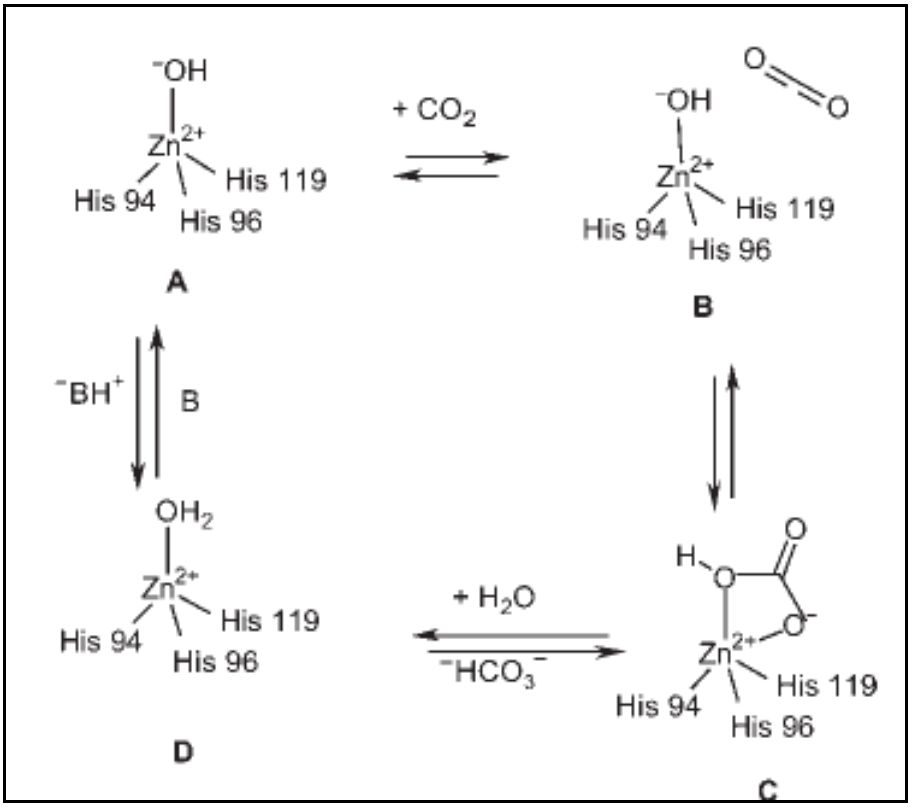
Şekil 2.8. CA bağlama bölgesinin gösterimi (53)

Bütün CA izoformlarında aktif bölge kavitesi bir yüzü hidrofobik (V121, V143, L198, V207 ve W209), diğer yüzü hidrofilik (Y7, N62, H64, N67, T199 ve T200) aminoasitlerden oluşan korunmuş iki farklı ortama bölünmüştür. Aktif bölgenin kenarından çeşitli izoformlara karakteristik olan yüzey cepleri çıkar (54). Çalışmalar, bu iki bölgenin de CO_2'in bikarbonata hızlı bir şekilde dönüşümünde gerekli olduğunu göstermiştir (55).

2.2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Bugüne kadar belirlenen tüm CA'lar iki basamaklı ping-pong mekanizmasına aracılık etmek amacıyla metal-hidroksit mekanizmasını kullanırlar (54). Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur. Enzimin aktif

formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne atak yapar. Bu etkileşim, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır. Bu durum enzimin katalitik olarak inaktif asit formuna dönüşmesini sağlar. Temel formu elde etmek için aktif bölgedeki rezidüler ve/veya tamponda bulunan iyonların etkisi ile aktif bölgeden çevreye bir H^+ transferi gerçekleşir. Enzimin temel hale dönmesi hız belirleyici basamak olduğu için son derece önemlidir (Şekil 2.9) (9).



Şekil 2.9. α-CA'ların katalitik mekanizmanın şematik gösterimi (9)

2.2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Fonksiyonları

CO_2'in ve suyun, HCO_3^- ve protona dönüşümünü katalize eden CA'lar, ilaç keşifleri için hedef olarak büyük ilgi çekerler. Çünkü, bu enzimlerin temel fizyolojik süreçler olan, doku ve akciğerler arasında CO_2/HCO_3^-'ün taşınması ve respirasyonu, CO_2 homeostazisi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonu, biyosentetik

reaksiyonlar (glukoneogenezis, lipogenezis ve üreagenezis), kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşturma ve diğer birçok fizyolojik ve patolojik süreçler ile ilişkisi vardır (4). Ek-1'de CA enzimlerinin fonksiyonları gösterilmiştir. Ayrıca, CA'ların ürettikleri bikarbonatın transmembran taşınımına ve hücresel pH düzenlemesine anlamlı derecede katkısı vardır (56). İnsanlarda böbrekte bulunan CA izoformları olan CA-II, CA-IV, CA-VB, CA-IX, CA-XII ve CA-XIV, asit/baz denge homeostazisi (CA enzimlerinin katalizlediği CO_2 hidrasyon reaksiyonundan gelen protonların sekrete olması), bikarbonat reabsorbsiyonu ve renal NH^{+4} çıkışı gibi fizyolojik süreçlerde rol oynar (57). CA izoenzimlerinin çoğu bu önemli süreçlerde yer aldığı için, ödem, glokom, obezite, kanser, epilepsi ve osteoporozis gibi hastalıkların tedavisinde inhibe edilebilecek potansiyel tedavi edici hedefler olarak önemlidirler (7). Çalışmalar, CA'ların çeşitli fizyolojik süreçlerdeki önemli rollerini göstermiş ve bu enzimlerin anormal düzeylerinin veya aktivitelerinin insan hastalıkları ile olan ilişkilerini ortaya koymuştur (7,58).

2.2.6. Sitozolik Karbonik Anhidraz Enzimleri CA-I ve CA-II

CA-I ve CA-II memeli kırmızı kan hücrelerinde bulunan iki ana izoformdur (5). Eritrositlerde CA-II'den 5-6 kat daha fazla eksprese olan sitozolik CA-I, CA olarak ana rolü olduğunu kanıtlar. CA-I'in, CA-II'nin yokluğunda temel bileşen olabileceği düşünülmektedir (51).

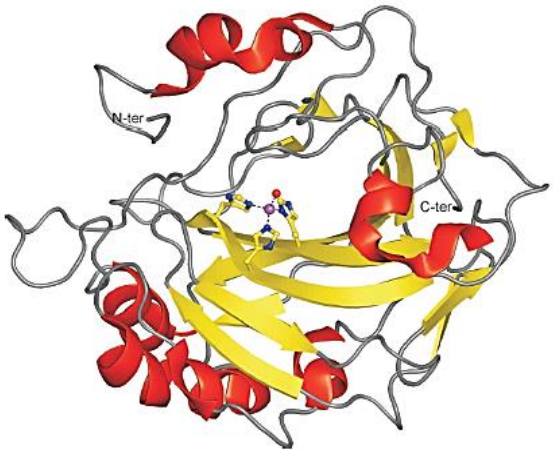
CA-I

CA1 geni 8.kromozom üzerindeki CA2 ve CA3 genleri ile yakından bağlantılıdır. CA1 geni, eritrositlerde yüksek düzeyde bulunan sitozolik proteini kodlar. Bu genin yerleşimi 8q21.2 olup, ekzon sayısı 11'dir (59). CA-I eritrositlerde en bol miktarda bulunan ve hemoglobin taşımayan proteindir ancak eksikliği herhangi bir anomali göstermez (51). Vasküler duvarda bulunan CA-I hem vazokonstraksiyon (damarların kasılması) hem de vazodilatasyonda (damarların genişlemesi) görevlidir (60). CA-I'in prostat kanserinde prostat spesifik antijen (PSA) gibi tanıda görev görebileceği ve hasta bireylerde CA-I seviyesinin sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu dolayısıyla CA-I'in bu hastalıkta bir biyobelirteç

olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (61). Ayrıca yapılan bir çalışmada, CA-I'in kolon epitelinde asit baz dengesinde rol oynadığı bulunmuştur (62). Feener ve grubunun yaptığı bir çalışmada ise retina ve beyin ödeminde CA-I'in bulunduğu ve CA-I inhibisyonunun bu durumda değerli bir araç olabileceği gösterilmiştir (63).

CA-II

CA-II, karışık α/β globüler katlanması ile 260 aminoasitten oluşan 29 kDA ağırlığında monomerik bir proteindir. En iyi çalışılmış ve insanlarda en bol bulunan izoenzim olup, 7 α-heliksle çevrili 10 β-sheetten oluşur (54). Şekil 2.10'da hCA-II izoenziminin yapısı gösterilmiştir (10). CA2 geninin yerleşimi 8q22 olup, ekzon sayısı 7'dir (64).



Şekil 2.10. hCA-II enziminin yapısı (10)

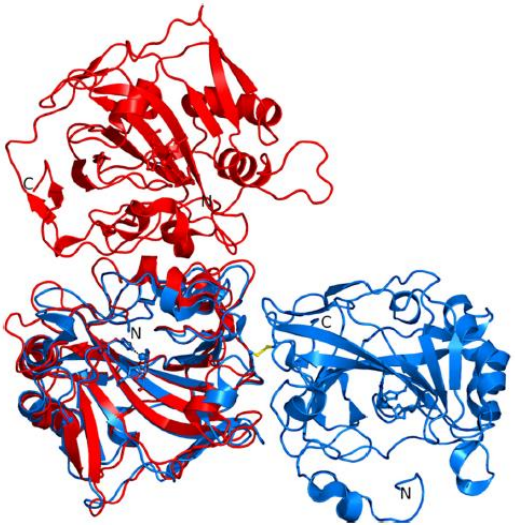
CA'ların içinde en yüksek turnover oranına sahip, en çok çalışılan izoenzim olan CA-II (65) çoğu organda yüksek eksprese edilir ve birçok önemli fizyolojik sürece katkı sağlar (66). Kemikteki osteoklastları, retinal müller hücreleri, hepatositleri, böbrekleri, beyindeki oligodendritleri, tükrük bezleri, eritrositleri ve plateletleri içeren hemen hemen tüm doku ve organlarda geniş dağılım gösterir. Bu izoenzim H^+ üretimine ve asit-baz homeostazisine, pH dengesine ve metabolik asidozise katkı yapar. Eritrositlerde, akciğerlerde ve renal proksimalde CO_2 değişimini başlatır (51). Söz konusu izoenzim, aynı zamanda göze sodyumun primer transport mekanizmasında yer alır ve intraoküler basıncın düzenlenmesinden sorumludur (67). CA-II'nin inhibisyonu, glokomda görülen ve gözün optik sinirine

zarar veren intraoküler basıncı azaltır (3). Bu sebeple glokom tedavisinde CA-II inhibitörleri önemlidir.

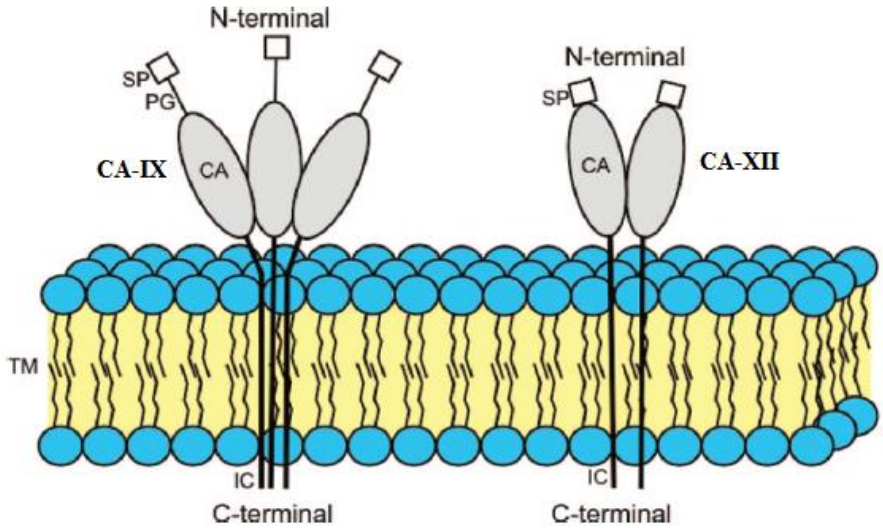
Son çalışmalarda, CA-II'nin normal damar endotelinde bulunmazken tümör damarlarında eksprese olduğu ortaya çıkmış (68) ve bu izoenzimin akciğer, renal, özofagal ve melanom kanserlerinin tümör damar endotelinde eksprese olduğunu gösterilmiştir (69).

2.2.7. Tümör İlişkili Karbonik Anhidraz Enzimleri CA-IX ve CA-XII

CA-IX ve CA-XII, hipoksi ile indüklenen, tedaviye yanıt ve kanser süreci ile ilişkili olan birçok tümörde yüksek eksprese edilen tümör ilişkili proteinlerdir (6). Şekil 2.11'de CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin katalitik bölgelerinin dimerik yapısı gösterilmiştir (70). Bu proteinler ekstraselüler boşlukta aktif bölgelere sahip oldukları için bu izoenzimlerin katalizledikleri reaksiyon, tümör hücre göçü, invazyonu ve metaztasının oluşumunda ekstraselüler asidifikasyona katkı yapar (28). CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin yapılarının şematik görünümü Şekil 2.12'de gösterilmiştir (71).



Şekil 2.11. CA- IX (mavi) ve CA-XII (kırmızı) katalitik bölgesinin dimerik yapısı (70)



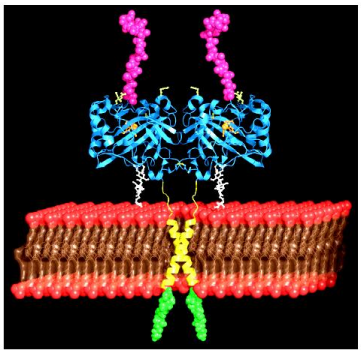
Şekil 2.12. CA-IX ve CA-XII yapılarının şematik görünümü
*Sinyal peptitleri (SP), proteoglikan-ilişkili bölgeler (PG), karbonik anhidraz domainler (CA), transmembran bölgeler (TM) ve intraselüler kuyruklar (IC) (71)

Tümör ilişkili bu iki izoenzimin kanser hücrelerinin ekstraselüler çevresinin asidifikasyonunda etkin olmasından dolayı, bu izoenzimlere özgü CAİ'lerin, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve invazyon kapasitesinin azaltılmasında kullanılabileceği gösterilmiş (72) ve son çalışmalarda, antitümör ve antimetastatik etkiler gösteren bu izoenzimleri spesifik olarak hedefleyen CAİ'ler raporlanmıştır (6).

CA-IX

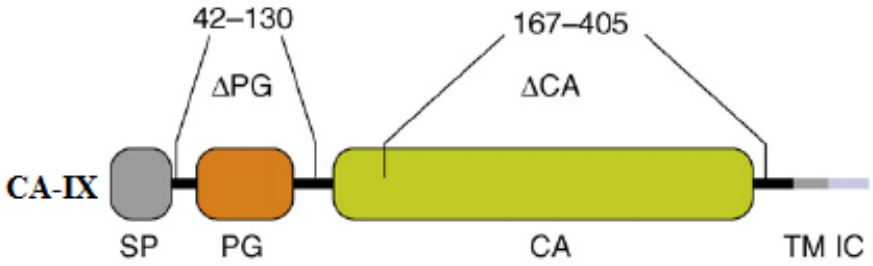
Tümör ile ilişkili olduğu bulunan ilk CA olan CA-IX, Pastorekova ve arkadaşları tarafından 1992 yılında raporlanmış (50) ve daha sonra bu izoenzimin geni (CA9) karakterize edilmiştir (73). CA9 geninin yerleşimi 9p13.3 ve ekzon sayısı 10'dur (74).

CA-IX katalitik bölgesinin kristal yapısı 2009 yılında raporlanmış (Şekil 2.13) ve α-CA enzimleri arasında tek kuarterner yapıya sahip olan izoenzim olduğu gösterilmiştir (70).



Şekil 2.13. Tam boy CA IX dimerinin yapısal düzeninin önerilen modelinin gösterimi (70)

CA-IX çoklu bölgeye sahip olan, kompleks organize olmuş transmembran bir proteindir. İzoenzim, i) Fonksiyonu bilinmeyen küçük intrasitozolik kuyruk ii) Kısa transmembran segment iii) Diğer α-CA'ların katalitik bölgelerine yüksek sekans homolojisi gösteren ekstraselüler katalitik bölge iv) CA-IX proteininde bulunan hücre adezyon sürecinde çok önemli olan özgün proteoglikan bölge ve v) Kısa sinyal peptiti içerir (Şekil 2.14) (50).



Şekil 2.14. CA-IX proteininin yapısal organizasyonu (50)

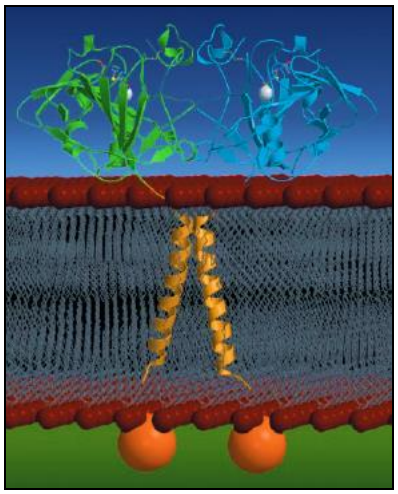
CA-IX tümör mikroçevresinde, asit-baz dengesini ve intraselüler ilişkiyi düzenleyen bir transmembran protein olup (50) hücre yayılmasının başlangıcında fokal adezyon ilişkisinin oluşması ve olgunlaşmasına katkı yapar (75). CA-IX hipoksiye en iyi cevap vericidir. Çünkü CA9 geni, transkripsiyon başlama bölgesinin hemen önünde lokalize olan HRE sekansına bağlanan HIF-1 aracılığıyla hipoksi tarafından transkripsiyonel olarak düzenlenir (33). Hipoksik koşullar altında CA-IX, HIF-1α tarafından upregüle edilir ve pH homeostazisini sağlamak için hücreye HCO_3^-'ü transport eder (76). Geriye kalan ekstraselüler H^+, tümör mikroçevresini asitleştirir, metalloproteinazları aktive eder, anjiyogenezisi indükleyip invazyon ve metaztası kolaylaştırır (77,78).

Normal dokularda, CA-IX sadece glandular midenin mukozasında, büyük safra kanalı ve peritoneal hat boyunca eksprese edilir. CA-IX overekspresyonu baş-boyun kanserleri, akciğer karsinomları, özofagal kanser ve yumuşak doku sarkomalarını içeren katı tümörlerin birçok tipinde bulunur. Çoğu çalışmada, CA-IX ekspresyonu hastalığın seyrinin kötüye gitmesi ile ilişkilidir (28, 30, 79). CA-IX'un hastalığın seyrindeki önemi ve pH düzenlenmesindeki önemli rolü esas alındığında, bu enzimin kanser tedavisi için temel hedef olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple, son yıllarda sülfonamidler ve sülfonamidlerin izoesterleri olan birçok CAİ'i geliştirilmektedir (80).

CA-XII

CA-XII izoenzimini kodlayan CA12 geninin üç transkript varyantı belirlenmiştir. Bu genin yerleşimi 15q22 olup, ekzon sayısı 11'dir (81).

Söz konusu enzimin sinyal sekansı çıkarıldıktan sonra, 325 aminoasit içerir ve bu enzim, ek kısa ekstraselüler bölüm, hidrofobik transmembran bölge ve C-terminal sitoplazmik kuyruktan oluşur (82). CA-XII dimerinin şematik yapısı Şekil 2.15'te gösterilmiştir (83).



Şekil 2.15. Membranda CA-XII dimerinin şematik gösterimi (83)

CA-XII, CA-IX'a genel yapı olarak benzer (CA-IX'un proteoglikan-benzeri bölgesi dışında). CA-XII ekspresyonu da hipoksi tarafından indüklenir ama altında

yatan moleküler mekanizma hala bilinmemektedir. CA-XII'nin birçok tümör dokusunda CA-IX ile birlikte eksprese edildiği ve normal dokularda daha geniş bir aralıkta bulunduğu gösterilmiştir (71).

CA-XII'nin ekspresyonu normal dokularda ve kanserin birçok tipinde incelenmiştir. Bu izoenzim, normal böbrek ve kolon dokusunda (84,85) ayrıca derinin ter bezleri ve epidermisin bazal hücrelerinde gösterilmiştir (86). CA-XII'nin sadece normal insan böbreğinde değil berrak hücre karsinomu ve onkositomlarda da eksprese edildiği açıklanmıştır (84). Renal tümörlere ek olarak, CA-XII kolorektal tümörlerin (85) ve memenin duktal karsinomlarının (87) bir dizisinde ifade edilir.

Yapılan çalışmalar, CA-IX ve CA-XII'nin intraselüler pH'ı düzenleyerek tümör hücrelerinin sağkalımını sağladığı bu sebeple kombin hedeflemelerin yeni antikanser ilaçlarının gelişiminde önemli bir mücadele olabileceğini düşündürmektedir (6).

2.2.8. Karbonik Anhidraz Enziminin Aktivite Tayin Yöntemleri

2.2.8.1. CO_2-Hidrataz Aktivitesi

CA enziminin hidrataz aktivitesi, enzimin CO_2 molekülünün hidratasyonundan, HCO_3^- iyonunun dehidratasyonundan ve bazı esterlerin hidrolizinden sorumlu olma özelliğinden yararlanılarak belirlenmektedir. CA enziminin reaksiyonunda ortamda ilk olarak CO_2 gazı açığa çıkmakta veya harcamakta, diğer taraftan da H^+ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Enzim aktivitesi, ortamdaki H^+ konsantrasyonunun değişmesi ile pH değeri etkileyeceğinden dolayı indikatörle belirlenebilir. Bu yöntemde, CO_2 hidratasyonunda pH'ın 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO_2 hidratasyon süresi (t_o) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir (88).

2.2.8.2. Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda CA aktivitesi ölçümü bu şekilde belirlenebilmektedir. Bu yöntemde CA enzimi, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitrofenol ve p-nitrofenolata hidroliz eder. Bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon göstermektedir (89).

2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

CA izoenzimleri inhibitör ve aktivatörlerin sentezinde ilgi çekici hedefler olmuşlardır (90).

CAİ'ler altmış yıldan uzun süredir araştırılmakta olup (8) yaklaşık otuz tane CAİ, antiglokom (CA-II, CA-IV, CA-XII'yi hedefler.), antikonvülsan (CA-II, CA-VII ve CA-IV'ü hedefler.), antiobezite (CA-VA ve CA-VB'yi hedefler) ajanı olarak kliniklerde kullanılmaktadır (91). Son yıllarda CAİ'lerin antienfektif ve antikanser ilaçlar olarak potansiyel kullanımları ile ilgili çalışılmaktadır (7).

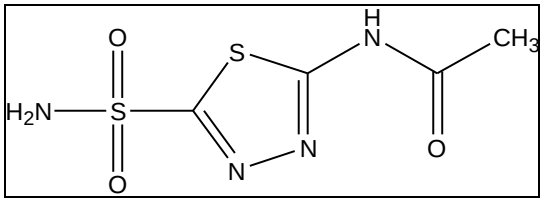
CAİ'ler enzim bağlanma bölgelerine göre iki ana sınıfa ayırılır: Enzimin aktif bölgesinde katalitik çinko iyonuna kendini bağlayanlar ve metal iyonu ile direkt etkiye girmeyip aktif bölgeye bağlananlar. Kristallografik olarak çalışılan ve çinko iyonuna bağlanan inhibitörler: ureatlar/hidroksamatlar, merkaptofenoller, metal kompleks anyonlar ve sülfamatlar/sülfamitler gibi biyoizoesterleri ile sülfonamidlerdir (10). Metal merkeze direkt olarak bağlanmayan inhibitörler ise fenoller, poliaminler, bazı karboksilatlar ve sülfokumarinlerdir. Kumarinler ve bazı laktonların önilaç inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Bu inhibitörler aktif bölge kavitesinin girişine hidrolize formda bağlanmaktadırlar. Yeni ilaç sentez stratejileri de "kuyruk yaklaşımı" ile devam etmektedir. Bu yöntem ile enzimin aktif bölgesinde daha fazla dış bağlanma bölgeleri olan CAİ'ler elde edilebilmektedir (92).

2.3.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması

2.3.1.1. Sistemik Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Asetazolamid

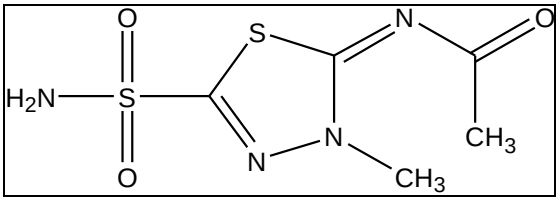
Asetozolamid, CAİ'lerin sistemik formu olup 1954'ten beri kullanılmaktadır (93). Antimikrobiyal etkinliği olmayan sentetik bir sülfonamid türevidir. Mide-bağırsak tarafından kolaylıkla absorbe edilir. İdrar hacmini artırır ve idrarı alkali hale getirir (94). İdrar içinde atılan bikarbonat, Na^+ ve K^+ miktarını arttırırken, klorür miktarını azaltır (7). Asetazolamid, glokom, yükseklik hastalığı ve iyi huylu intrakraniyal hipertansiyon tedavisinde kullanılan CAİ'dir (51). Asetazolamid'in kimyasal yapısı Şekil 2.16'da gösterilmiştir (90).



Şekil 2.16. Asetazolamid'in kimyasal yapısı (90)

Metazolamid

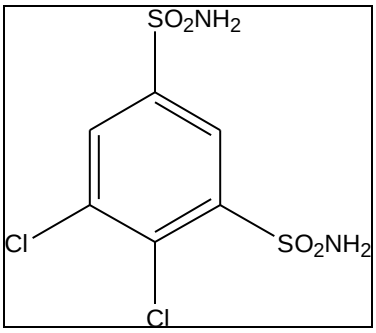
Metazolamid, daha az yan etkisi olan CAİ'leri bulma çabaları sonucu geliştirilmiştir (94). Metazolamid de bir CAİ'dir ve yan etkileri Asetozolamid'e oranla daha azdır. Ancak Asetozolamid'den daha az etkilidir. Proteine bağlanma oranı düşük olmasından dolayı daha az dozlarda kullanılır ve yarılanma ömrü daha uzundur (93). Metazolamid'in kimyasal yapısı Şekil 2.17'de gösterilmiştir (90).



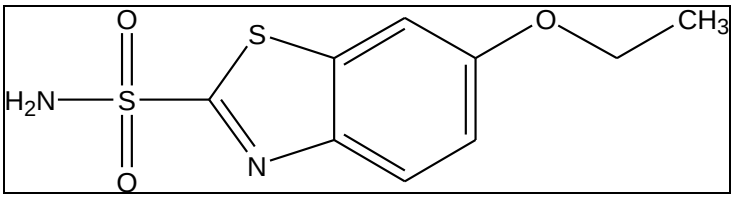
Şekil 2.17. Metazolamid'in kimyasal yapısı (90)

Diklorfenamid ve Etokzolamid

Asetazolamid kullanımın yüksek oranda yan etkilere neden olması yan etkisi düşük yeni CAİ'leri bulma çabası doğurmuştu (94). Bu amaçla üretilen Diklorfenamid ve Etokzolamid'in, Asetazolamid'e üstünlükleri yoktur (93). Söz konusu iki inhibitörün kimyasal yapıları Şekil 2.18 (95) ve Şekil 2.19'da (90) verilmiştir.



Şekil 2.18. Diklorfenamid'in kimyasal yapısı (95)

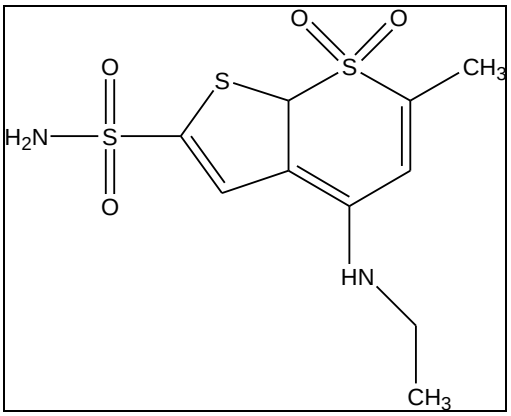


Şekil 2.19. Etokzolamid'in kimyasal yapısı (90)

2.3.1.2. Topikal Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Dorzolamid

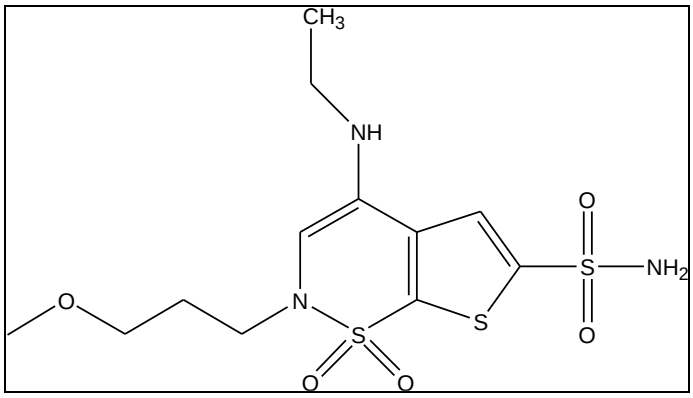
Dorzolamid, ilk topikal CAİ'dir ve kullanıma girmesi glokom tedavisinde önemli bir gelişmedir. Dorzolamid'in plazma proteinlerine bağlanması orta düzeydedir. Dorzolamid idrar yoluyla değişmeden atılır (93). Dorzolamid'in kimyasal yapısı Şekil 2.20'de gösterilmiştir (90).



Şekil 2.20. Dorzolamid'in kimyasal yapısı (90)

Brinzolamid

Brinzolamid ise Dorzolamid'e bir yan zincir eklenmesiyle elde edilmiştir. İkinci topikal CAİ olan Brinzolamid, 1998'den beri oftalmolojide kullanılmaktadır. Dorzolamid ve Brinzolamid gibi topikal CAİ'lerin başlıca avantajı oral ajanlara bağlı gelişen sistemik yan etkilerdeki belirgin azalmadır. Ancak bazı hastalarda ciddi yan etkileri görülebilir (93). Brinzolamid'in kimyasal yapısı Şekil 2.21'de gösterilmiştir (90).

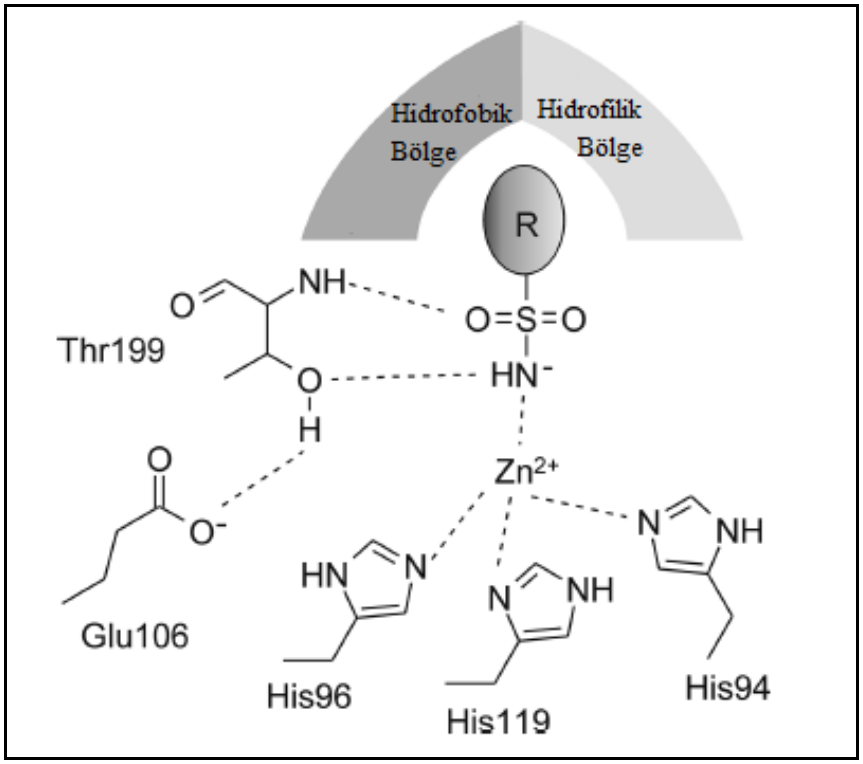


Şekil 2.21. Brinzolamid'in kimyasal yapısı (90)

2.3.2. Sülfonamidler

Antimikrobiyal kemoterapinin başladığı yıllar olan 1932'de Domagk tarafından farelerdeki streptokokal enfeksiyonların tedavisinde Prontosil'in etkili

olduğunun bildirilmesi üzerine geliştirilmeye başlanmış ve otuzlu yılların sonlarında sülfonilamid halkasının geliştirilmesi ile insanlarda kullanılmıştır (96). Mann ve Keilin, 1940 yılında sülfonamidin özgün ve potansiyel bir CAİ gibi davrandığını belirtmişlerdir (97). Sülfonamid grupları iki nedenden dolayı CA aktif bölgesi için ideal ligandlardır. Bir yandan pozitif yüklü çinko iyonu ile deprotonlanmış nitrojen iyonunun negatif yükünü kombin eder. Diğer yandan koordine nitrojen atomundaki bir proton, hidrojen ile sıkı bir bağ oluşturan hidrojen bağ akseptör karakterinde olan Thr199 ile uyumludur (Şekil 2.22) (10).



Şekil 2.22. hCA-II aktif bölgesi ve genel sülfonamid inhibitörü arasındaki anahtar etkileşimin şematik gösterimi (10)

Memelilerde tanımlanan 16 farklı α-CA ve CARP izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfonamidlere olan affiniteleri ve hücreiçi yerleşimleri Tablo 2.2'de verilmiştir (4).

Tablo 2.2. Yüksek omurgalı α-CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfonamidlere olan affiniteleri ve hücre içi yerleşimleri (4)

İzoenzim	Katalitik Aktivitesi (CO_2 Aktivitesi)	Sülfonamidlere Affinite	Hücre içi Yerleşimleri
CA I	Orta	Orta	Sitoplazma
CA II	Yüksek	Çok Yüksek	Sitoplazma
CA III	Çok Düşük	Çok Düşük	Sitoplazma
CA IV	Yüksek	Yüksek	Membran-Bağımlı
CA VA	Düşük-Orta[a]	Yüksek	Mitokondri
CA VB	Yüksek	Yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Yüksek	Tükrük bezi/süt sekrete
CA VII	Yüksek	Çok Yüksek	Sitoplazma
CARP VIII	Akatalitik	[b]	Sitoplazma
CA IX	Orta-Yüksek	Yüksek	Transmembran
CARP X	Akatalitik	[b]	Sekrete
CARP XI	Akatalitik	[b]	Sekrete
CA XII	Düşük	Çok Yüksek	Transmembran
CA XIII	Orta	Orta-Yüksek	Sitoplazma
CA XIV	Orta	Yüksek	Transmembran
CA XV	Düşük	Bilinmiyor	Membran-Bağımlı

[a] pH 7.4'te düşük, pH 8.2 veya daha yüksekte orta

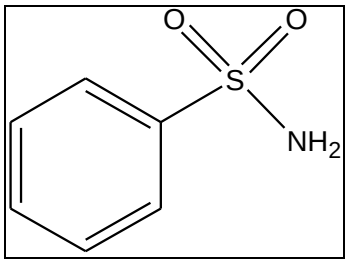
[b] Doğal CARP izozimleri Zn (II) içermez, bu sebeple sülfonamid inhibitörlerine ilgisi ölçülmemiştir. Bölgesel yönlendirilmiş mutagenez ile bu proteinlerin modifikasyonu mümkündür ve bunları sülfonamidler tarafından inhibe edilmesi mümkün CA-benzeri aktivite gösteren enzimlere dönüştürür ama şu anda bu konuda ayrıntılı çalışmalar mevcut değildir.

Klasik CAİ'ler primer sülfonamidlerdir (RSO_2NH_2) (57). Primer sülfonamidler sülfonil gruplarında iki adet hidrojen atomu, sekonder sülfonamidler ise bir adet hidrojen atomu bulundururlar. Bu hidrojenler kısmen asidiktirler çünkü konjuge bazda oluşan yük rezonansla stabilize edilebilir. Karboksilik asitlere göre daha az elektronegatif olan nitrojen atomundaki negatif yükün oluşumundan dolayı, sülfonamidler karboksilik asitlerden daha az asidiklerdir (98). Primer sülfonamidler, CA enzimlerinin kapsamlı özgül inhibitörleri iken sekonder sülfonamidler genellikle zayıf CAİ'lerdir (99). Sekonder veya üçüncül sülfonamidler yapısal engellerden dolayı çinkoya bağlanamaz. Bu sülfonamidlerin aktif bölgenin girişine yerleştiği düşünülmektedir (100).

Sülfonamidlerin günümüzde diüretik, antiglokom, antiepileptik ve yükseklik hastalığında tedavi ajanı olarak klinik kullanımı vardır (92).

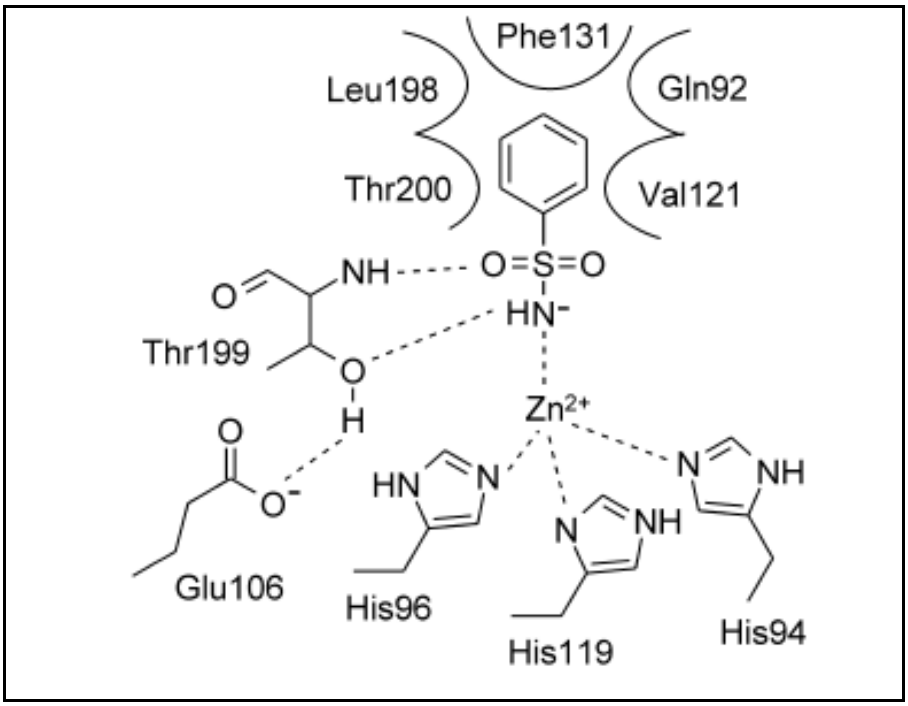
2.3.3. Benzensülfonamidler

CA inhibisyonu için bugüne kadar birçok aromatik sülfonamid sentezlendi ve araştırıldı. Bunların içinde en genel ve en iyi karakterize edilmiş olan inhibitörler aromatik hidrokarbonların türevleri olan benzensülfonamidlerdir (10,101). Şekil 2.23'te Benzensülfonamid'in kimyasal yapısı gösterilmiştir (90).



Şekil 2.23. Benzensülfonamid'in kimyasal yapısı (90).

Hemen hemen üzerinde çalışılan tüm yapılarda benzensülfonamid parçasının, aktif enzim bölgesi ile etkileşimi oldukça benzerdir. Bu etkileşimler, Zn^{+2} katalitik iyonların standart koordinatlarındaki sülfonamid ve fenil halkasını içermekte olup Val121, Gln92, Phe131, Leu198, and Thr200 rezidüleri ile birçok van der Waal etkileşimi sağlar (Şekil 2.24) (10).



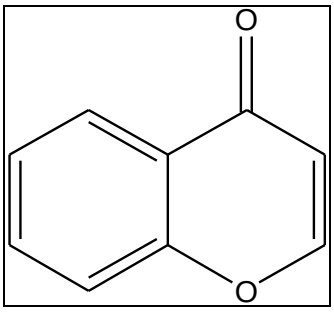
Şekil 2.24. Benzensülfonamid'in hCA-II aktif bölgesi ile bağlanmasının şematik gösterimi (10)

Subsitüte benzensülfonamidlerle, primer sülfonamidlere kıyasla kesin mekanizmalara sahip olan farklı CAİ'ler üretilebilir (100).

Çoğu benzensülfonamid olan bileşikler, hayvan modellerinde güçlü antitümör aktivite göstermesinin yanı sıra antiepileptik, antiobezite ve antiglokom aktivite gösterir ayrıca klinik olarak da kullanılırlar (102).

2.3.4. Kromonlar

Kromonlar, piran halkasına kondanse durumda benzen halkası içeren heterosiklik bileşikler olup bir kısmı ilaç olarak kullanılan bileşikleri içeren geniş bir ailedir. Bu bileşikler, piran halkasının 4. konumunda karbonil grubu içeren benzopiran türevleri olarak da anılabilir. Sistematik olarak 4*H*-1-benzopiran-4-on şeklinde adlandırılmaktadır (Şekil 2.25) (103).



Şekil 2.25. Kromonların kimyasal yapısı (103)

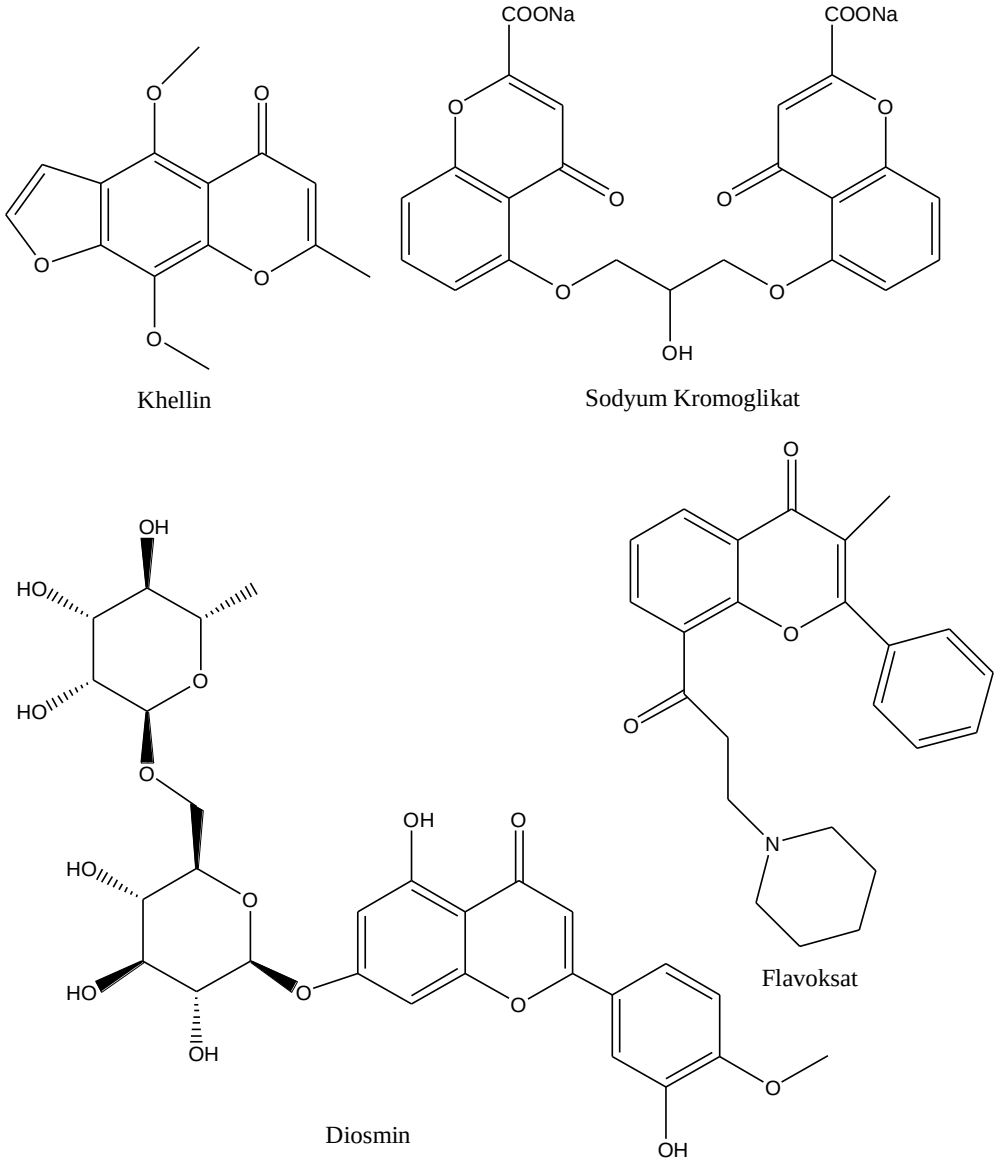
Kromonlar flavon, flavonol ve izoflavonlar gibi birçok flavonoidlerin çekirdek bölümüdür (104).

Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan flavonoidler, bitki sekonder metabolitlerinin en iyi temsilcisi olup, dikkat çekici biyolojik aktiviteler sergilerler. Son yıllarda binlerce flavonoid ilaç keşiflerinde araştırıldı ve antikanser ajanları olarak geliştirilmeleri ile ilgili çalışmalar yapıldı (105).

Kromon kelimesi Yunanca renk anlamına gelen "chroma"dan türemiştir. Bu kromon türevlerinin geniş renk aralığında olduğuna işaret etmektedir. Yapısal iskele olarak çeşitliliğinin, farklı farmakolojik aktivitelerin eldesi için değişiklik yapmanın mümkün oluşu yanında, birçok kromon türevi geniş aralıkta florensans özelik de gösterir. Özellikle, 3-hidroksiflavonlar DNA-bağlama affinite çalışmaları için hidrojen yapıştırma sensörleri, floresans probları, protein işaretleme ve apopotoz çalışmalarında ise floroforlar olarak kullanılmaktadır (104).

Çok sayıda kromon türevinin farmakolojik özelliklerinin bilinmesine rağmen, bugün tedavi edici ajanlar olarak az sayıda örnek kullanılmaktadır. Khellin (Şekil 2.26), Ammi visnage bitkisinin tohumlarından ekstrakte edilmiş, klinik uygulamada kullanılan ilk kromondur ve Akdeniz bölgesinde renal kolik tedavisi için uzun zamandan beri diüretik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, 1950'lerde, khellin, astım ve göğüs anjini'nin tedavisinde düz kas gevşeticisi olarak kullanılmıştır (103). Khellin önceden göğüs anjininin tedavisinde kullanılmakta iken şimdi vitiligonun tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer kromon türevlerinden, Sodyum kromoglikat (Şekil 2.26) alerjik rinit, astım ve alerjik konjuktivitte mast hücre sabitleyicisi, Diosmin (Şekil

2.26) venöz hastalıklar için tedavi edici ajan, Flavoksat (Şekil 2.26) ise üriner inkontinansının (idrar kaçırma) tedavisinde düz kas gevşetici olarak kullanılır (104).



Şekil 2.26. Farmakolojik ajanlar olarak kullanılan kromon temelli bileşiklere örnekler (104)

Kromon ve türevleri, biyolojik sistemlerdeki önemlerinden dolayı organik sentezde ilgi çekici hedefler olmaktadırlar (106). Kromonlar antialerjik, antimikrobiyal, antiviral, antitümör gibi biyolojik aktivitelerin çoğunu etkilemekte ve antioksidan aktivite göstermektedirler (107). Bazı kromon türevlerinin hipoglisemik etki gösterdiği kaydedilirken, santral sinir sistemini etkileyen kromonlar, analjezik ve

analeptik, otonom sinir sistemini etkileyenler ise, β-adrenerjik blokör ve spazmolitik aktivite gösterir. Kardiyavasküler sistem üzerine koroner dilatör, kapiller rezistansı arttırıcı ve kolesterol düzeyini düşürücü etki gösterirken gastrointestinal sistem üzerine antiülser ve antidiyareik etkisi vardır (108). Ayrıca, rekimyasal aktivitesi yüksek olan kromonlar, birçok enzimle etkileşebilir. Birçok kromon türevinin benzodiazepin reseptörlerine bağlanarak kinaz inhibitörü gibi davrandığı ve kistik fibrozun tedavisinde etkili ajanlar gibi olduğu da raporlanmıştır (104).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan saf CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri ticari olarak Sigma Co.ltd/Milano/İtalya'dan temin edilmiştir.

Çalışmalarımızda kullanılan, fenol-red, sodyum hidroksit, trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum klorür, sodyum sülfat, HEPES, sodyum sülfat Merck A.G'den; karbondioksit gazı piyasadan temin edilmiştir.

Çalışmalarımızda kontrol grubu olarak Asetazolamid kullanılmıştır. Asetazolamid ticari olarak Sigma'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Çalışmada İnhibitör Etkisi İncelenen Bileşikler

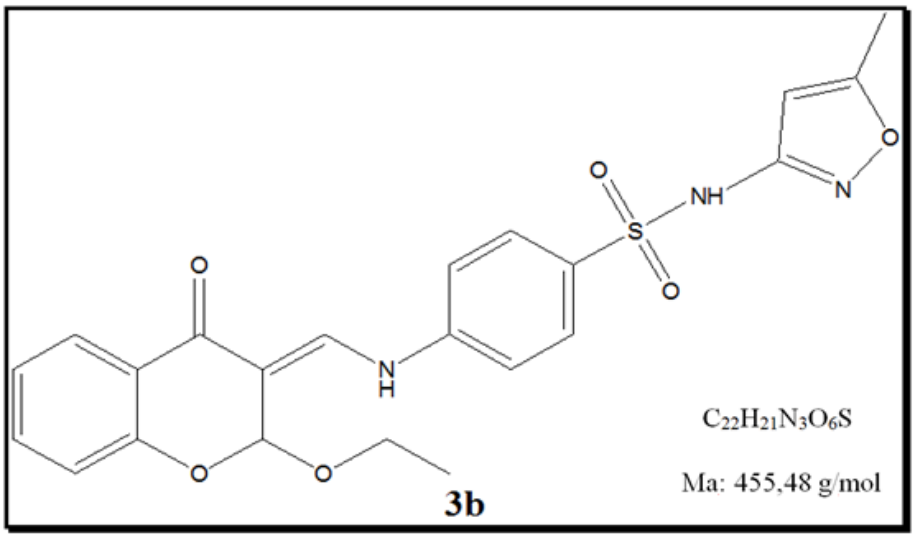
Çalışmada, yeni sentezlenmiş Kromon Temelli Sülfonamid (KTS) türevi olan on iki adet bileşiğin inhibisyon etkisi incelenmiştir. Bu orijinal bileşikler, Mısır Kahire Üniversitesi Farmasötik Kimya Bölümü'nden Dr. Fadi Awadallah'tan temin edilmiştir. Bileşikler kromon yapısı içeren primer ve sekonder benzensülfonamidlerdir. Tablo 3.1'de bileşiklerin sülfonamid yapıları yer almaktadır.

Tablo 3.1. Çalışmada inhibisyon etkisi incelenen bileşikler ve sülfonamid yapıları

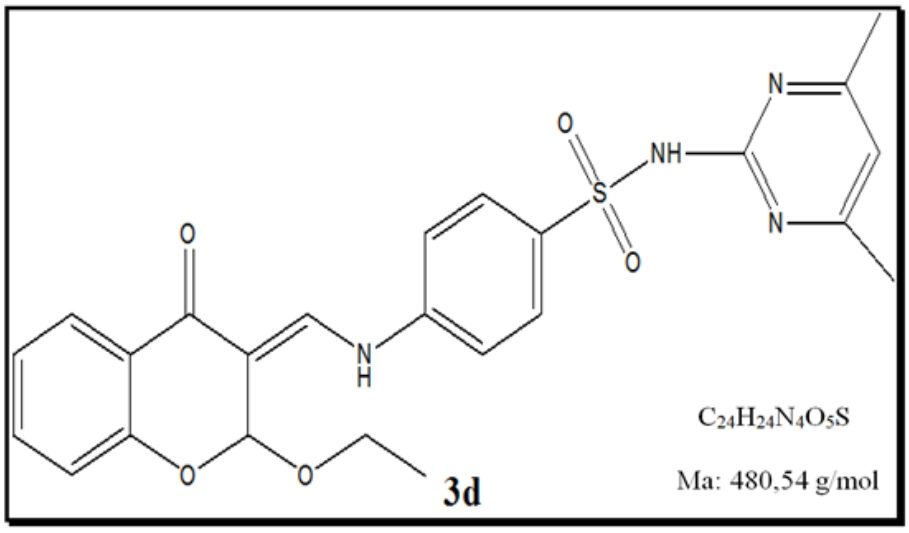
Ad	Bileşik	Yapı
3b	4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-*N*-(5-metil-izoksazol-3-il)-benzensülfonamid	sekonder
3d	*N*-(4,6-Dimetil-pirimidin-2-il)-4-[(2-etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-benzensülfonamid	sekonder
3e	4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-*N*-tiazol-2-il-benzensülfonamid	sekonder
3f	4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidinmetil)-amino]-*N*-piridin-2-il-benzensülfonamid	sekonder
4a	4-[(4-Okso-4*H*-kromen-3-ilmetil)-amino]-benzensülfonamid	primer
4b	*N*-(5-Metil-izoksazol-3-il)-4-[(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetil)-amino]-benzensülfonamid	sekonder
7a	4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-benzensülfonamid	primer
7c	4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-*N*-pirimidin-2-il-benzensülfonamid	sekonder
7f	4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-*N*-piridin-2-il-benzensülfonamid	sekonder
10a	4-[5-Okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-2-fenil-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid	primer
10b	*N*-(5-Metil-izoksazol-3-il)-4-(5-okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-2-fenil-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid	sekonder
11a	4-[2-(4-Kloro-fenil)-5-okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid	primer

Çalışmada İnhibisyon Etkisi İncelenen Bileşiklerin Kimyasal Yapıları

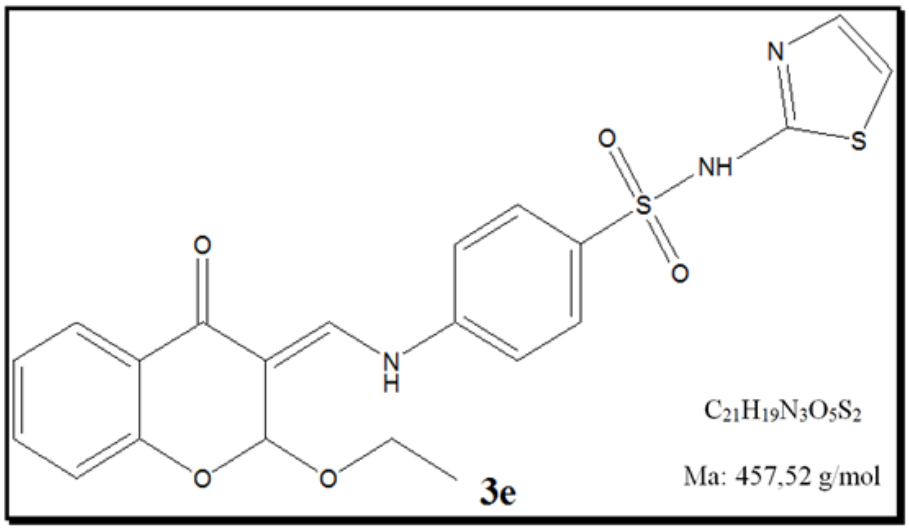
4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-*N*-(5-metil-izoksazol-3-il)-benzensülfonamid (3b)



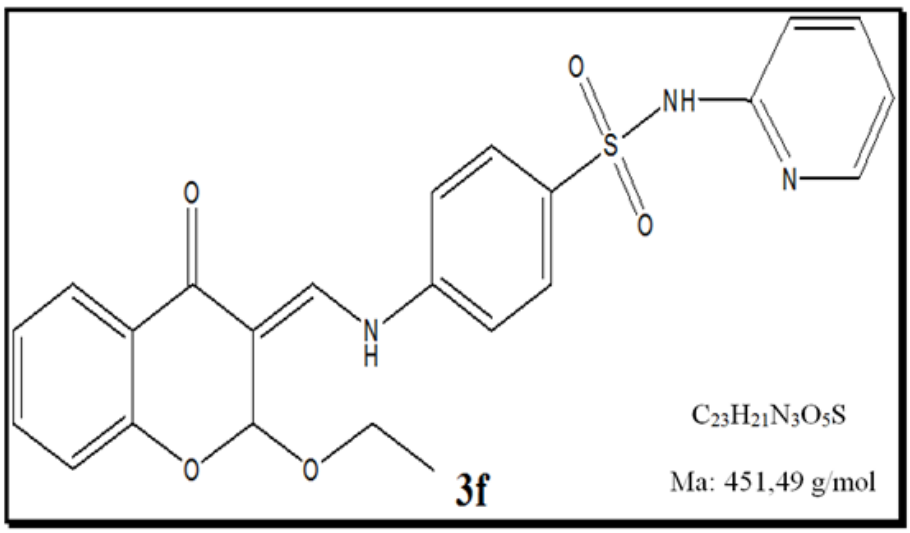
N-(4,6-Dimetil-pirimidin-2-il)-4-[(2-etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-benzensülfonamid (3d)



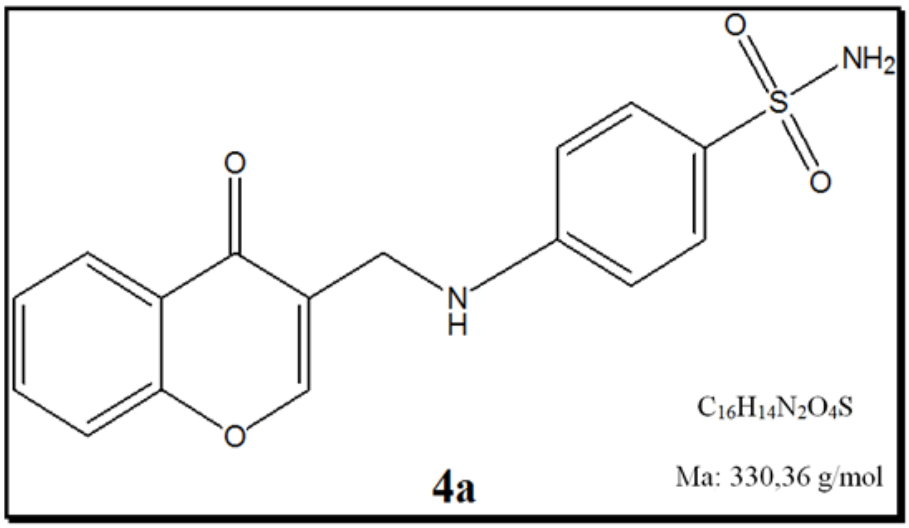
4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidenmetil)-amino]-*N*-tiazol-2-il-benzensülfonamid (3e)



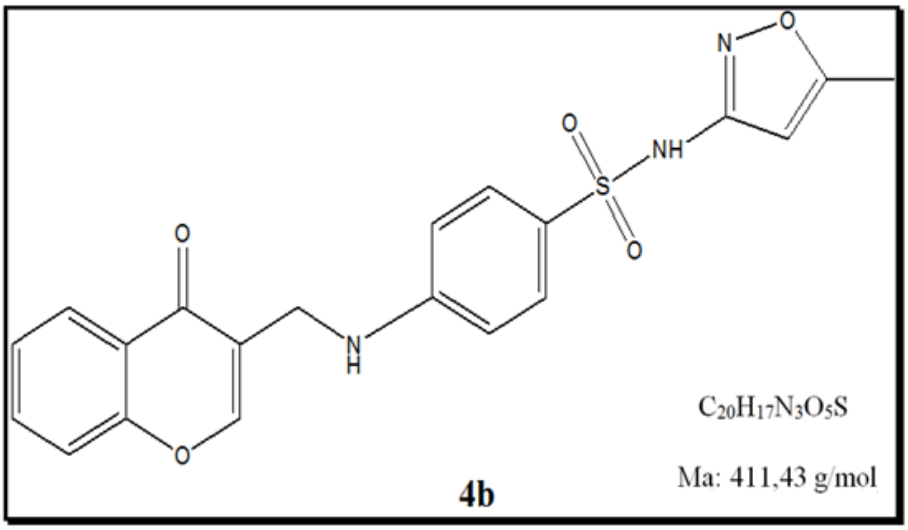
4-[(2-Etoksi-4-okso-kroman-3-ilidinmetil)-amino]-*N*-piridin-2-il-benzensülfonamid (3f)



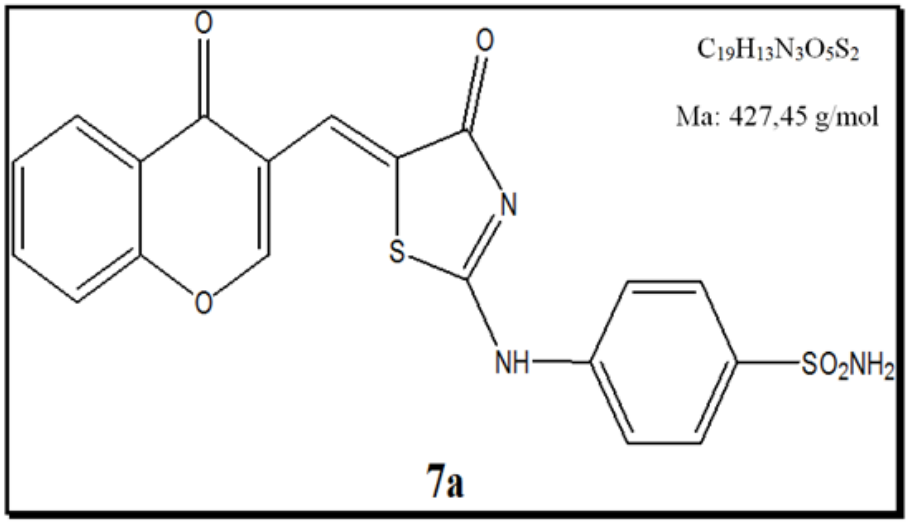
4-[(4-Okso-4*H*-kromen-3-ilmetil)-amino]-benzensülfonamid (4a)



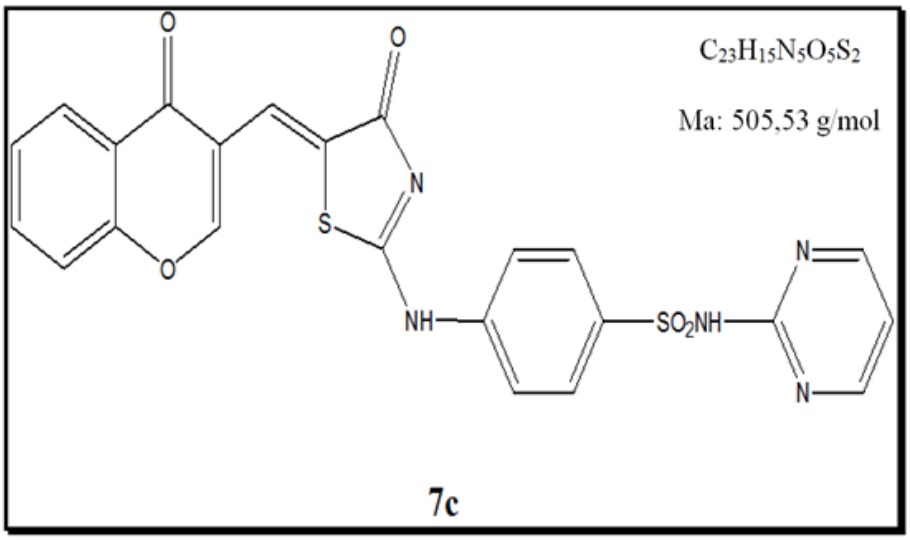
N-(5-Metil-izoksazol-3-il)-4-[(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetil)-amino]-benzensülfonamid (4b)



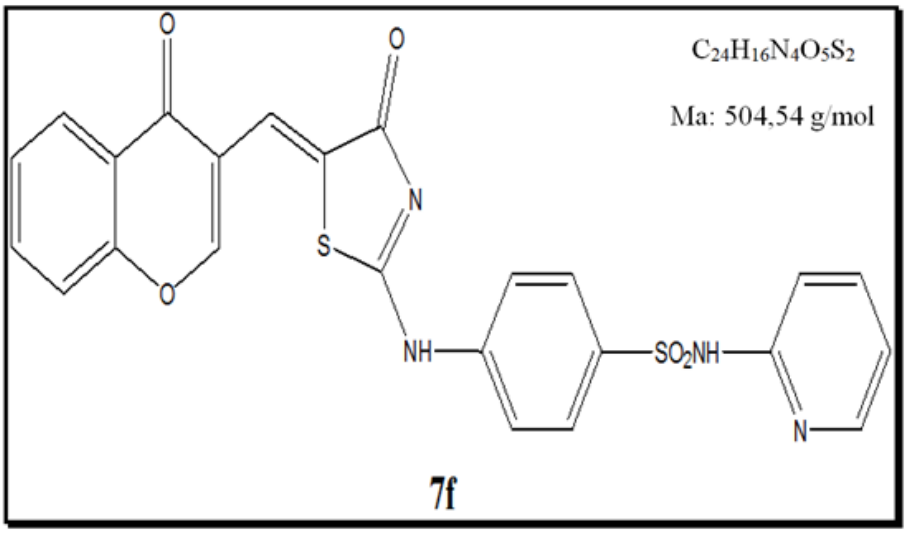
4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-benzensülfonamid (7a)



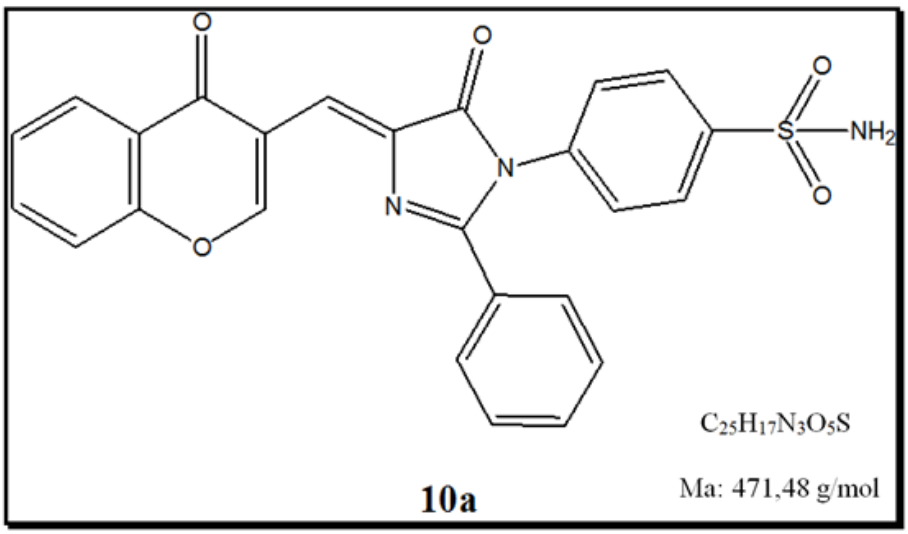
4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-*N*-pirimidin-2-il-benzensülfonamid (7c)



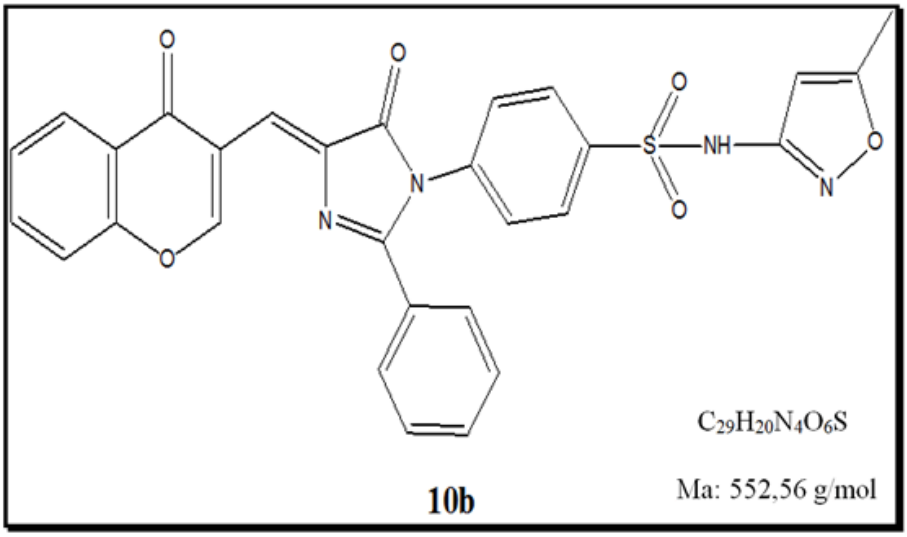
4-[4-Okso-5-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-tiazol-2-ilamino]-*N*-piridin-2-il-benzensülfonamid (7f)



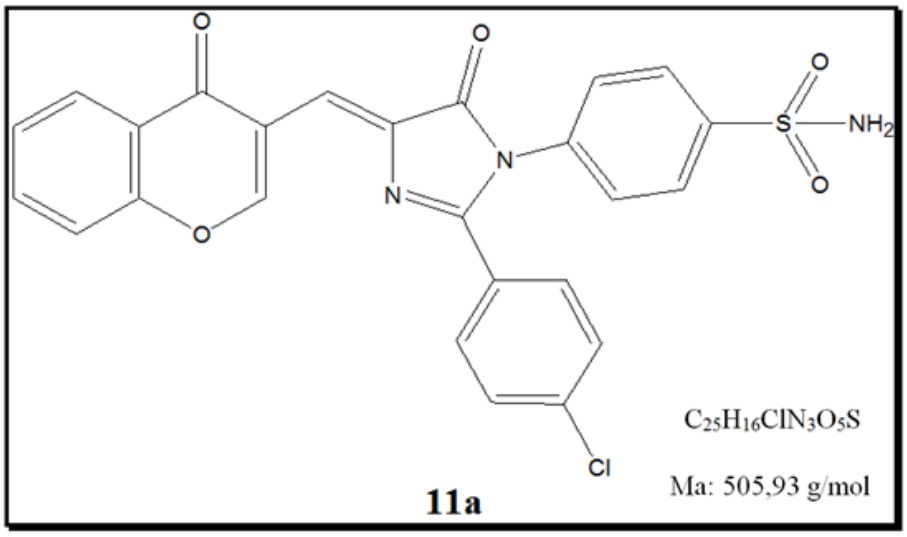
4-[5-Okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-2-fenil-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid (10a)



N-(5-Metil-izoksazol-3-il)-4-(5-okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-2-fenil-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid (10b)



4-[2-(4-Kloro-fenil)-5-okso-4-(4-okso-4*H*-kromen-3-ilmetilen)-4,5-dihidro-imidazol-1-il]-benzensülfonamid (11a)



3.1.3. Çalışmada Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Bu tez çalışması esnasında, aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buzdolabı (+4) : Hitachi
pH-metre : Orion- model 920A
Hassas terazi : Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Kronometre : Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Otomatik pipetler : Eppendorf, Medisis,Gilson
Magnetik karıştırıcı : ARE magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Üç yollu puar : Isolab
Çalkalayıcı : Biolab 1575-2B shaker
Vorteks : Fisons Whirli Mixer
Stopped-flow Kinetik Alet : SX.18MV-R Applied Photophysics

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

CA-CO_2 Hidrataz Enzim Aktivitesi için Kullanılan Tamponlar:

Stopped-flow metodu için CO_2 çözeltisi; 20°C'de bidestile su içinden CO_2 geçirilerek hazırlanır.

Stopped-flow tampon çözeltisi; 0.01 M HEPES 4-(hidroksil etil)-1-Piperazinetansulfhonik asit 0.01 M Tris[hidroksimetil]aminometan hidroklorür (Trizma Hidroklorür), 0.1 M Na_2SO_4 pH 7.5'te hazırlanmıştır.

Stopped-flow fenol-red çözeltisi; 0.2 mM fenol red alınarak (pH 6.8-8.4) HEPES tamponu içerisine katılmıştır.

Stopped-flow stok CA enzim çözeltileri; Ticari CA-I için 2,5 x 10^{-5} M, CA-II için 10^{-5} M, CA-IX için 3,3 x 10^{-5} M ve CA-XII için 1,9 x 10^{-5} M olarak kullanılmıştır.

Stopped-flow stok bileşik çözeltileri; Stok bileşik çözeltiler primer sülfonamidler için 10^{-6}-10^{-9}, sekonder sülfonamidler için ise 10^{-5}-10^{-8} M arasında hazırlanır.

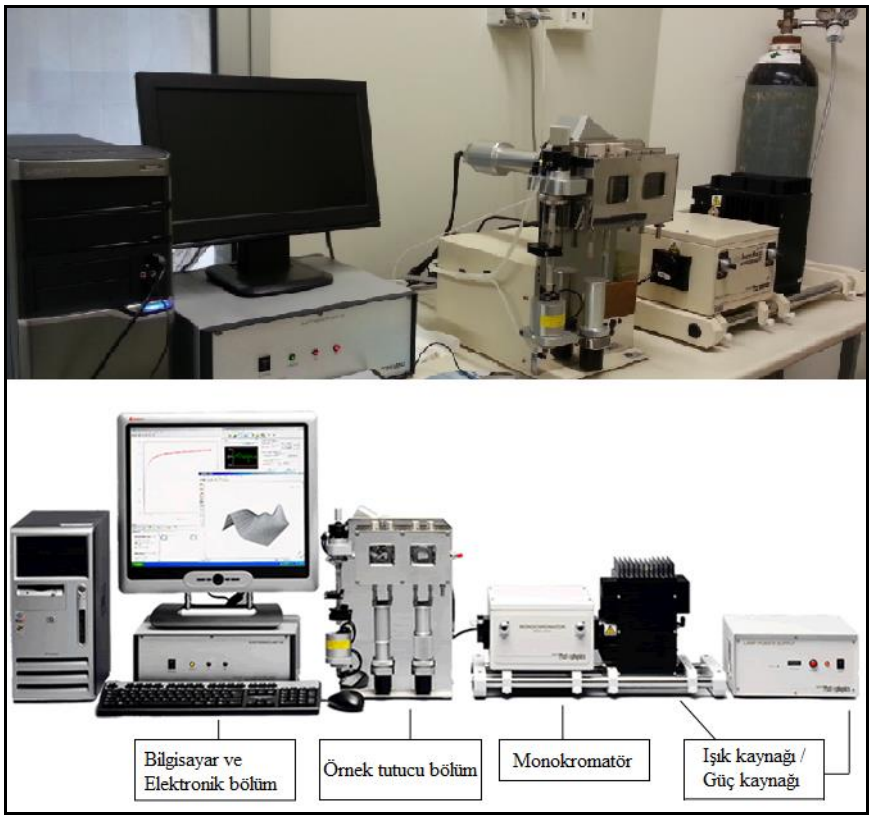
Stopped-flow bileşik testi kontrol grubu; Kontrol grubu olarak kullanılan Asetazolamid 10^{-5} ve 10^{-8} M konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Aktivitesinin Tayini

3.2.1.1. CO_2-Hidrataz Aktivitesi Tayini (Stopped-flow Kinetik Aleti ile)

Çalışmamızda SX.18MV-R Applied Photophysics Stopped-flow aleti CA-CO_2 hidratasyon aktivitesi için kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Stopped-flow Kinetik Aleti (109).

Stopped-Flow Kinetik Aletinin Bölümleri:

Işık Kaynağı: Geniş dalgaboyu aralığında yoğun emisyon sağlayan kaynak, floresans ölçümleri için yeterince uygundur.

Monokromatör: Floresans ölçümleri için eksitasyon dalgaboyu gibi ışık dalga boylarını veya absorbans ölçümleri için ilgilenilen aralığı seçmek içindir.

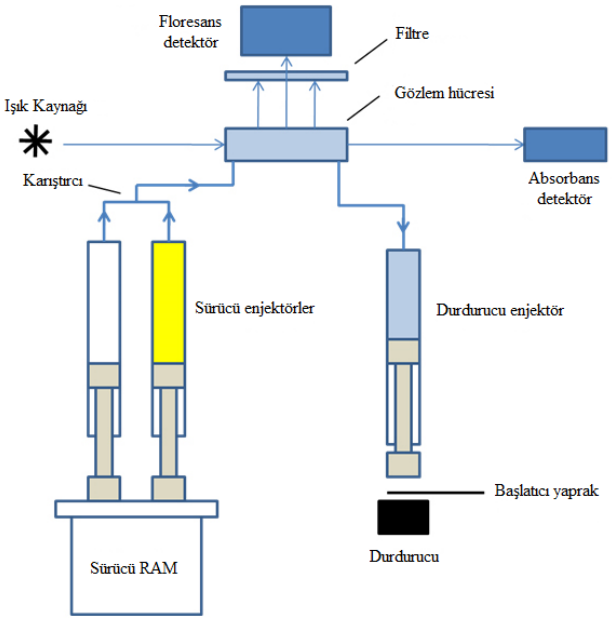
Örnek tutucu bölüm: Bu bölüm, gözlem hücresinde reaktifleri hızlıca karıştırmak ve data edinimi ile akışın durdurulmasını koordineli çalıştırmak içindir.

Belirleme sistemi: Absorbans, floresans/ışık saçılması değişikliklerini kaydetmek için çoğunlukla bir veya daha fazla foto çoğaltıcı detektörden yararlanılır. Fotodiyot dizi dedektörleri bazen zamana bağlı spektrumların (multi- dalgaboyu kinetik verilerin) kazanılmasını sağlamak için kullanılmaktadır.

Bilgisayar ve kontrol/gösterge/analiz yazılımı: Genelde, alet yazılım kontrolü altındadır.

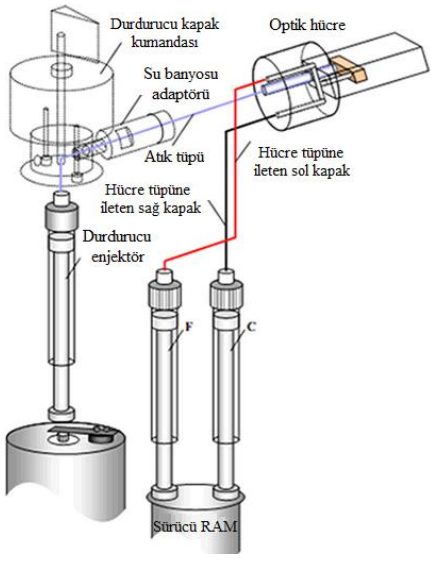
Sıcaklık kontrollü su sirkülatörü: Reaktif sıcaklığını ve gözlem hücresindeki sıcaklığı düzenler (109).

Klasik spektrofotometrik teknikler saniye altında hızla gerçekleşen reaksiyonları araştırmak için kullanılamazlar. Reaktantlar manuel olarak eklenirse, birkaç saniye içinde karışır, kimyasal tepkime meydana gelir ve herhangi bir spektrum değişikliği elde edilmez. Bu sorun ancak Stopped-flow ile birlikte aşılabilir (110). Stopped-flow spektroskopi milisaniye-saniye aralığında çözeltilerde oluşan kinetik değişimleri ölçmek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Basit olarak, iki çözelti hızlıca karışır ve gözlem hücresinde akım durur. Numune hücresi ışıklandırılır ve iletilen ya da yayılan ışık, zamanın bir fonksiyonu olarak detektör ile ölçülür (Şekil 3.2) (109).



Şekil 3.2. Stopped-flow kinetik aletinin çalışma anındaki şematik gösterimi (109)

Şekil 3.3'de Stopped-flow kinetik aletinde örnek tutucu bölümde basit bir karışım şematize edilmiştir. Şekle göre, C ve F adı verilen sürücü enjektörler reaktifleri içermektedir. Sürücü RAM enjektör pistonları iter ve reaktifler akım tüpü aracılığıyla karıştırıcıya, oradan da gözlem hücresine itilirler. Bu süreç hücredeki 'eski' içeriği de durdurucu enjektöre doğru iter. Piston, başlatıcı-düğmeye vurana kadar akış durdurucu enjektörü doldurur; bu hareket aynı anda akımı durdurur ve data edinimine başlar (111).



Şekil 3.3. Stopped-flow kinetik aletinde örnek tutucu bölüm (111)

Stopped-flow kinetik aleti, yüksek düzeyde otomasyon, iyi performans özellikleri, yüksek hassasiyet, kısa zaman ve yüksek hacimde çalışma olanağı gibi geniş yelpazede aranılan özelliklere sahiptir (112).

Bu teknik herhangi bir uygulamaya özgün değildir. Bu zaman ölçeğinde meydana gelen spektral değişimleri ölçmeyi gerektiren başka çalışmalarda da kullanılabilir (113). Stopped-flow spektroskopisi genellikle reaksiyon mekanizmaları, ilaç-bağlama süreçleri, protein yapısının belirlenmesi gibi biyomoleküler araştırmalarda kullanılır. Ayrıca, protein-protein, protein-ligand ve protein-nükleik asit etkileşimlerini içeren biyolojik türler arasında etkileşimlerin kinetiğini ölçmede geniş ölçüde kullanılr. Bu sistem, son on yıldır enzim kinetiği çalışmalarında kullanılmaktadır ve çoğu enzim ailesinin araştırmalarında yoğun katkı sağlamaktadır (114).

3.3. KTS Türevi Olan Bileşiklerin I_{50} Değerlerinin Saptanması

Yeni sentezlenmiş on iki adet KTS bileşiğinin I_{50} değerlerini bulmak için, 1.7-17 mM aralığında CO_2 konsantrasyonu ile çalışıldı. Önce bileşik madde olmadan enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı.

Değişik bileşik konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar Stopped- flow aletinde 557 nm'de HEPES tamponuna karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanarak, her yeni sentezlenmiş KTS bileşiği için I_{50} değerleri hesaplandı (88).

3.4. KTS Türevi Olan Bileşiklerin Sitozolik CA-I, CA-II ve Tümör İlişkili CA-IX, CA-XII İzoenzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

Sitozolik CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA-IX, CA-XII izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde KTS bileşiklerinin inhibisyon etkileri; enzim üzerine uygulamak suretiyle araştırıldı. Bunun için CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII

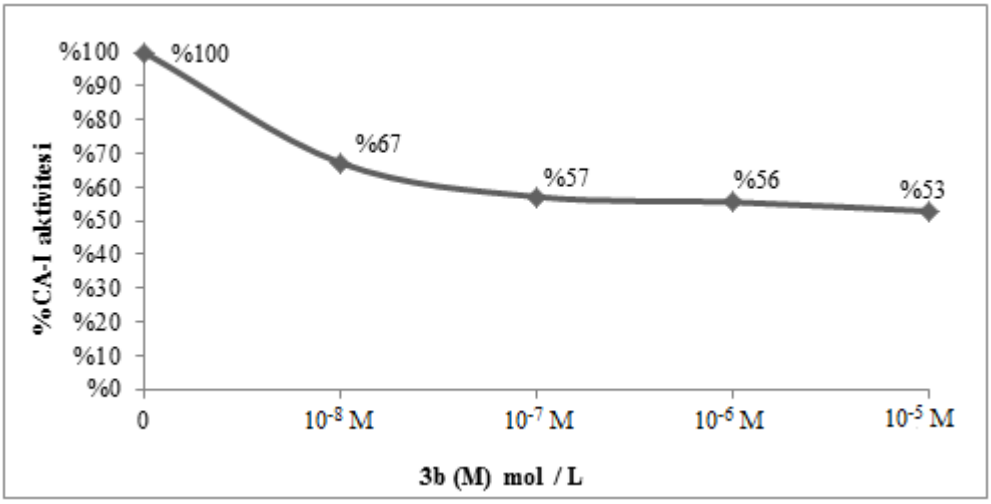
izoenzimleri için dört farklı uygun bileşik konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. Söz konusu bileşiklerin % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek, I_{50} değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (88). Hesaplanan I_{50} değerlerinden K_i değerlerine çevrilmiştir.

4. BULGULAR

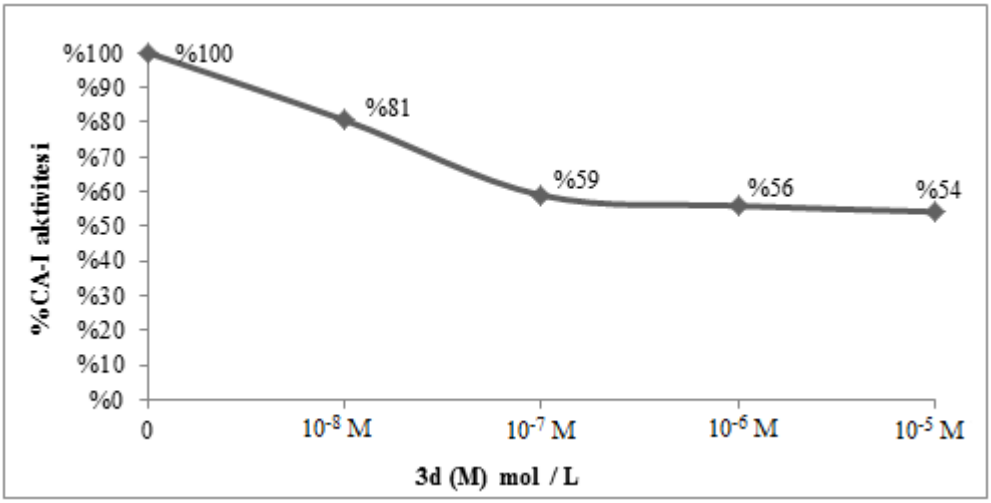
4.1. KTS Türevi Olan Bileşiklerin Sitozolik CA-I, CA-II ve Tümör İlişkili CA-IX, CA-XII İzoenzimlerinin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi

Sitozolik CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA-IX, CA-XII izoenzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde yeni sentezlenmiş on iki adet KTS türevi olan bileşiğin inhibisyon etkisi Stopped-flow aleti ile araştırıldı. Bu araştırmada, CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri için dört farklı uygun bileşik konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen sonuçlar, Şekil 4.1 - 4.56 arasında verilmiştir. Bileşiklerin % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek I_{50} değerleri hesaplandı. (Tablo 4.1 - 4.4)

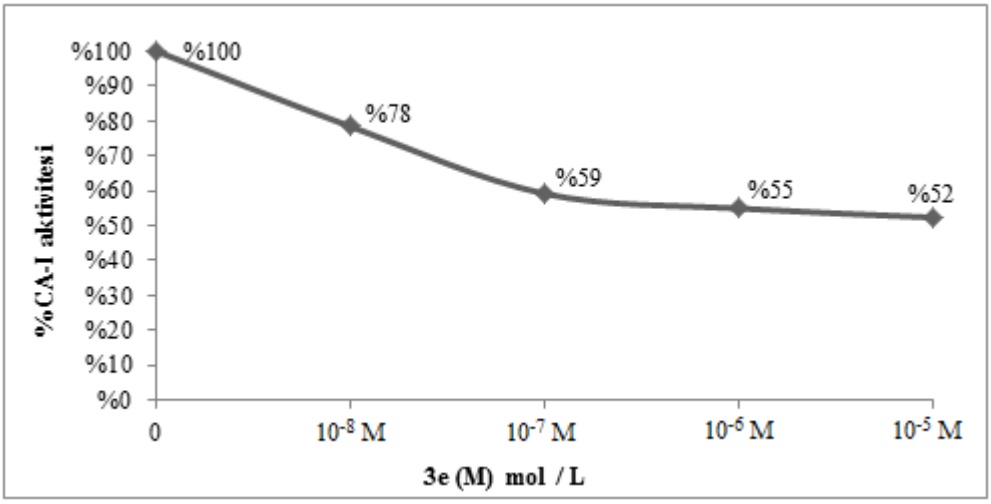
4.1.1. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-I İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi



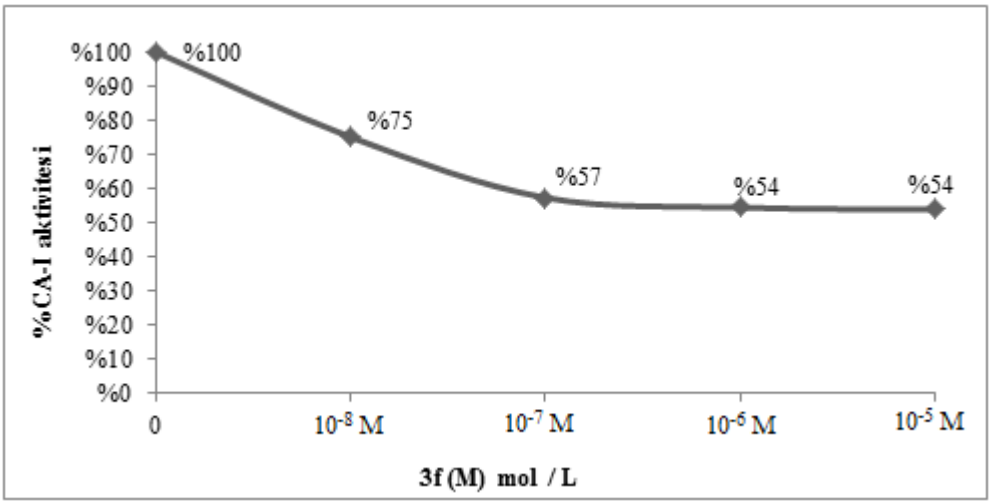
Şekil 4.1. 3b bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



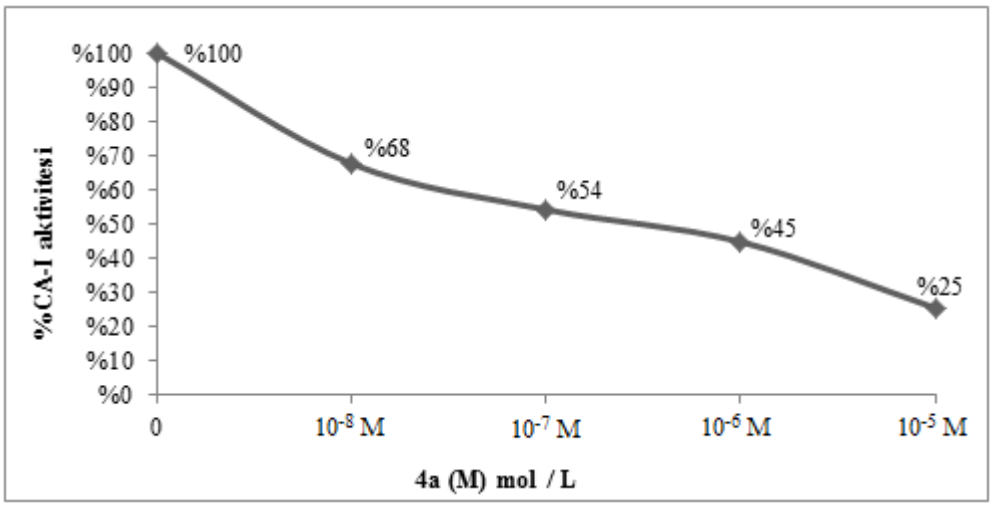
Şekil 4.2. 3d bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



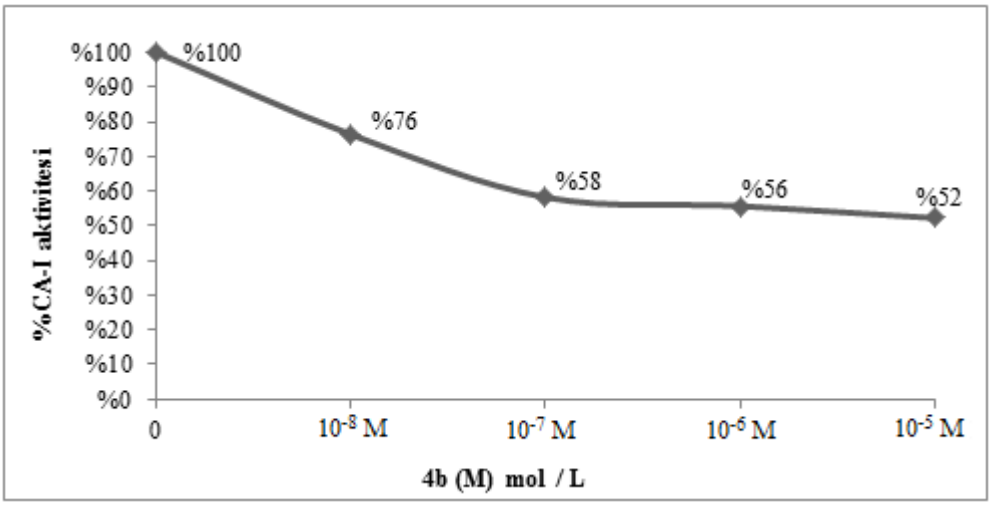
Şekil 4.3. 3e bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



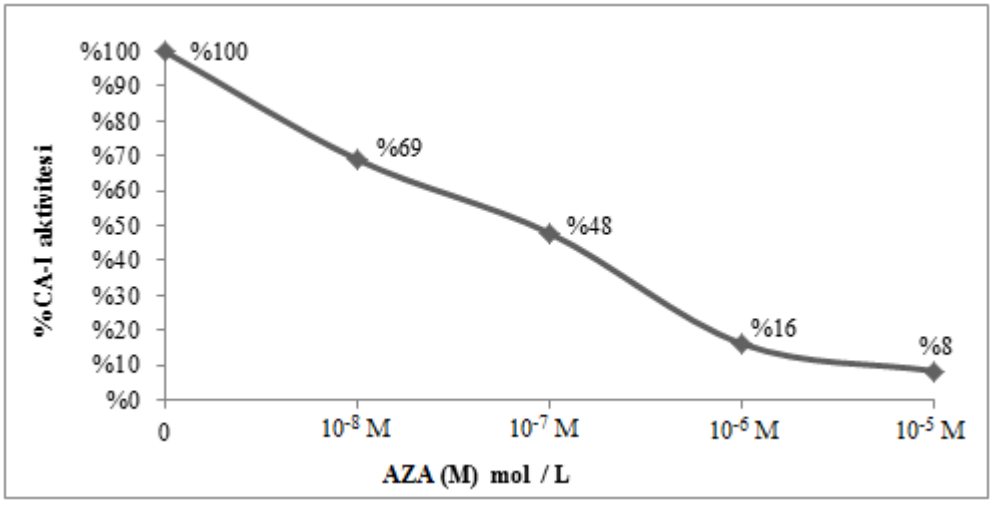
Şekil 4.4. 3f bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



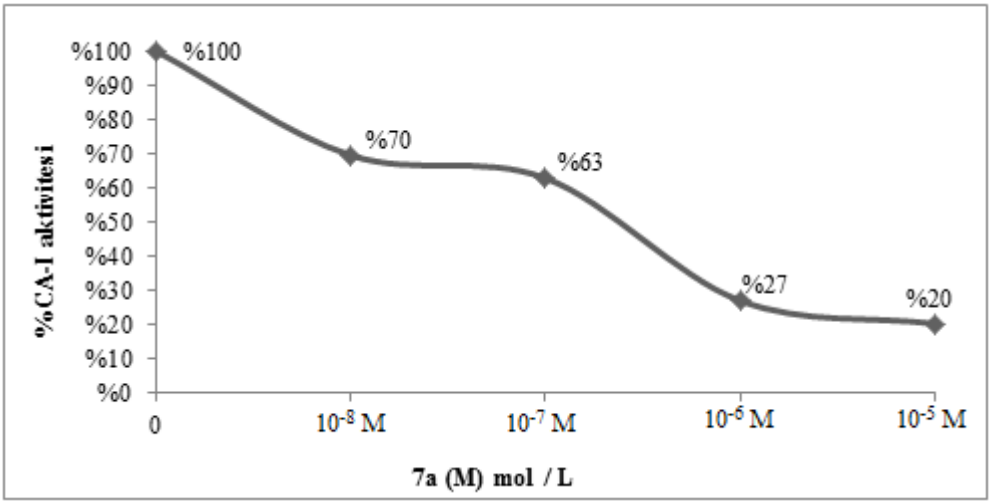
Şekil 4.5. 4a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



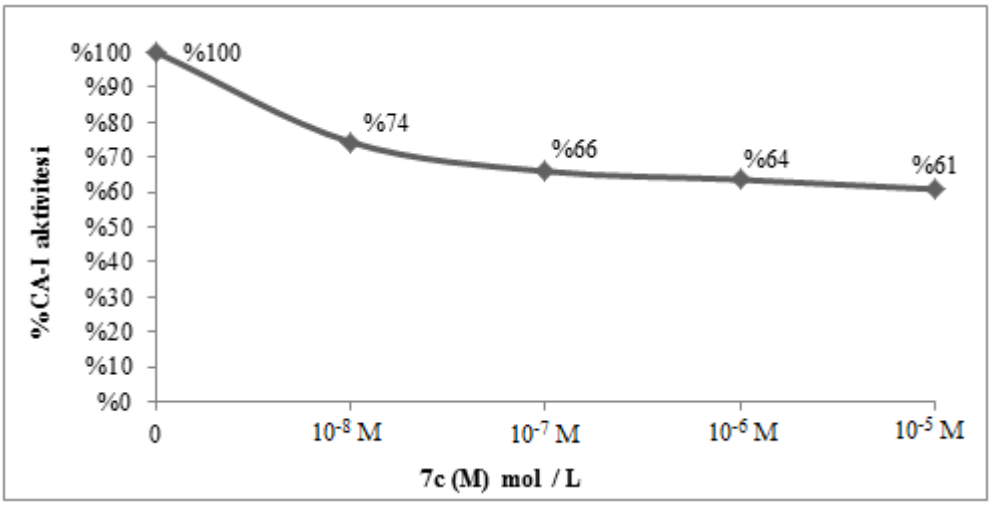
Şekil 4.6. 4b bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



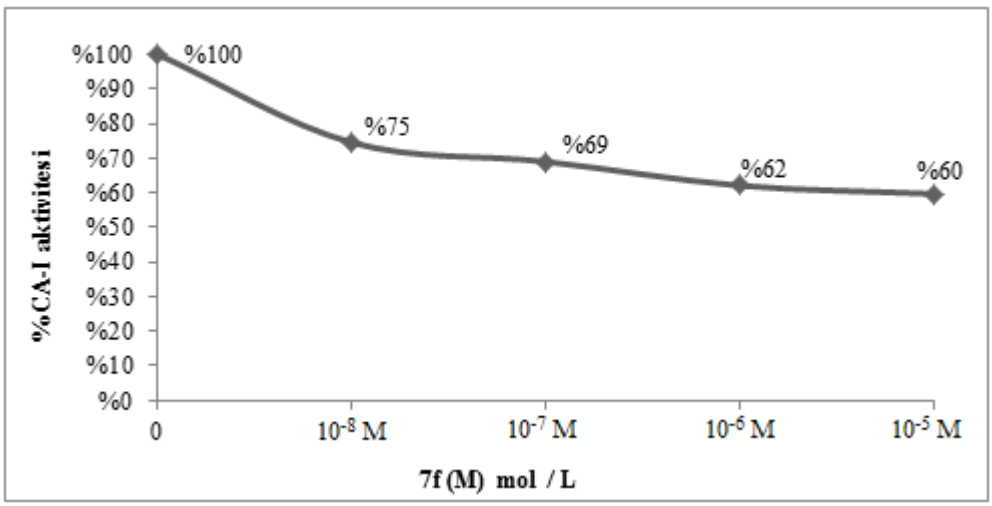
Şekil 4.7. AZA inhibitörünün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I)



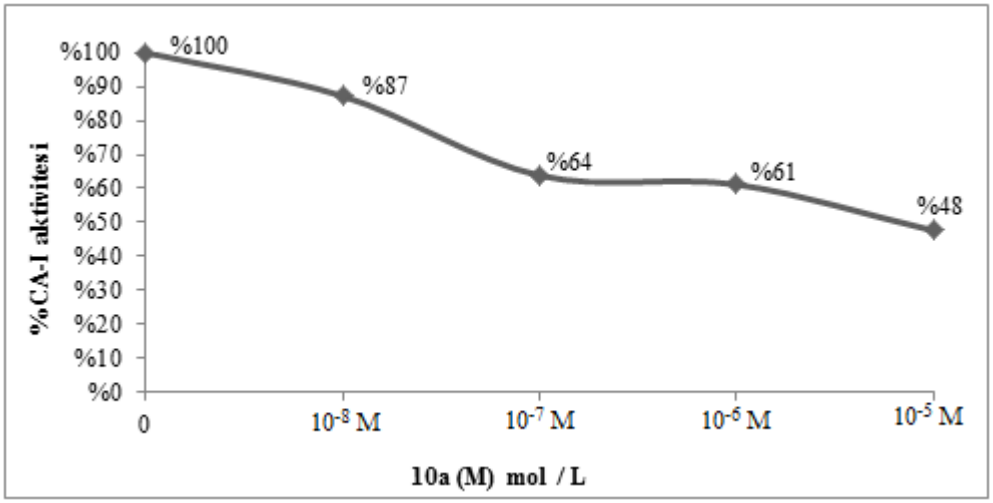
Şekil 4.8. 7a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



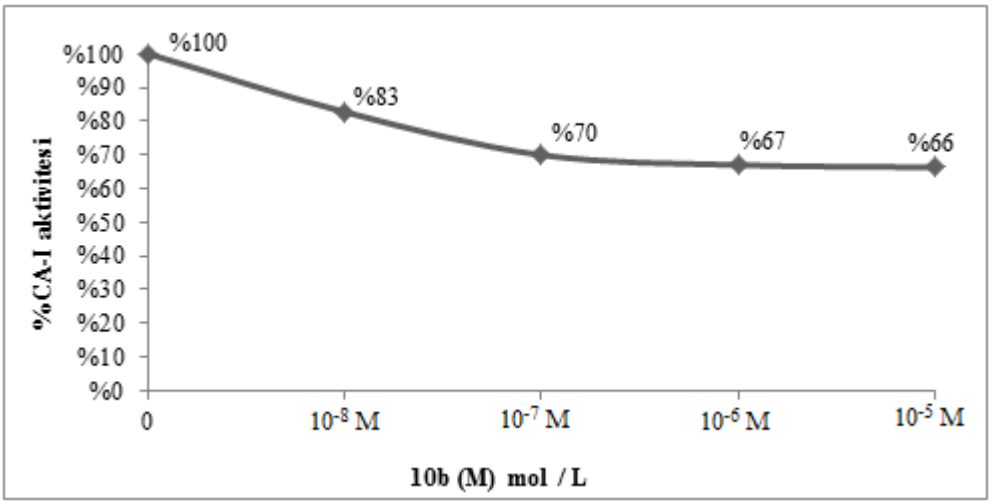
Şekil 4.9. 7c bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



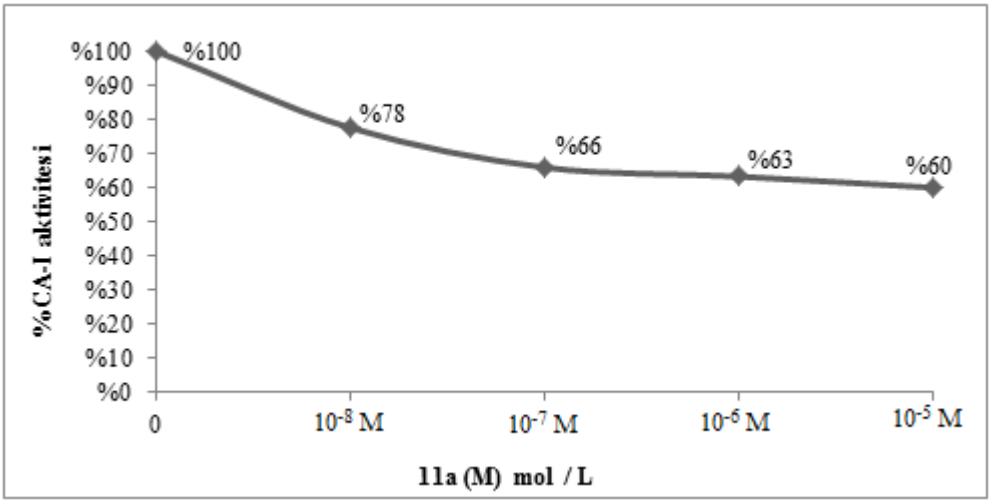
Şekil 4.10. 7f bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



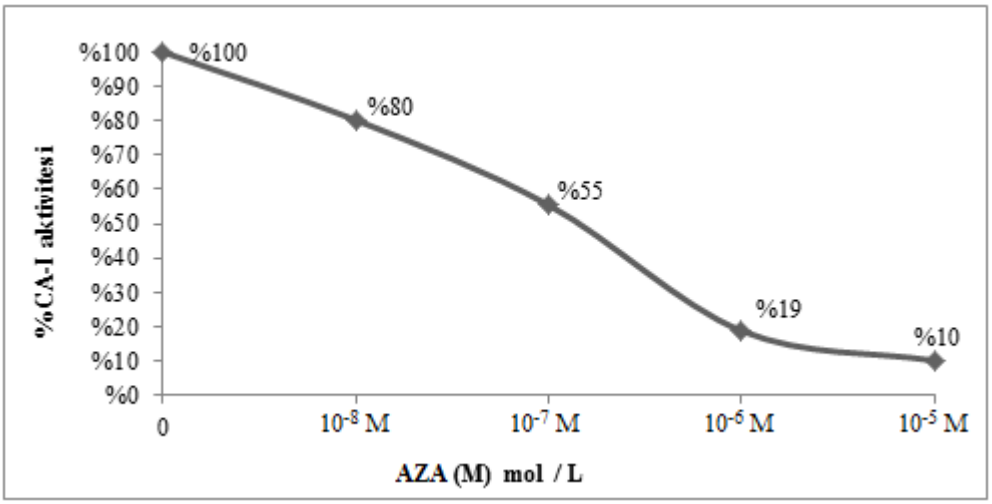
Şekil 4.11. 10a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.12. 10b bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.13. 11a bileşiğinin CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



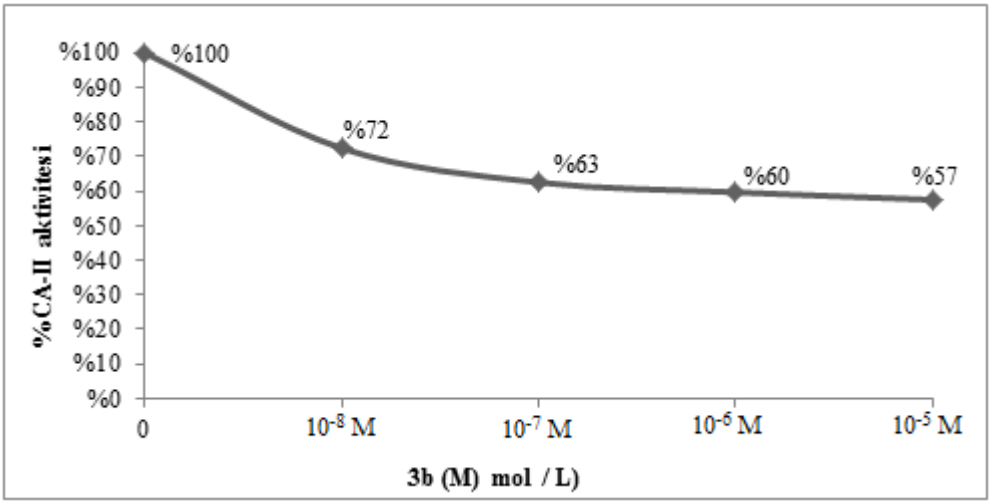
Şekil 4.14. AZA inhibitörünün CA-I (10^{-6} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II)

CA-I izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi incelenen bileşiklerin I_{50} değerlerinin özeti Tablo 4.1'de verilmiştir.

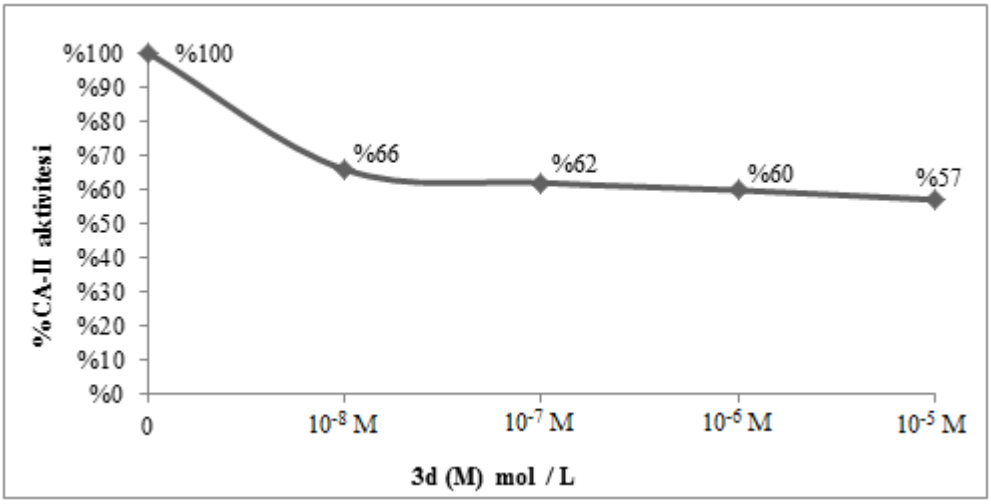
Tablo 4.1. KTS türevi olan bileşiklerin CA-I izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri

Bileşikler	I_{50} Değerleri
3b	>10
3d	>10
3e	>10
3f	>10
4a	0.505
4b	>10
AZA-I	0.091
7a	0.423
7c	>10
7f	>10
10a	8.430
10b	>10
11a	>10
AZA-II	0.233

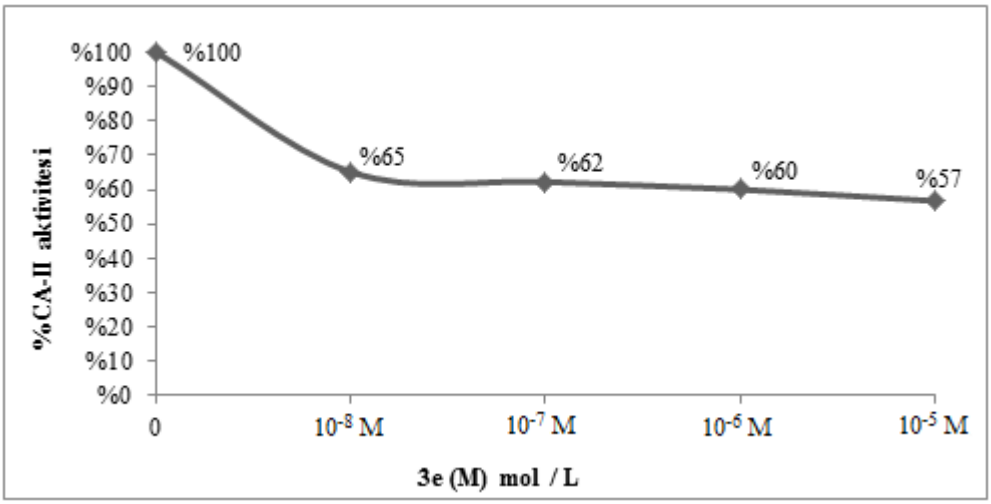
4.1.2. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-II İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi



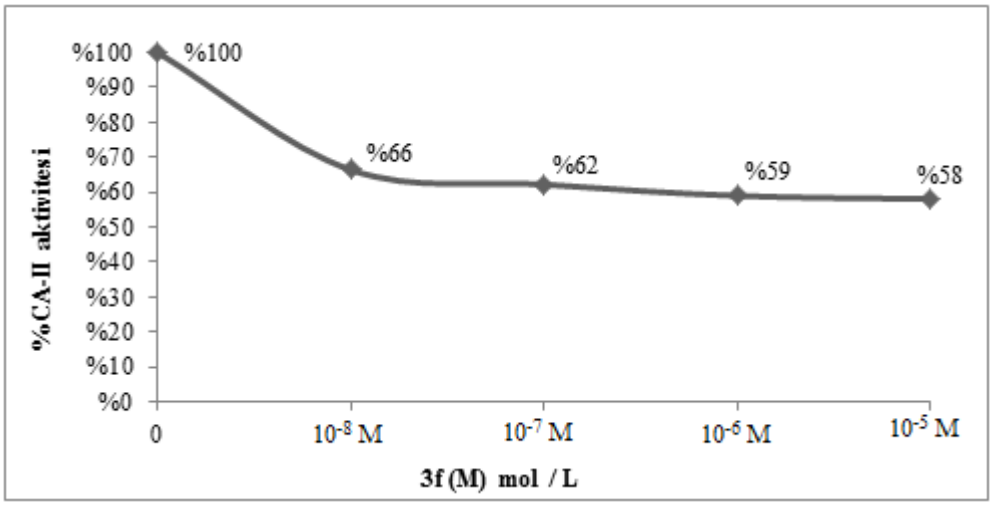
Şekil 4.15. 3b bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



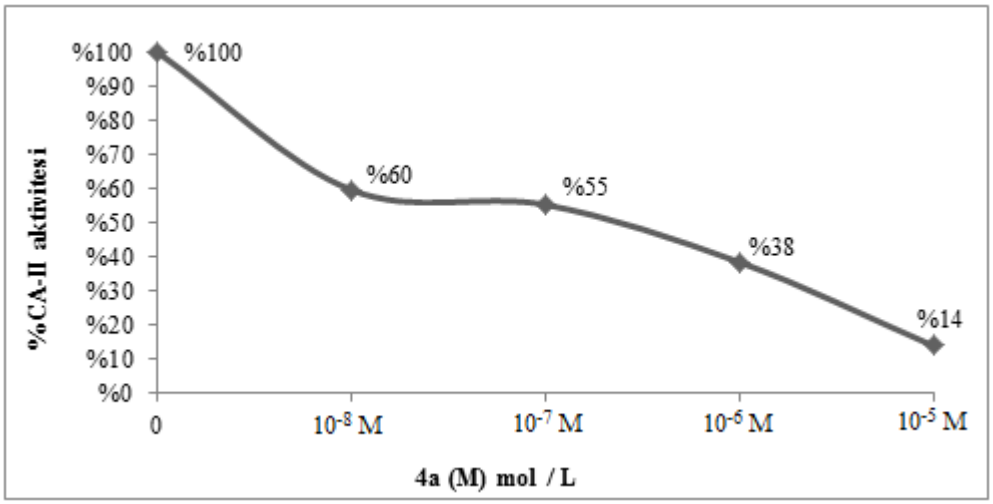
Şekil 4.16. 3d bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



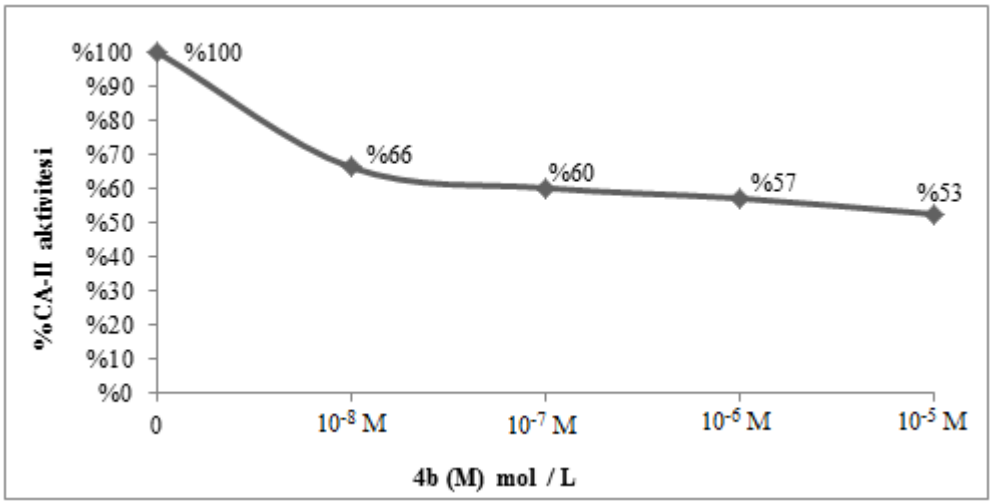
Şekil 4.17. 3e bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



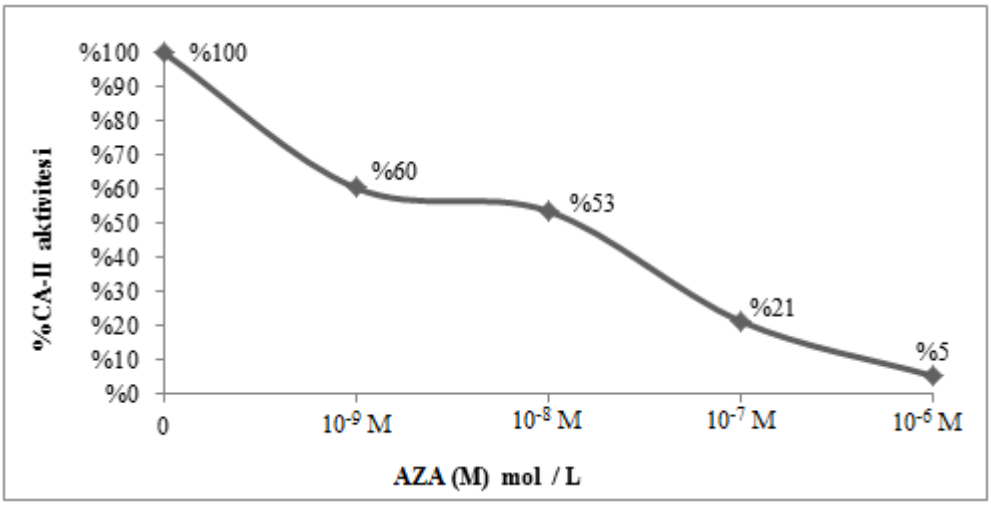
Şekil 4.18. 3f bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



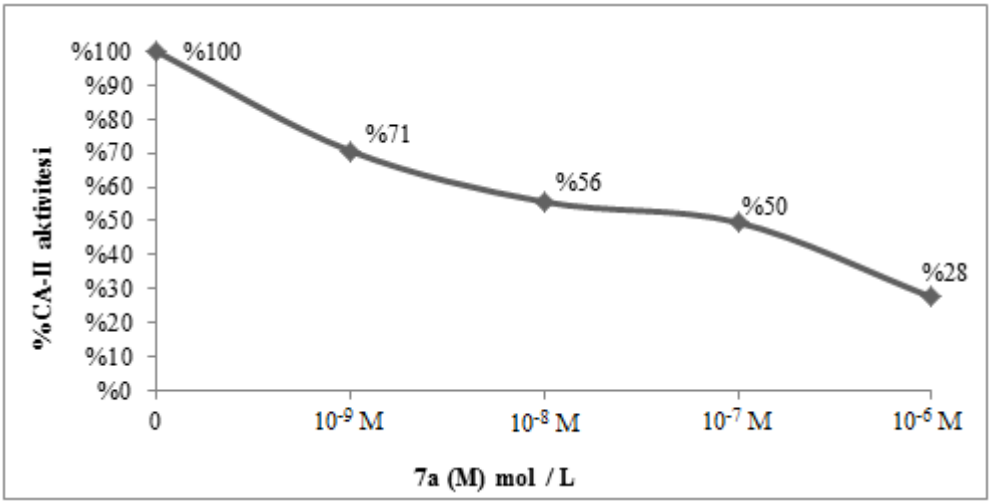
Şekil 4.19. 4a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



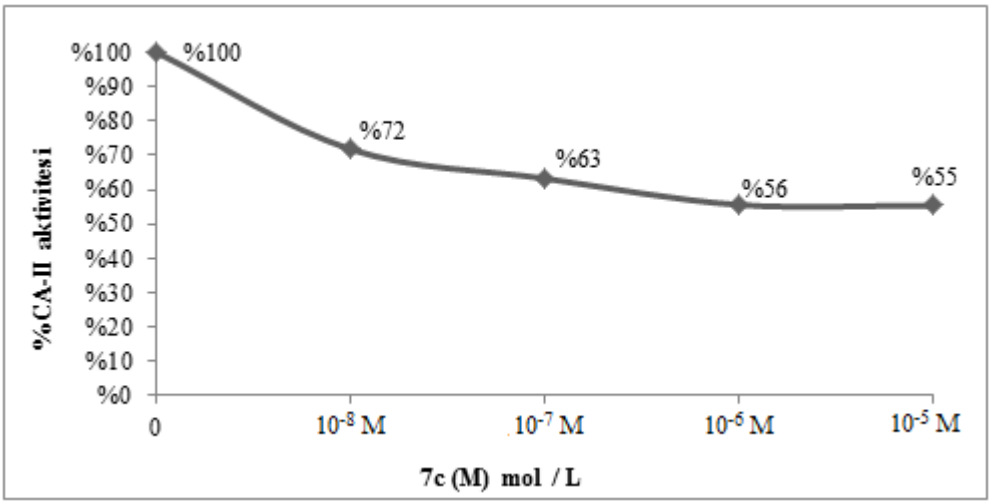
Şekil 4.20. 4b bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



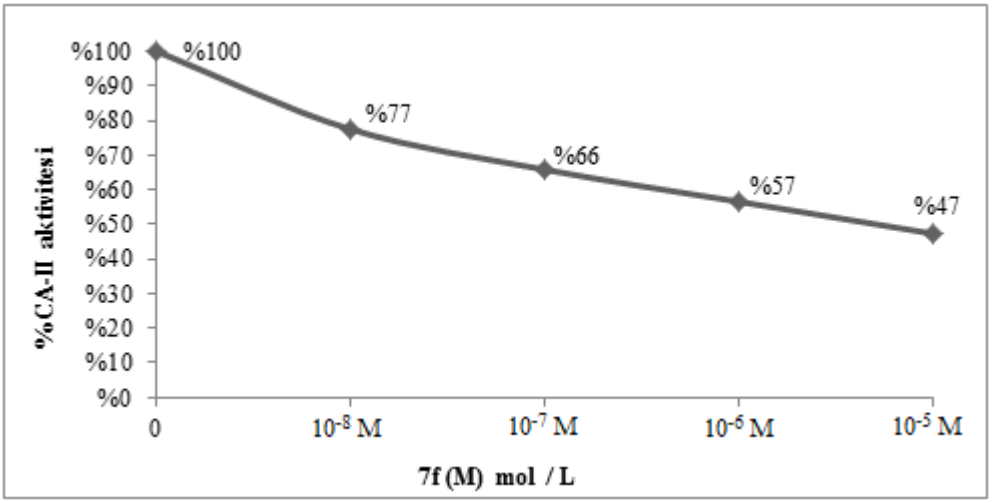
Şekil 4.21. AZA inhibitörünün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I)



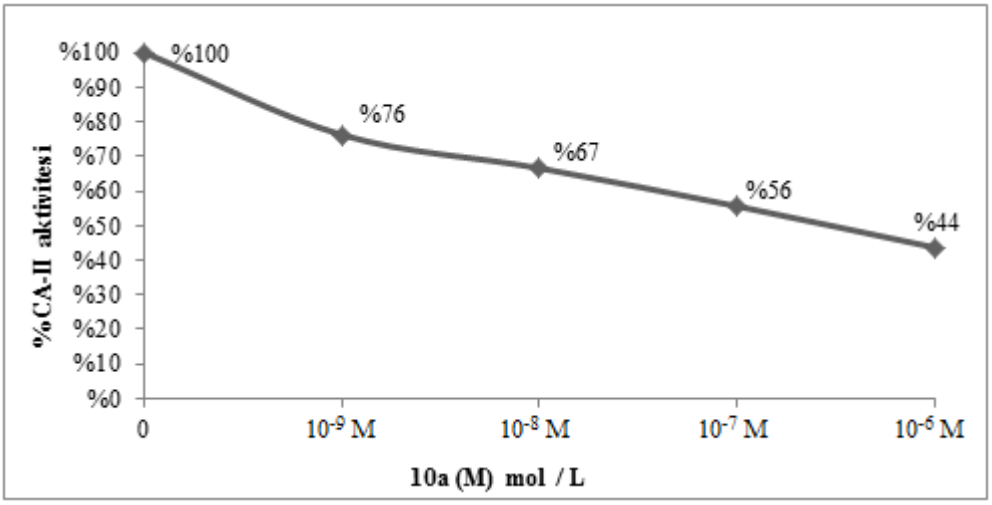
Şekil 4.22. 7a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



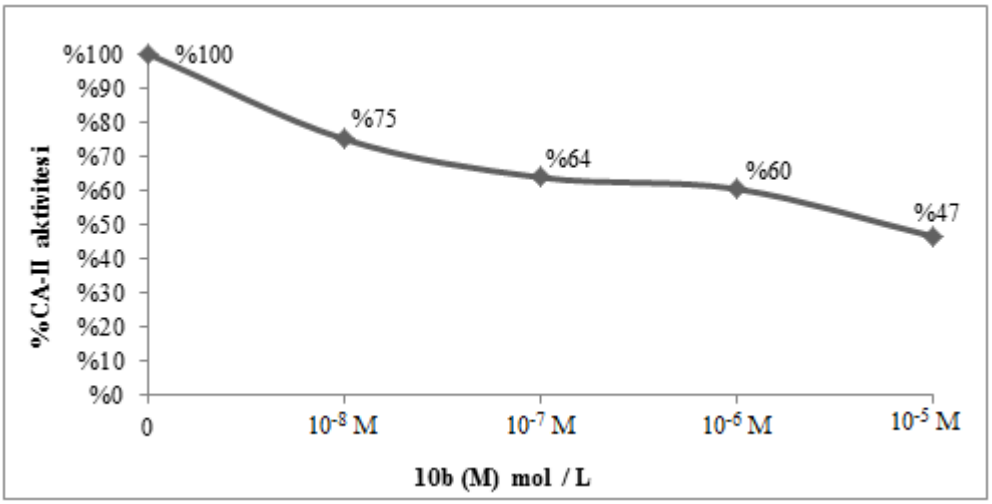
Şekil 4.23. 7c bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



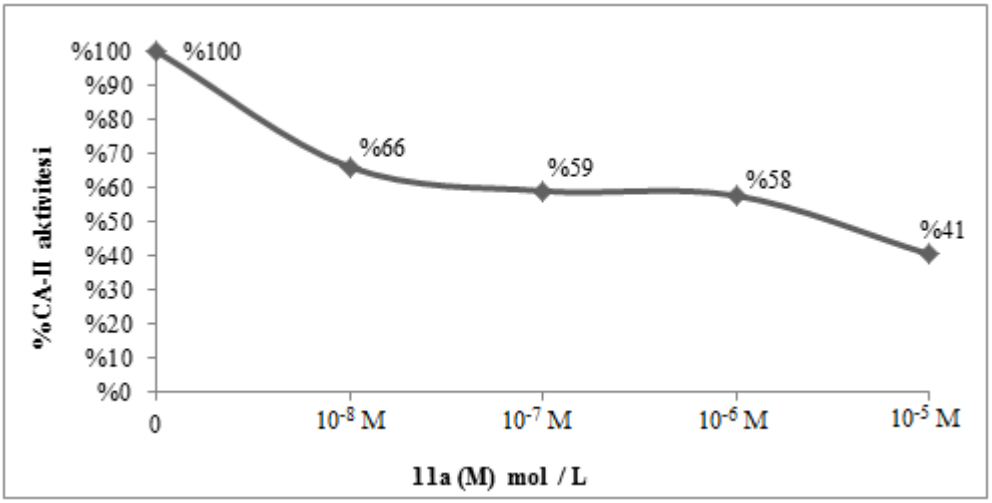
Şekil 4.24. 7f bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



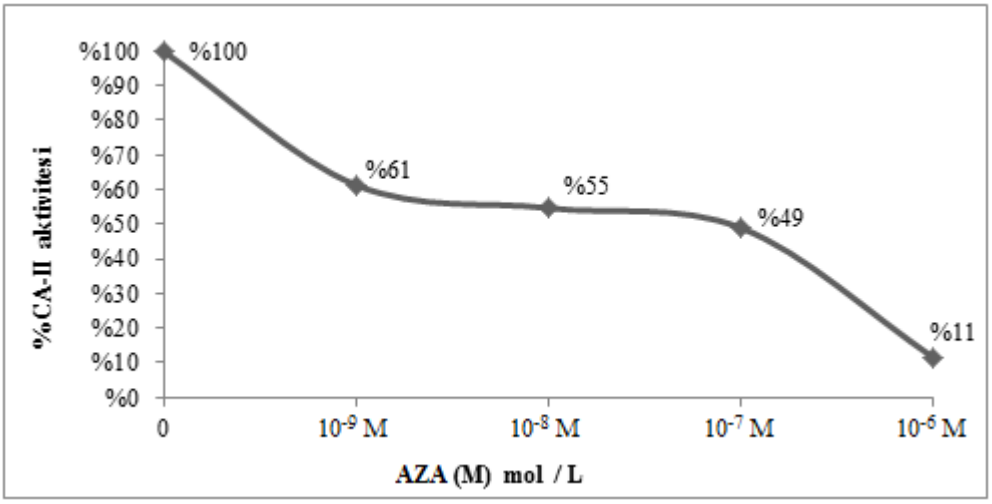
Şekil 4.25. 10a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.26. 10b bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.27. 11a bileşiğinin CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



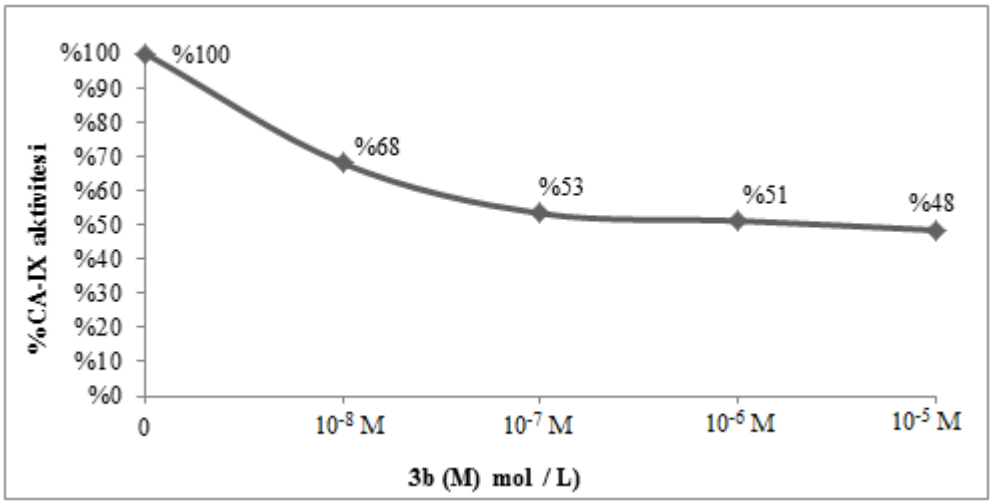
Şekil 4.28. AZA inhibitörünün CA-II (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II)

CA-II izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi incelenen bileşiklerin I_{50} değerlerinin özeti Tablo 4.2'de verilmiştir.

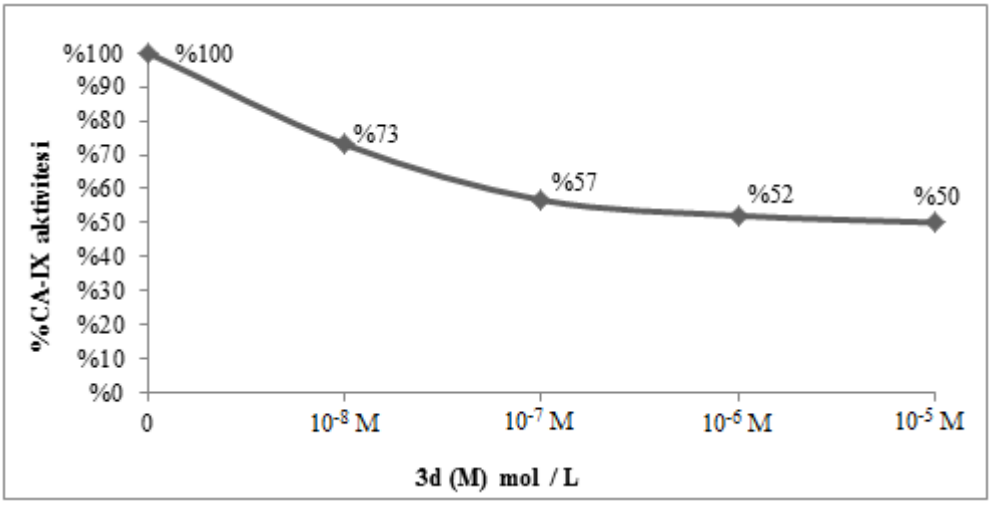
Tablo 4.2. KTS türevi olan bileşiklerin CA-II izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri

Bileşikler	**I_{50} Değerleri**
3b	>10
3d	>10
3e	>10
3f	>10
4a	0.382
4b	>10
AZA-I	0.019
7a	0.093
7c	>10
7f	7.425
10a	0.525
10b	7.756
11a	5.036
AZA-II	0.083

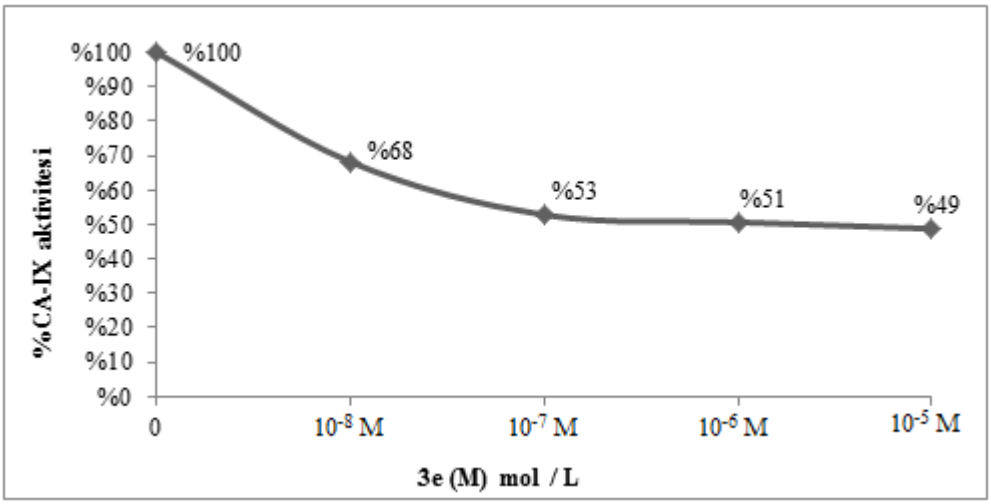
4.1.3. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-IX İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi



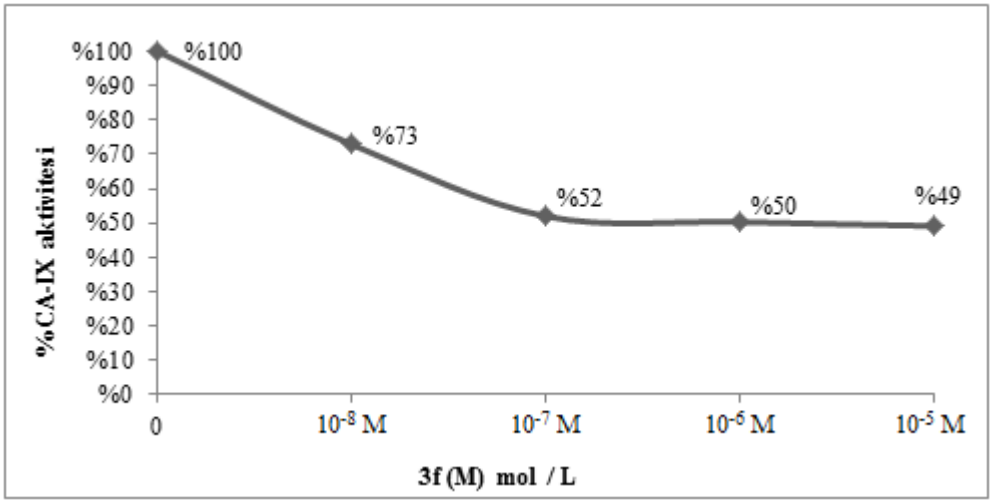
Şekil 4.29. 3b bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



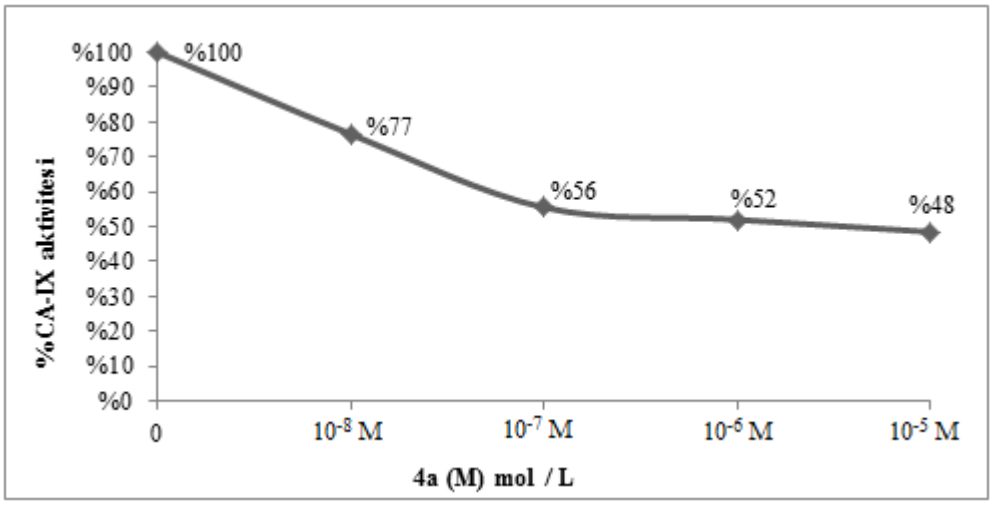
Şekil 4.30. 3d bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



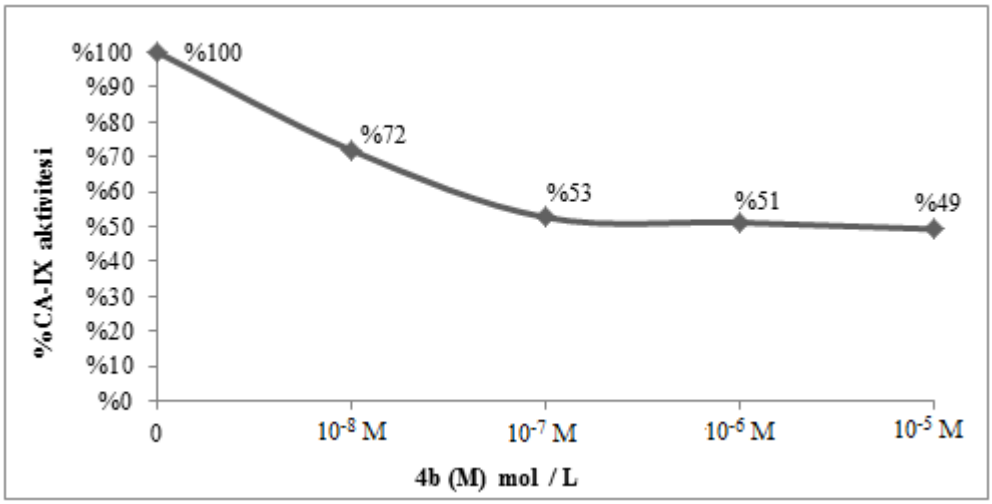
Şekil 4.31. 3e bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



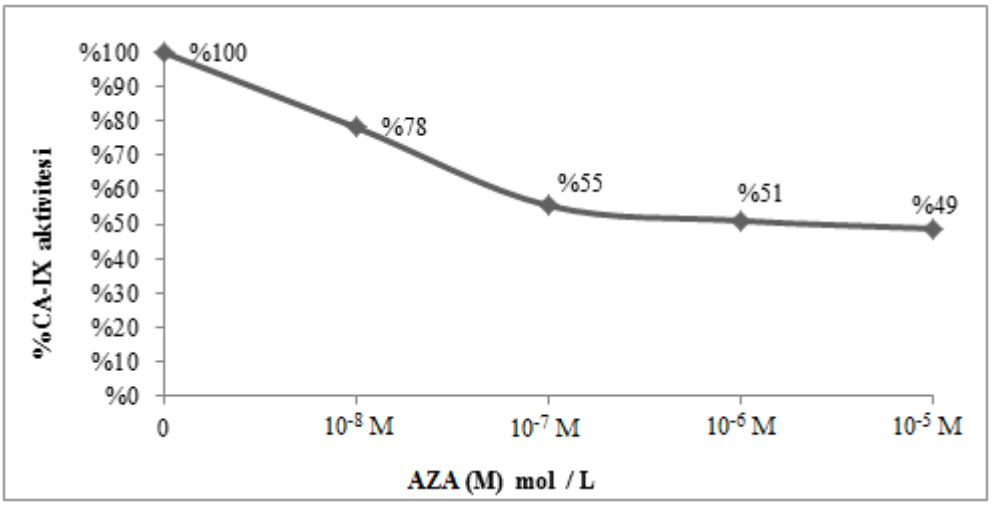
Şekil 4.32. 3f bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



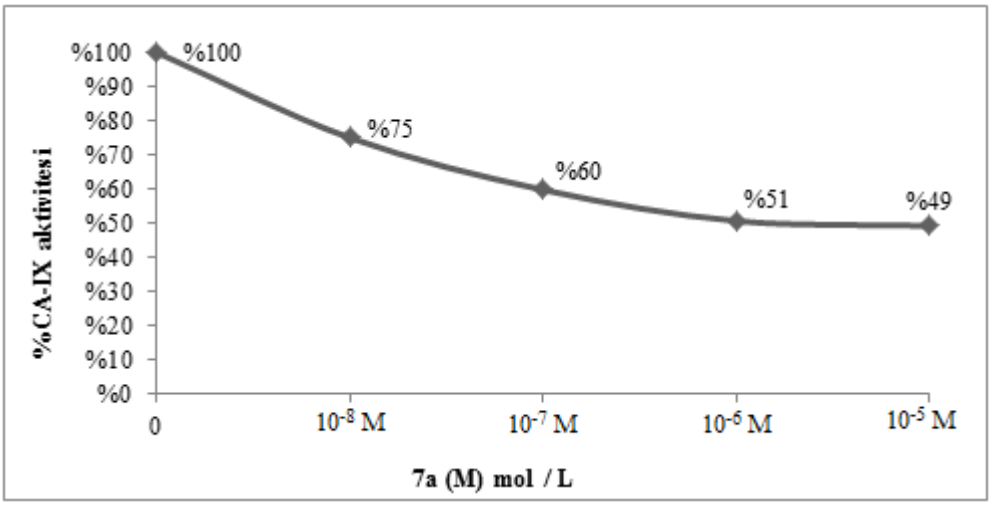
Şekil 4.33. 4a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



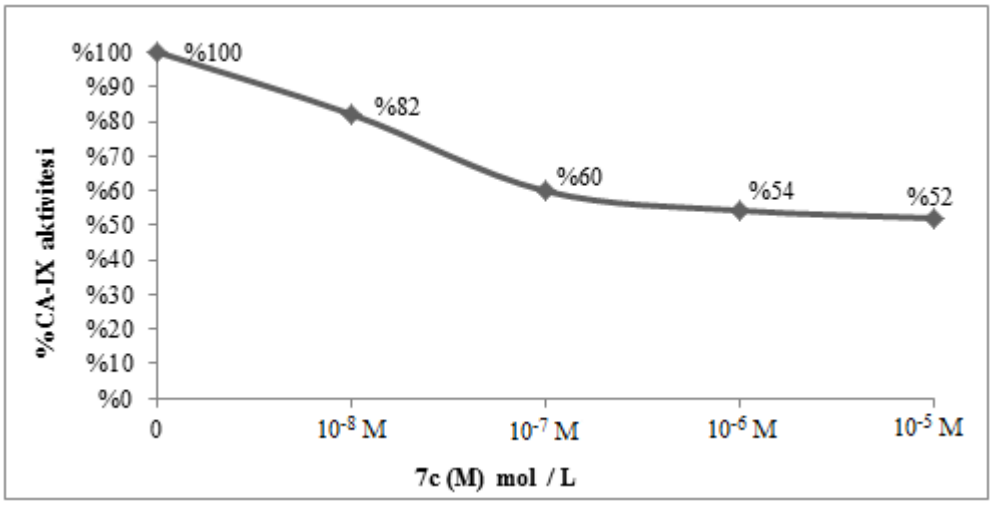
Şekil 4.34. 4b bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



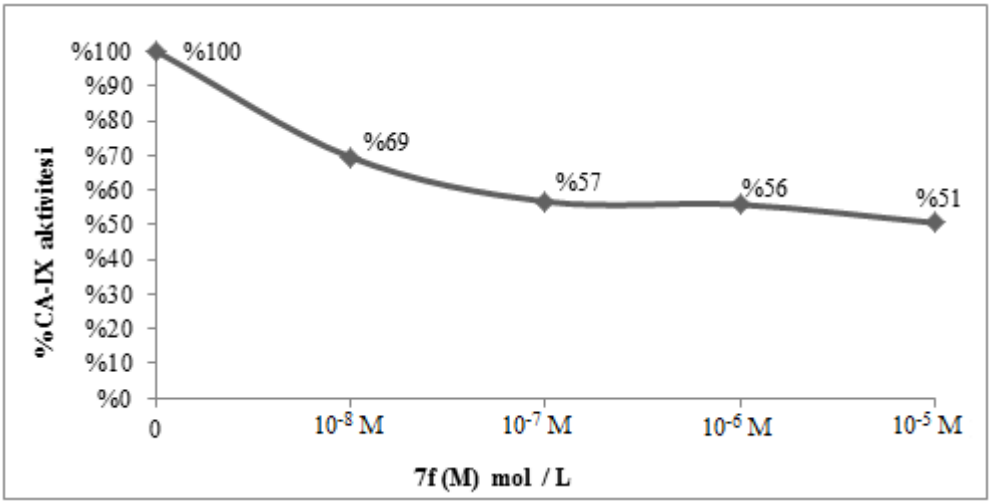
Şekil 4.35. AZA inhibitörünün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I)



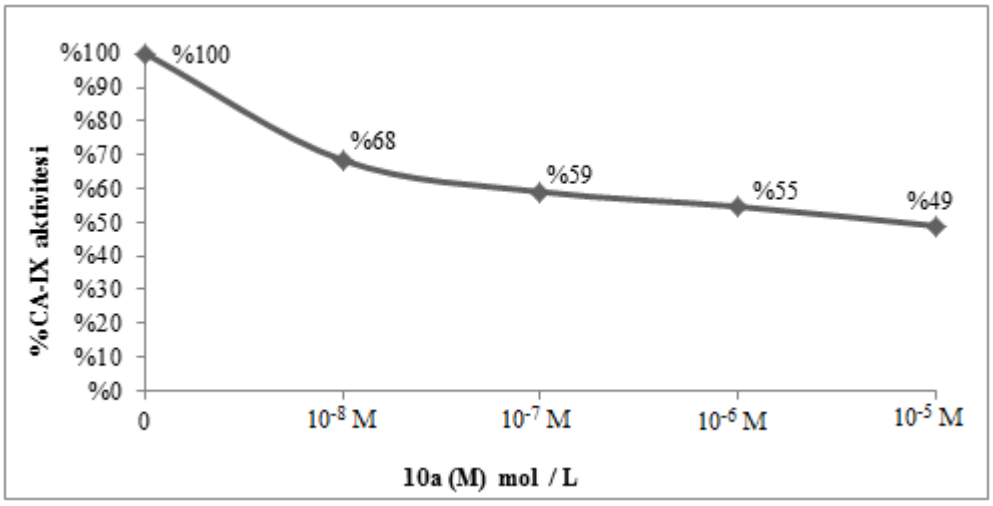
Şekil 4.36. 7a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



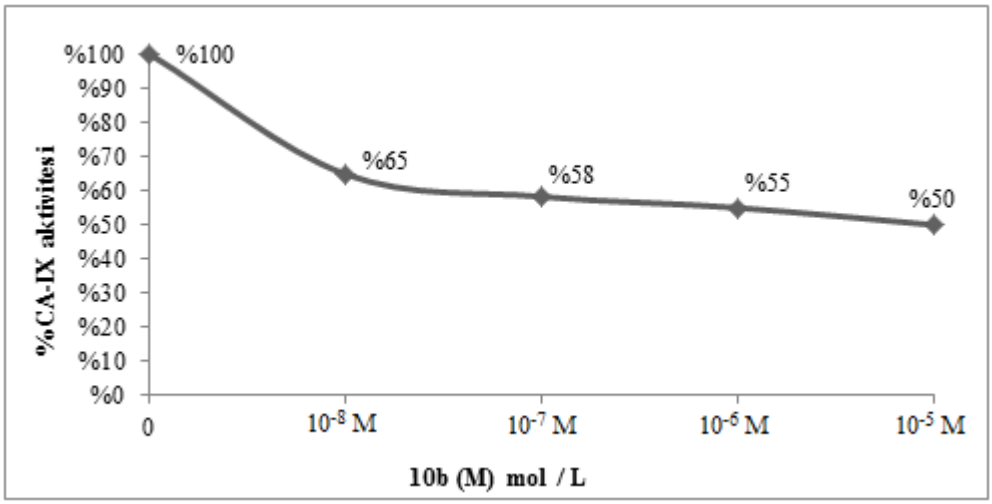
Şekil 4.37. 7c bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



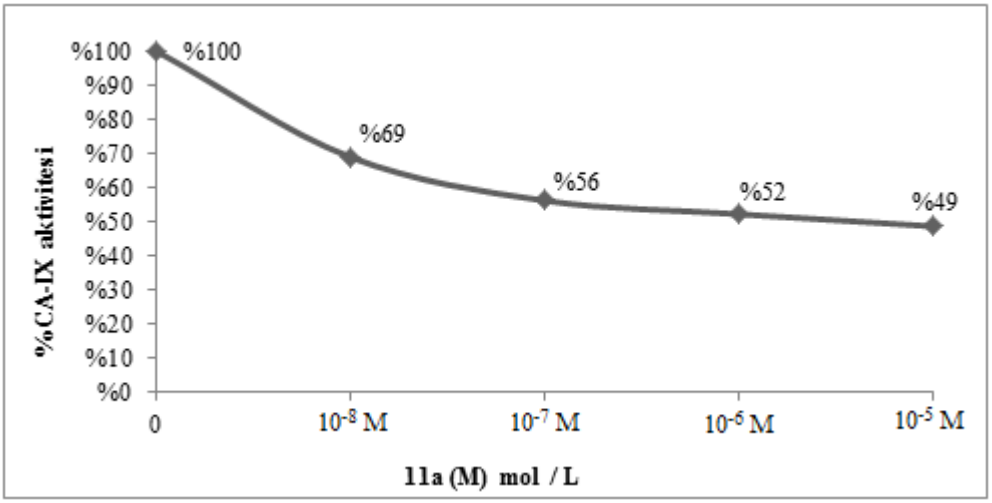
Şekil 4.38. 7f bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



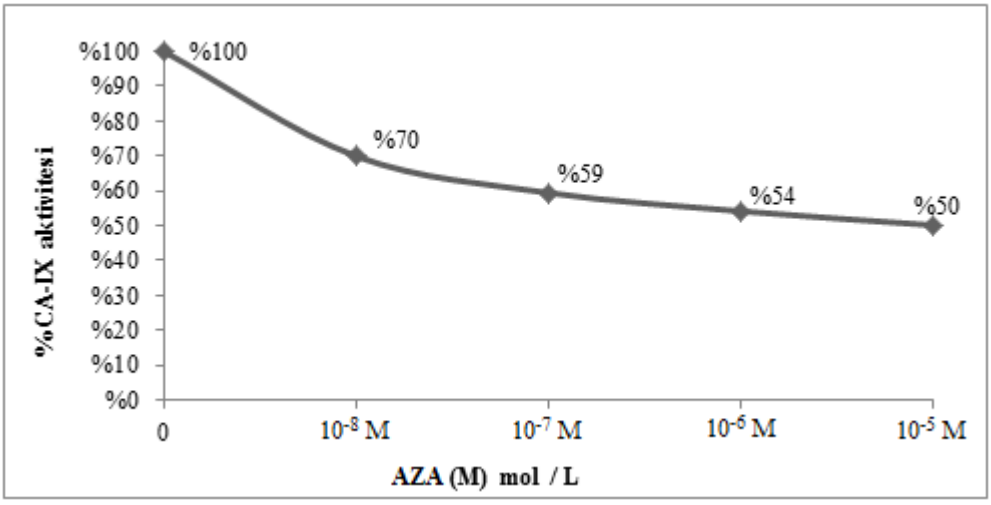
Şekil 4.39. 10a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.40. 10b bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.41. 11a bileşiğinin CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



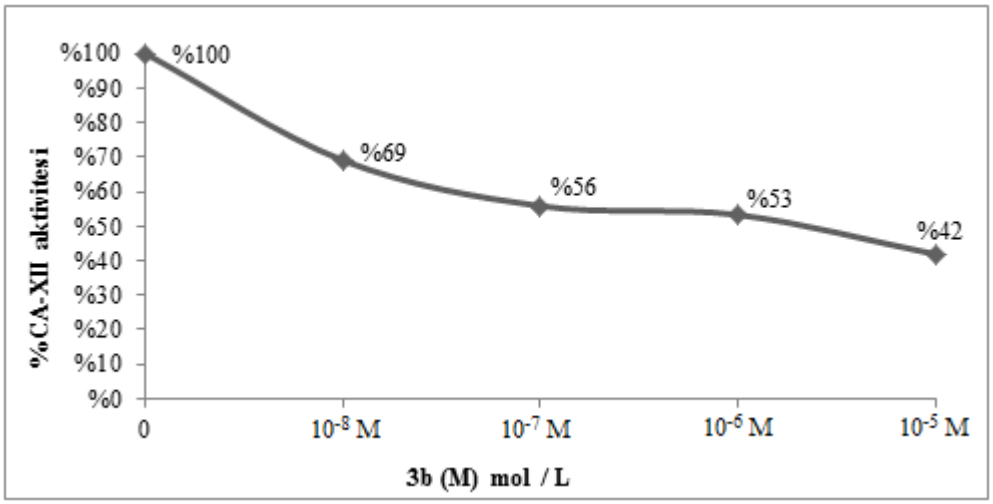
Şekil 4.42. AZA inhibitörünün CA-IX (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II)

CA-IX izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi incelenen bileşiklerin I_{50} değerlerinin özeti Tablo 4.3'de verilmiştir.

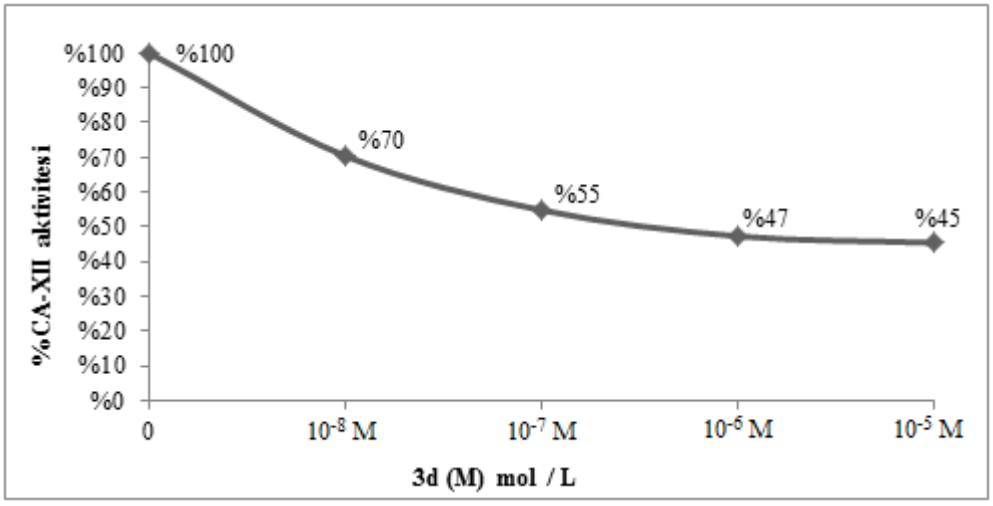
Tablo 4.3. KTS türevi olan bileşiklerin CA-IX izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri

Bileşikler	**I_{50} Değerleri**
3b	4.911
3d	7.401
3e	4.101
3f	3.300
4a	6.129
4b	6.609
AZA-I	5.150
7a	5.145
7c	18.170
7f	11
10a	8.312
10b	8.491
11a	6.636
AZA-II	10.290

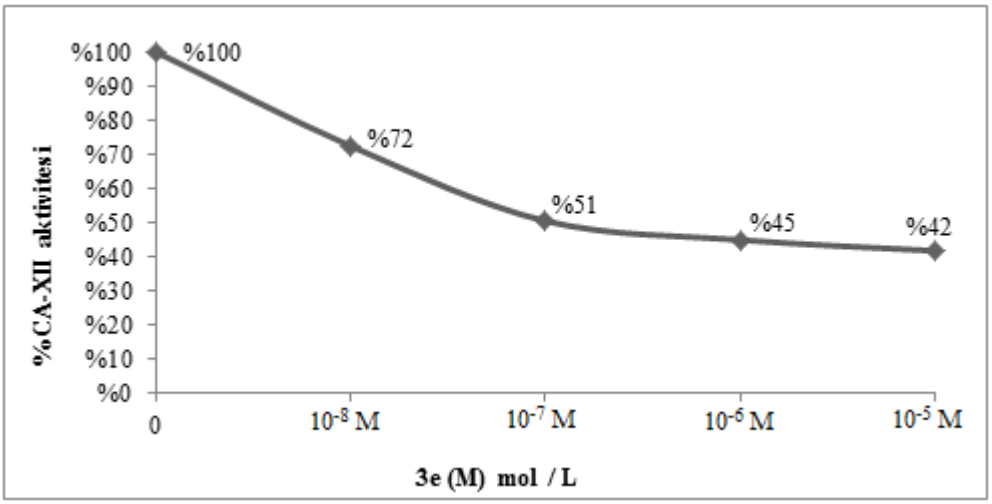
4.1.4. KTS Türevi Olan Bileşiklerin CA-XII İzoenziminin Hidrataz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin *in vitro* Olarak Stopped-Flow Kinetik Aleti ile İncelenmesi



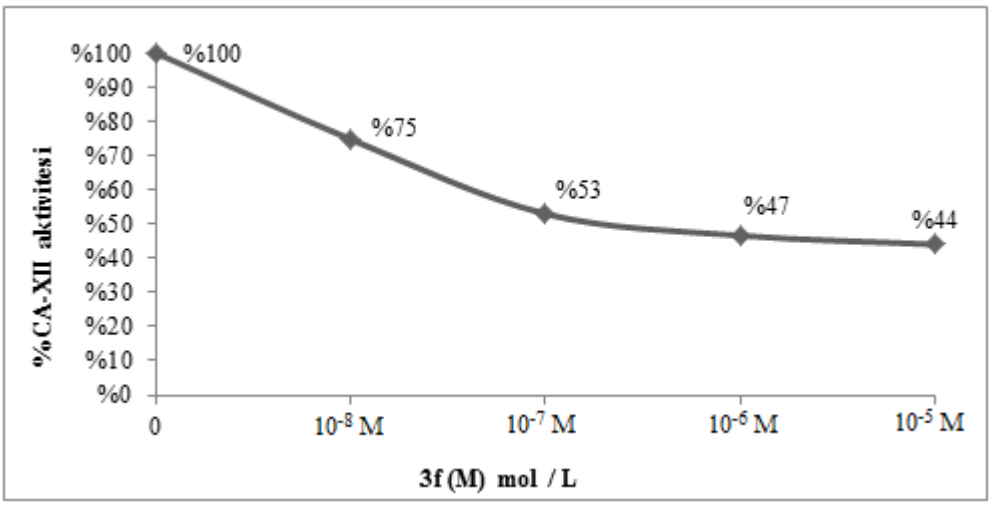
Şekil 4.43. 3b bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



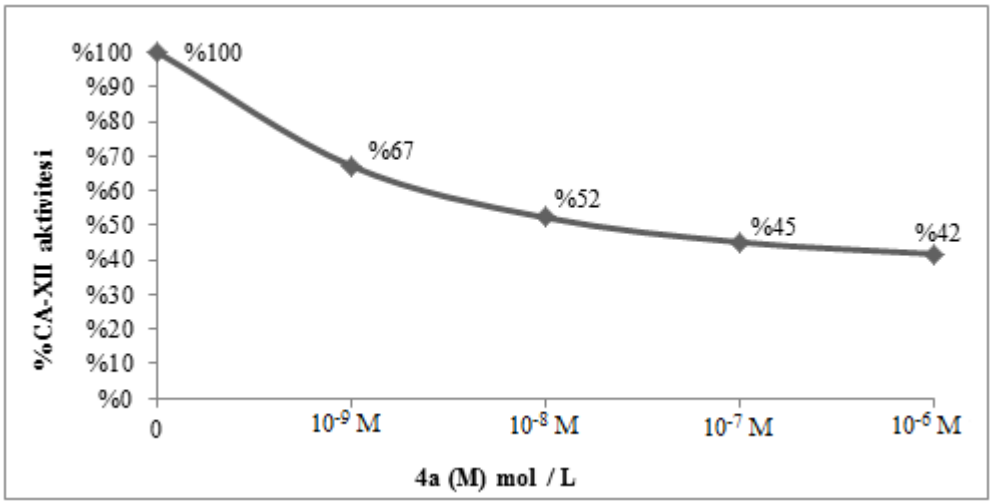
Şekil 4.44. 3d bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



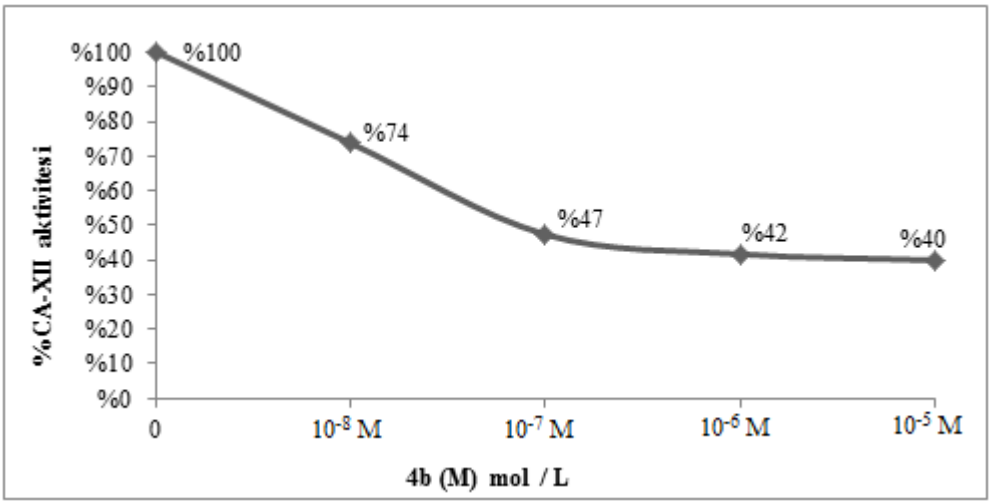
Şekil 4.45. 3e bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



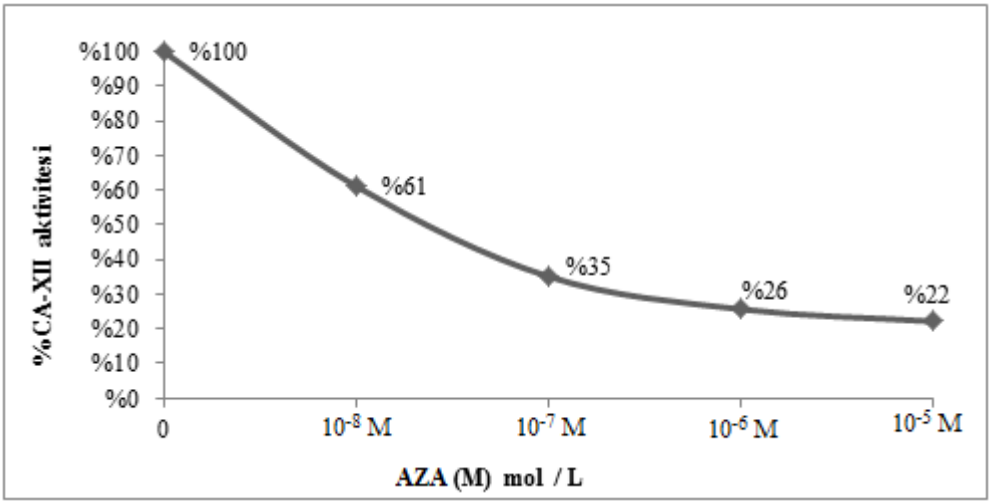
Şekil 4.46. 3f bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



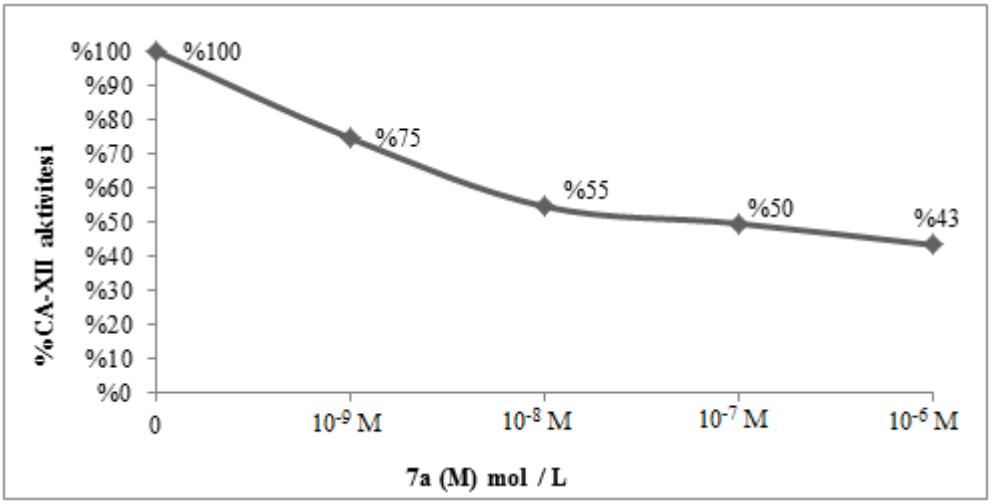
Şekil 4.47. 4a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



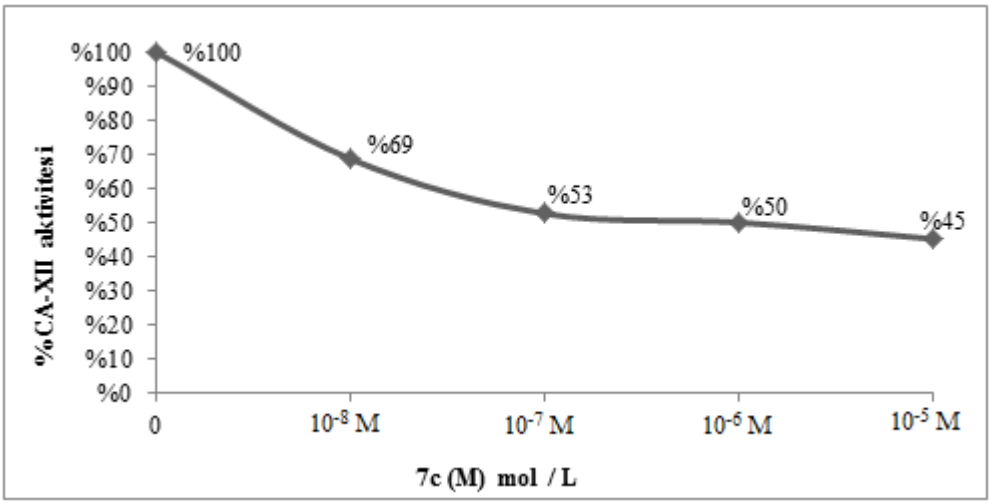
Şekil 4.48. 4b bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



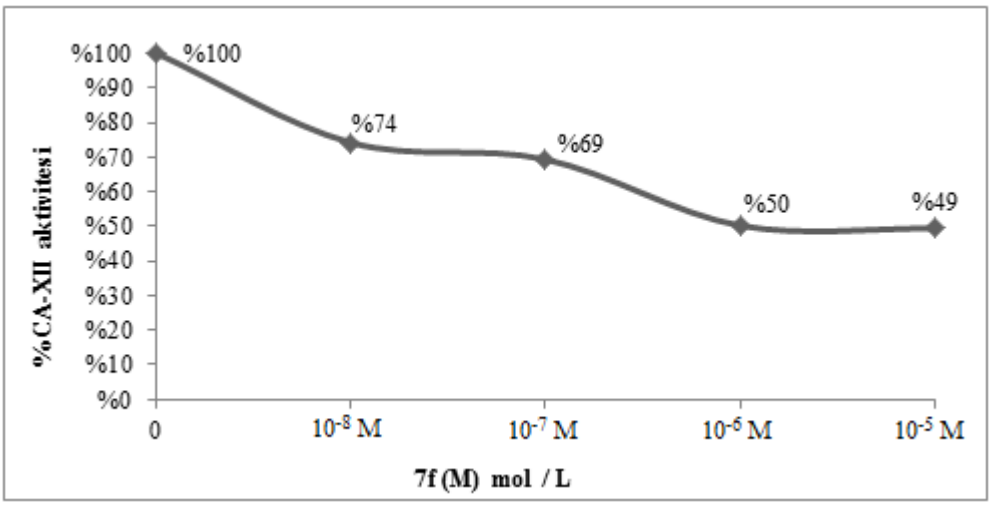
Şekil 4.49. AZA inhibitörünün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (I)



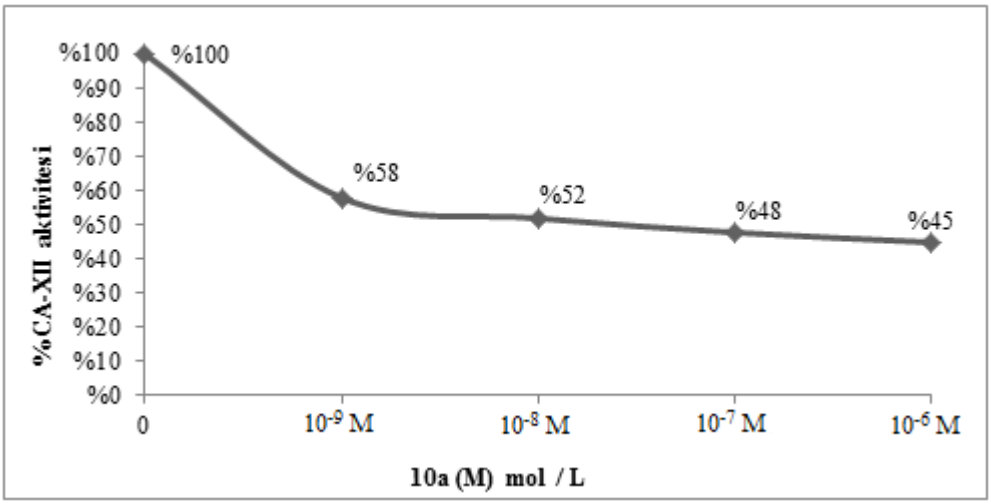
Şekil 4.50. 7a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



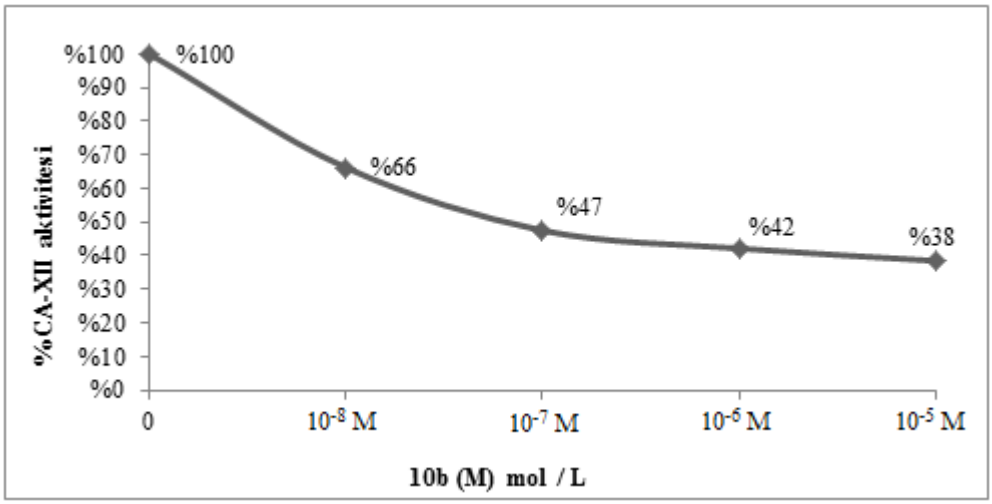
Şekil 4.51. 7c bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



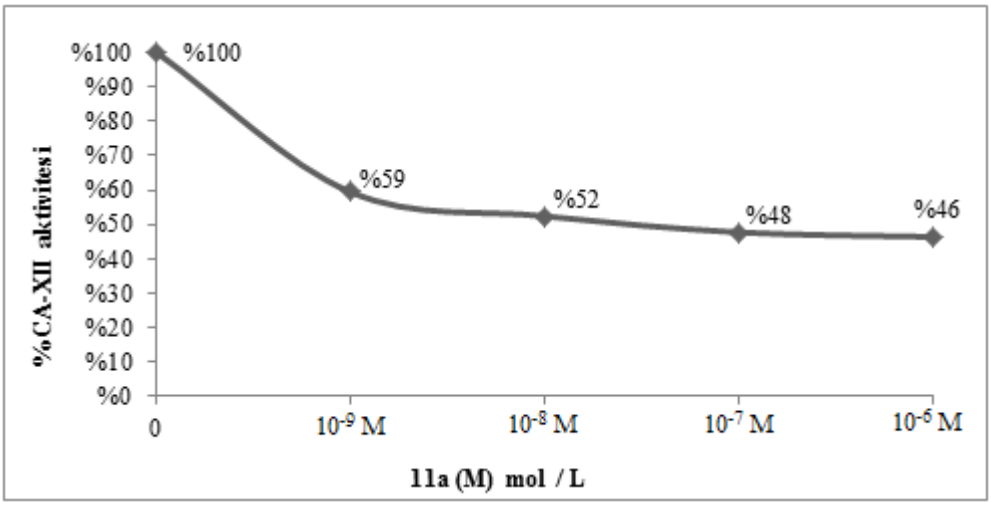
Şekil 4.52. 7f bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



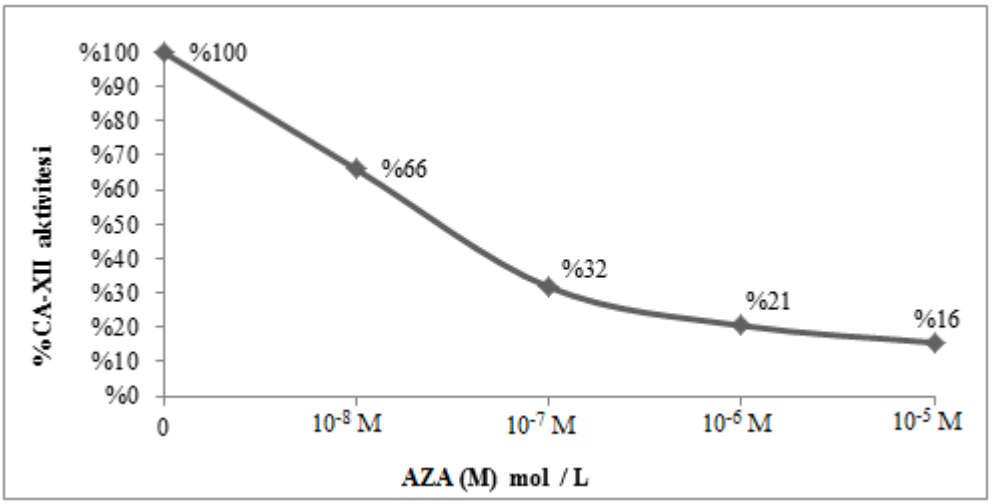
Şekil 4.53. 10a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.54. 10b bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.55. 11a bileşiğinin CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi



Şekil 4.56. AZA inhibitörünün CA-XII (10^{-7} M) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi (II)

CA-XII izoenzimi üzerinde inhibisyon etkisi incelenen bileşiklerin I_{50} değerlerinin özeti Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. KTS türevi olan bileşiklerin CA-XII izoenzimi üzerinde gözlenen I_{50} değerleri

Bileşikler	**I_{50} Değerleri**
3b	3.606
3d	0.674
3e	0.194
3f	0.528
4a	0.039
4b	0.091
AZA-I	0.048
7a	0.092
7c	1.024
7f	3.298
10a	0.047
10b	0.088
11a	0.056
AZA-II	0.052

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, yeni sentezlenmiş on iki adet KTS bileşiğinin sitozolik CA-I, CA-II ve tümör ilişkili CA-IX, CA-XII izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri Stopped-flow aleti ile in vitro olarak incelenmiştir.

CA-I ve CA-II eritrositlerde bulunan iki ana izoenzimdir (5). CA-IX ve CA-XII ise hipoksi ile indüklenen, tedaviye yanıt ve kanser süreci ile ilişkili olan kritik süreçlerde yer alan birçok tümörde yüksek eksprese edilen tümör ilişkili proteinlerdir (6). CA'ların çeşitli fizyolojik süreçlerdeki önemli rolleri gösterilmiş ve bu enzimlerin anormal düzeyinin veya aktivitesinin farklı insan hastalıkları ile olan ilişkisi ortaya konulmuştur (7).

CA izoenzimleri inhibitör ve aktivatörlerin sentezinde ilgi çekici hedefler olmuşlardır (90). CA inhibisyonu için bugüne kadar birçok aromatik sülfonamid sentezlendi ve araştırıldı. Bunların içinde en genel ve en iyi karakterize edilmiş olan inhibitörler aromatik hidrokarbonların türevleri olan benzensülfonamidlerdir (10,101).

Kromonlar ise heterosiklik bileşikler içeren doğal olarak oksijen barındıran gruptur. Bitki kingdomlarında geniş şekilde yayılır ve antosiyanin ve flavonoidler gibi önemli bileşiklerin temel yapısını oluşturur. Kromonlar, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör ve antiviral aktiviteleri ile bilinirler (108).

Supuran ve ekibinin 2005 yılında yaptıkları çalışmada, sülfanilamid, homosülfanilamid, 4-aminoetil-benzensülfonamid, pirimidinil-sübstitüe sülfanilamid türevi, sülfaguanidin ve 4-amino-6-trifloromethil-benzen-1,3-disülfonamid gibi aromatik sülfonamidler ile 3-formil-kromon veya 6-metil-3-formil-kromonun reaksiyonları ile hazırlanan bir seri bileşiğin, sitozolik izoenzimler CA-I, CA-II ve transmembran tümör ilişkili izoenzimler CA-IX, CA-XII üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Sülfaguanidin-türevi bileşikler dışında diğer sülfonamidlerin ve metal komplekslerinin farklı inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edimiştir. Bu çalışmanın

verilerine göre, CA-I izoenzimine karşı, inhibisyon sabitleri 13–100 nM aralığında iken, CA-II izoenzimine karşı inhibisyon sabitleri 1.9-102 nM aralığındadır. CA-IX ve CA-XII izoenzimlerine karşı ise inhibisyon sabitleri sırası ile, 6.3–48 nM ve 5.9–50 nM aralığında olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, formil-kromon türevi bileşiklerin, 6-metil-kromon türevlerine kıyasla daha iyi CAİ'ler olduğunu ve bu bileşiklerden bazılarının CA-IX ve CA-XII'nin çoğunlukla yüksek eksprese olduğu hipoksik tümörleri hedefleyen tedavilerin geliştirilmesi için uygunluğu belirtilmiştir (115).

2011 yılında yapılan diğer bir çalışmada, kromon parçalarını içeren yeni sentezlenmiş sülfonamidlerin sığır CA (bCA)'ya karşı inhibisyon etkisine bakılmıştır. Tüm bileşiklerin aktif olduğu ve çok iyi bCAİ aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada, 6-floro-3-formilkromonlardan elde edilen bileşiklerin en aktif olduğu bulunmuştur (116).

Supuran ve grubunun 2012 yılında yaptığı başka bir çalışmada ise, 3-formilkromon parçaları içeren sülfonamid türevlerinin bir serisinin, hCA-I, hCA-II ve hCA-IV izoenzimlerine karşı inhibisyon etkisi araştırılmış ve bu sülfonamid türevlerinin söz konusu izoenzimlere karşı güçlü inhibisyon etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tip moleküllerin diğer izoenzimlere karşı yeni etkili CAİ'lerin keşfi için yol gösterici olabileceği belirtilmiştir (117).

2013 yılında ise, kromon yapısı içeren flavonoidler ile yapılan bir çalışmada, kuersetin, kateşin, apigenin, luteolin ve moren gibi flavonoidlerin CA izoenzimlerine karşı inhibitör etkisi araştırılmıştır. Bu inhibitörler, insandan saflaştırılan hCA I, hCA II, hCA IV ve sığırdan saflaştırılan bCA III izoenzimlerine karşı test edilmiştir. Substrat olarak 4-nitrofenil asetatın kullanıldığı esteraz aktivitesi ile yapılan inhibisyon deneylerine göre, fenol kısımlarını içeren flavonoidler, farklı inhibisyonlar göstermiştir ancak klasik sülfonamid ve sülfamat inhibitörleri ile karşılaştırıldığında inhibisyon mekanizmaları henüz belirlenememiştir (118).

Söz konusu çalışmamızda, daha önce yapılmış çalışmalardan farklı olarak, tiyazolinon veya imidazolinon halkaları ile kromon yapısına bağlanmış olan primer ya da sekonder yapıdaki benzensülfonamid bileşiklerinin hem sitozolik CA-I ve CA-

II hem de tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri Stopped-flow aleti ile incelenmiş ve bazı KTS bileşiklerinin CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerine seçicilik gösterdiği belirlenmiştir.

Substrat konsantrasyonları sabit tutularak değişik bileşik konsantrasyonlarında yüzde aktiviteleri belirlenip, %50 inhibisyona sebep olan bileşik konsantrasyonları hesaplanmıştır. Özellikle tümör-ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimlerinin aktivitelerinin düşük olması sebebiyle oldukça hassas olan Stopped-flow aleti tercih edilmiştir. 12 adet KTS bileşiğinin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerindeki I_{50} ve K_i değerleri hesaplanmıştır. CA izoenzimlerinin inhibisyon değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 5.1 ve Tablo 5.2'de verilmiştir. (115). KTS türevi olan bileşiklerin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin dağılımları Şekil 5.1'de özet olarak gösterilmektedir.

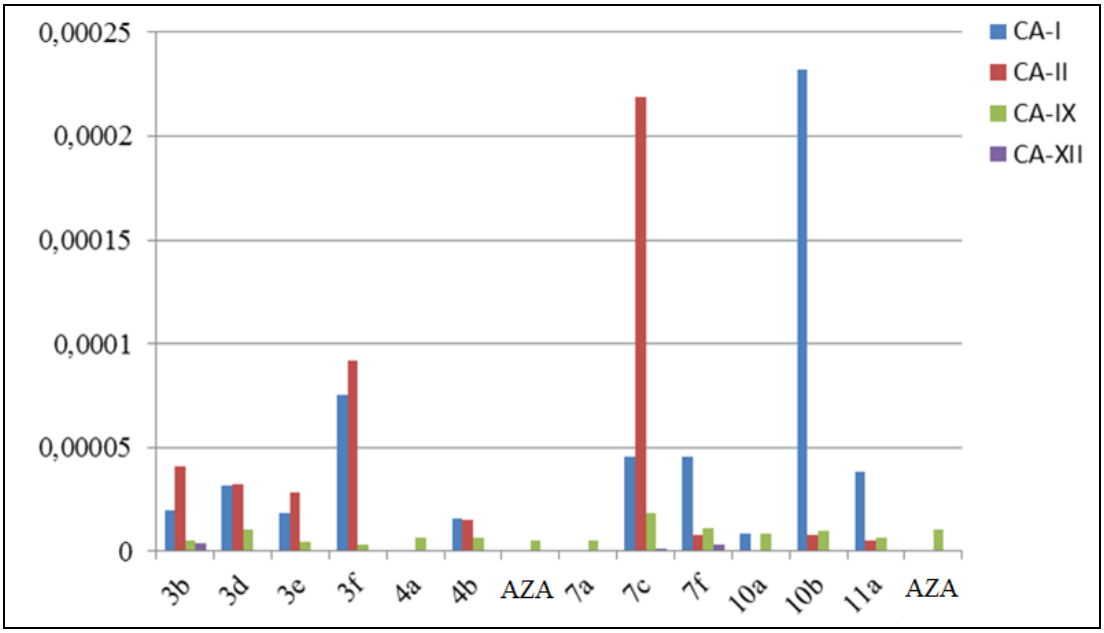
Tablo 5.1. KTS türevi olan bileşiklerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde gözlenen I_{50} değerleri.

	İzoenzimler ve I_{50} Değerleri M (µmol/L)			
Enzimler / Bileşikler	**CA-I (10^{-6} M)**	**CA-II (10^{-7} M)**	**CA-IX (10^{-7} M)**	**CA-XII (10^{-7} M)**
3b	>10	>10	4.911	3.606
3d	>10	>10	7.401	0.674
3e	>10	>10	4.101	0.194
3f	>10	>10	3.300	0.528
4a	0.505	0.382	6.129	0.039
4b	>10	>10	6.609	0.091
AZA-I	0.091	0.019	5.150	0.048
7a	0.423	0.093	5.145	0.092
7c	>10	>10	18.170	1.024
7f	>10	7.425	11	3.298
10a	8.430	0.525	8.312	0.047
10b	>10	7.756	8.491	0.088
11a	>10	5.036	6.636	0.056
AZA-II	0.233	0.083	10.290	0.052

Tablo 5.2. KTS türevi olan bileşiklerin CA-I, CA-II, CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde gözlenen K_i değerleri.

Bileşik	K_i değerleri (nM)*			
	CA I	CA II	CA IX	CA XII
3b	>10000	>10000	23.84	424.04
3d	>10000	>10000	37.62	79.35
3e	>10000	>10000	19.91	22.88
3f	>10000	>10000	20.93	62.02
4a	965.03	370.02	29.75	4.54
4b	>10000	>10000	32.09	10.76
7a	398.78	12.95	14.26	9.91
7c	>10000	>10000	24.74	85.83
7f	>10000	1064.56	25.58	546.55
10a	8003.15	75.22	23.04	5.23
10b	>10000	1112.0	25.24	9.71
11a	>10000	722.05	18.39	6.24
AZA	250.00	12.00	25.00	5.70

*Stopped-flow tekniği ile 3 farklı deney yapılmıştır. (±5-%10 aralığında hata payı vardır.)



Şekil 5.1. KTS türevi olan bileşiklerin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin dağılımları

Çalışmamızda inhibitör etkisini incelediğimiz bileşikler, "=CH-N-" veya "-CH_2NH-" gibi küçük spacer gruplar ile ayrılan kromon ve sülfonamid farmakoforlarını içerir. 3b, 3d, 3e, 3f ve 4a, 4b bileşiklerinin heterosiklik tiyazolinon veya imidazolinon halkaları içeren 7a, 7c, 7f, 10a, 10b ve 11a bileşiklerinden daha etkilidir.

KTS bileşiklerinin etkisi incelendiğinde, serbest sülfamil grubu içeren sülfonamid farmakoforlarının (primer sülfonamid) en aktif bileşikler olduğu görülmektedir. İnhibisyon etkisi incelenen serbest sülfomoil gruplarına sahip 4a, 7a, 10a ve 11a bileşikleri diğer bileşiklerden daha güçlü inhibisyon etki göstermiştir.

İnhibitörler, CA-I ve CA-II'ye karşı ya hiç aktivite göstermemiş ya da çok zayıf derecede inhibisyon etki göstermiştir. Sadece 7a bileşiği CA-II'ye karşı yüksek derecede inhibisyon etki göstermiştir (CA-II, K_i=12.95 nM).

CA-IX izoenzimini, 3b, 3e, 3f, 7a, 10a ve 11a bileşikleri AZA'nın etkisinin üzerinde yüksek derecede inhibe etmiştir. (K_i=14.3-23.8) Bileşiklerin geri kalanları ise AZA'dan ya daha az etkili ya da AZA ile eşit seviyede inhibisyon etki göstermiştir.

CA-XII izoenzimine karşı sadece 4a ve 10a bileşikleri AZA'dan çok az düzeyde yüksek aktivite göstermiştir. (sıra ile, K_i=4.5 ve 5.2 nM). 4b, 7a, 10b ve 11a (K_i=6.2-10.8 nM) bileşikleri de CA-XII'ye karşı düşük inhibisyon etki göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, en etkin inhibitörler olarak, CA-IX için 7a ve 11a (sıra ile, K_i=14.26 ve 18.39 nM) , CA-XII için ise 4a ve 10a (sıra ile, K_i=4.54 ve 5.23 nM) tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Sitozolik CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerinde yeni sentezlenmiş on iki adet KTS bileşiğinin in vitro olarak inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

- ✓ Transmembran tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimleri üzerinde yeni sentezlenmiş on iki adet KTS bileşiğinin in vitro olarak inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

- ✓ Klasik CAİ olan Asetazolamid kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

- ✓ İnhibisyon deneyleri sonucunda serbest sülfamil grubu içeren sülfonamid farmakoforlarının (primer sülfonamid) en aktif bileşikler olduğu görülmektedir.

- ✓ İnhibisyon deneyleri sonucunda, CA-II'ye karşı yüksek derecede inhibisyon etki gösteren 7a bileşiği dışında (CA-II, K_i=12.95 nM) hiçbir bileşiğin sitozolik CA-I ve CA-II'ye karşı inhibisyon etki göstermediği görülmüştür.

- ✓ İnhibisyon deneyleri sonucunda, tümör ilişkili CA-IX için 7a ve 11a bileşikleri, tümör ilişkili CA-XII için ise 4a ve 10a bileşikleri en etkin bileşikler olmuştur. CA-IX için kinetik değerler, 7a ve 11a bileşikleri için sırasıyla K_i= 14.26 nM ve K_i= 18.39 nM'dır. CA-XII için kinetik değerler, 4a ve 10a bileşikleri için sırasıyla K_i= 4.54 nM ve K_i= 5.23 nM'dır.

- ✓ 7a ve 11a bileşiklerinin CA-IX üzerinde en etkin şekilde inhibisyon göstermesi, kanser tedavisinin hipoksi ile ilişkili yolaklarında bu bileşiklerin inhibisyon etkisinin kullanılmaya aday olduğunu göstermektedir. Söz konusu bileşiklerin güçlü inhibisyon etki göstermeleri pre-klinik çalışmalar için umut verici bir sonuç olmuştur.

- ✓ Tümör ilişkili CA-IX ve CA-XII izoenzimleri için seçicilik gösteren bileşiklerin bazı klinik uygulamalarda tedavilere yeni yaklaşımlar getirebileceği düşünülmektedir.

- ✓ Kromon farmakoforlarını içeren bileşiklerin sentezi, yaşayan organizmalarda tümör ilişkili CA'ların kanser spesifik yolaklarının incelenmesi ve kanser hücre hatlarında bu enzimlerin tümör sürecine katkısının görülmesi açısından oldukça önemlidir.

- ✓ Kromon farmakoforlarını içeren bileşiklerin inhibisyon etkisinin güçlü olması, kromon temelli inhibitörlerin geliştirilmesi ve bu inhibitörlerin test edilmesi klinik açıdan oldukça önemlidir. Çünkü fotoaktif özellik taşımaları ve floresans özellik gösteren bileşikler olmalarından dolayı özellikle kanser hücre hatlarında kromon yapısı içeren CAİ'lerin kullanılması, hücre hatlarının görüntülenmesi sürecinde oldukça önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Mine İnal, Enzimler, İçinde: Lehninger Biyokimya'nın İlkeleri, Nedret Kılıç, Lehninger Principles of Biochemistry, Nelson DL, Cox MM, 3. Baskı, Ankara, Palme Yayınları, 2005: 243-293.

2. Keha E.E, Küfrevioğlu Ö.İ. Biyokimya. Aktif Yayınevi, İstanbul, 2005:91-95.

3. Chegwidden WR, Carter, ND. Introduction to the carbonic anhydrases, *EXS*, 2000, (90):13–28.

4. Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15(13):4336-50.

5. Tashian RE, Hewett-Emmett D, Goodman N. On the evolution and genetics of carbonic anhydrases I, II, and III, Isozymes: *Current Topics in Biological and Medicinal Research*, 1983, 7:79-100.

6. Monti SM, Supuran CT, De Simone G. Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008-2013), *Expert Opinion on Therapeutic. Patents*, 2013, 23(6):737-49.

7. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(2):168-81.

8. Winum JY, Supuran CT. Recent advances in the discovery of zinc-binding motifs fort he development of carbonic anhydrase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2015, 30(2):321-4.

9. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A, Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Medicinal Research Reviews*, 2003, 23(2):146-89.

10. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?, *Chemical Reviews*, 2012, 112(8):4421-68.

11. Aggarwal M, McKenna R. Update on carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008-2011), *Expert Opin. Ther. Patents*, 2012, 22(8):903-915.

12. Supuran CT. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase İnhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2012,* 27(6): 759-772.

13. Pecorino L, *Molecular Biology of Cancer, Mechanism, Targets and Therapeutics*, 3rd ed. Oxford, 2012:1-16.

14. Smith C, Marks AD, Lieberman M, İkinci Baskı, Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım, Güneş Tıp, 2007:317-336.

15. http://science.education.nih.gov/supplements/nih1/cancer/guide/understanding1.html.11 Haziran 2015.

16. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, *Robbins and Cotran Pathologic Basic Of Disease,* 9th ed., Elsevier, 2015:282-312.

17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*, 2011, 144(5):646-74.

18. Karahasanoğlu H. Resveratrolün Kanser Tedavisindeki Yeri ve Önemi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2013.

19. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbı Farmakoloji, *Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar*, 2.cilt, İstanbul, Pelikan Yayıncılık, 2009: 317-343.

20. Washington CM, Leaver DT. In: Eatmon S (eds), *Principles and Practice of Radiation Therapy*, 4th ed., Washington, Elsevier, 2015:1-20.

21. Riether C, Schürch C, Ochsenbein AF. From "magic bullets" to specific cancer immunotherapy, *Swiss Medical Weekly*, 2013, 143:w13734.

22. Baskın Y, Çalıbaşı G. Kanser Hastalarında Farmakogenetik Uygulamaları ve Farmakoekonomi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg*isi, 2011, 68(3):152-164.

23. Huang RS, Ratain MJ. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Anticancer Agents, *A Cancer Journal for Clinicians*, 2009, 59(1):42-55.

24. Jain RK, Sharma P. Targeting Cancer Pathways: The Tumor Microenvironment, *Science*, 2015, 347(6222):680.

25. Byrne MB, Leslie MT, Gaskins HR, Kenis PJ. Methods to study the tumor microenvironment under controlled oxygen conditions, *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(11):556-63.

26. Hanna E, Quick J, Libutti SK. The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy, *Oral Diseases*, 2009, 15(1):8-17.

27. Weber CE, Kuo PC. The tumor microenvironment, *Surgical Oncology*, 2012, 21(3):172-7.

28. Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouysségur J. Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration, *Advances in Enzyme Regulation*, 2010, 50(1):20-33.

29. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors, *Frontiers in Physiology*, 2014, 4(400):1-14.

30. Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 10(10):767-77.

31. Kumar V, Gabrilovich DI. Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment, *Immunology*, 2014, 143(4):512-9.

32. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O_2 availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(12):967-75.

33. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases, *Cancer Research*, 2000, 60(24):7075-83.

34. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, 2009, 107(6):1053-62.

35. Huang D, Li C, Zhang H. Hypoxia and cancer cell metabolism, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(3):214-9.

36. Meijer TW, Kaanders JH, Span PN, Bussink J. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18(20):5585-5594.

37. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(6):393-410.

38. Zhang XY, Wang X, Sun SZ, Song Y, Yang MX, Qu X. Effect of hypoxia inducible factor-1 alpha on vascular endothelial growthfactor expression in human tongue squamous carcinoma cells (Tca8113) under hypoxia, *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2007, 42(12):747-9.

39. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1α and HIF2α: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 12(1):9-22.

40. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3(10):721-732.

41. Sasabe E, Yang Z, Ohno S, Yamamoto T. Reactive oxygen species produced by the knockdown of manganese–superoxide dismutase up-regulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in oral squamous cell carcinoma cells, *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 48(10)1321-1329.

42. Lindskog, S, Coleman JE. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, 70(9):2505-8.

43. Gilmour KM. Perspectives on carbonic anhydrase, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2010, 157(3):193-7.

44. Meldrum NU, Roughton, FJ. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties, *The Journal of Physiology*, 1933, 80(2):113-42.

45. Bradfield JR. Plant carbonic anhydrase, *Nature*, 1947, 159(4040):467.

46. Smith KS, Ferry, JG. Prokaryotic carbonic anhydrases, *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4):335-366.

47. Akıncıoğlu A, Akıncıoğlu H, Gülçin İlhami, Durdağı S, Supuran CT, Göksu S. Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors: Novel sulfamoylcarbamates and sulfamides derived from acetophenones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 23(13):3592-602.

48. Del Prete S, Vullo D, Fisher GM, Andrews KT, Poulsen SA, Capasso C, Supuran CT, Discovery of a new family of carbonic anhydrases in the malaria pathogen Plasmodium falciparum - The η-carbonic anhydrases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24(18):4389-96.

49. Xu Y, Feng L, Jeffrey PD, Shi Y, Morel FM. Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms, *Nature*, 2008, 452(7183):56-61.

50. Thiry A, Dogné JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2006, 27(11):566-73.

51. Imtaiyaz Hassan M, Shajee B, Waheed A, Ahmad F, Sly WS, Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(6):1570-82.

52. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, 1997, 74(1):1-20.

53. Bernadat G, Supuran CT, Iorga BI, Carbonic anhydrase binding site parameterization in OPLS-AA force field, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(6):1427-30.

54. Aggarwal M, Kondeti B, McKenna R. Insights towards sulfonamide drug specificity in α-carbonic anhydrases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(6):1526-33.

55. Domsic JF, Avvaru, BS, Kim CU, Gruner SM, Agbandje-McKenna M, Silverman DN, McKenna R. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(45):30766-71.

56. Alvarez BV, Quon AL, Mullen J, Casey JR. Quantification of carbonic anhydrase gene expression in ventricle of hypertrophic and failing human heart, *BMC Cardiovascular Disorders*, 2013, 13:2.

57. Carta F, Supuran CT. Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005-2013), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2013, 23(6):681-91.

58. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications, *Future Medicinal Chemistry*, 2011, 3(9):1165-80.

59. CA1 carbonic anhydrase I. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/759. 22 Haziran 2015.

60. Puscas I, Coltau M, Domuta G, Baican M, Puscas C, Pasca R. Carbonic anhydrase I inhibition by nitric oxide: implications for mediatio n of the hypercapnia-induced vasodilator response, *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2000, 27(1-2):95-9.

61. Takakura M, Yokomizo A, Tanaka Y, Kobayashi M, Jung G, Banno M, Sakuma T, Imada K, Oda Y, Kamita M, Honda K, Yamada T, Naito S, Ono M. Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISNR Oncology*, 2012, 2012:768190.

62. Fonti R, Latella G, Caprilli R, Frieri G, Marcheggiano A, Sambuy Y. Carbonic anhydrase I reduction in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. Digestive Diseases and Sciences, 1998, 43(9):2086-92.

63. Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda, SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, Fujimoto JG, Avery RL, Arrigg PG, Bursell SE, Aiello LP, Feener EP. *Nature Medicine*, 2007, 13(2):181-8.

64. CA2 carbonic anydrase II. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/760. 22 Haziran 2015.

65. Silverman DN, Mckenna R. Solvent-mediated proton transfer in catalysis by carbonic anhydrase, *Accounts of Chemical Research*, 2007, 40(8):669-75.

66. Tashian RE. Genetics of the mammalian carbonic anhydrases. *Advances in Genetics*, 1992, 30:321-56.

67. Wistrand PJ, Schenholm M, Lönnerholm G. Carbonic anhydrase isoenzymes CA I and CA II in the human eye, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1986, 27(3):419-28.

68. Yoshiura K, Nakaoka T, Nishishita T, Sato K, Yamamoto A, Shimada S, Saida T, Kawakami Y, Takahashi TA, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Oyaizu N, Yamashita N. Carbonic anhydrase II is a tumor vessel endothelium-associated antigen targeted by dendritic cell therapy, *Clinical Cancer Research*, 2005, 11(22):8201-7.

69. Haapasalo J, Nordfors K, Järvelä S, Bragge H, Rantala I, Parkkila AK, Haapasalo H, Parkkila S. Carbonic anhydrase II in the endothelium of glial tumors: a potential target for therapy, *Neuro-Oncology*, 2007, 9(3):308-13.

70. Alterio V, Hilvo M, Di Fiore A, Supuran CT, Pan P, Parkkila S, Scaloni A, Pastorek J, Pastorekova S, Pedone C, Scozzafava A, Monti SM, De Simone G. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(38):16233-8.

71. Thiry A, Supuran CT, Masereel B, Dogné JM. Recent Developments of Carbonic Anhydrase Inhibitors as Potential Anticancer Drugs, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(11):3051-6.

72. Parkkila S, Rajaniemi H, Parkkila AK, Kivela J, Waheed A, Pastorekova S, Pastorek J, Sly WS. Carbonic anhydrase inhibitör suppresses invasion of renal cancer cells in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(5):2220-4.

73. Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, Kettmann R, Pastorek J. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships, *Genomics*, 1996, 33(3):480-7.

74. CA9 carbonic anydrase IX. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/768. 22 Haziran 2015.

75. Csaderova L, Debreova M, Radvak P, Stano M, Vrestiakova M, Kopacek J, Pastorekova S, Svastova E. The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration, *Frontiers in Physiology*, 2013, 4:271.

76. Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation, *Oncogene*, 2010, 29(50):6509-21.

77. Svastová E, Hulíková A, Rafajová M, Zat'ovicová M, Gibadulinová A, Casini A, Cecchi A, Scozzafava A, Supuran CT, Pastorek J, Pastoreková S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH, *FEBS Letters*, 2004, 577(3):439-45.

78. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 2008, 13(6):472-82.

79. Hoogsteen IJ, Marres HA, Wijffels KI, Rijken PF, Peters JP, van den Hoogen FJ, Oosterwijk E, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Colocalization of carbonic anhydrase 9 expression and cell proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma, *Clin Cancer Res.*, 2005, 11(1):97-106.

80. De Simone G, Alterio V, Supuran CT. Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors, *Expert Opin Drug Discov.*, 2013, 8(7):793-810.

81. CA12 carbonic anydrase XII. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/771. 22 Haziran 2015.

82. Syrjänen L, Luukkaala T, Leppilampi M, Kallioinen M, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila S, Karttunen T. Expression of

cancer-related carbonic anhydrase IX and XII in normal skin neoplasms, *APMİS*, 2014, 122(9):880-9.

83. Whittington DA, Waheed A, Ulmasov B, Shah GN, Grubb JH, Sly WS, Christianson DW. Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 2001, 98(17):9545-50.

84. Parkkila S, Parkkila AK, Saarnio J, Kivelä J, Karttunen TJ, Kaunisto K, Waheed A, Sly WS, Türeci O, Virtanen I, Rajaniemi H. Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2000, 48(12):1601-8.

85. Kivelä A, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivelä J, Parkkila AK, Waheed A, Sly WS, Grubb JH, Shah G, Türeci O, Rajaniemi H. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors, *The American Journal of Pathology*, 2000, 156(2):577-84.

86. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W,Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer, *The American Journal of Pathology*, 2001, 158(3):905-19.

87. Wykoff CC, Beasley N, Watson PH, Campo L, Chia SK, English R, Pastorek J, Sly WS, Ratcliffe P, Harris AL. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast, *The American Journal of Pathology*, 2001, 158(3):1011-9.

88. Özensoy Ö. Kanser İlişkili Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı

İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2006.

89. Arslan O. Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlarinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 1994.

90. Sethi KK, Verma SM, Tanç M, Carta F, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis and inhibition of the cytosolic mammalian carbonic anhydraseisoforms I, II and VII with benzene sulfonamides incorporating 4,5,6,7-tetrachlorophthalimide moiety, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(17):5168-74.

91. Brynda J, Mader P, Šícha V, Fábry M, Poncová K, Bakardiev M, Grüner B, Cígler P, Řezáčová P. Carborane-based carbonic anhydrase inhibitors, *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(51):13760-3.

92. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: an editorial, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2013, 23(6):677-9.

93. Doğanay S, Fırat PG, Karbonik Anhidraz İnhibitörleri, *Glo-Kat*, 2007, 2:213-218.

94. Taşkesen M, Glokom Tedavisinde Kullanılan Yeni Karbonik Anhidraz İnhibitörleri Sentezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, 2002.

95. Carta F, Scozzafava A, Supuran CT. Sulfonamides: a patent review (2008-2012), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2012, 22(7):747-758.

96. Amundsen LH. Sulfanilamide and Related Chemotherapeutic Agents, *Journal of Chemical Education*, 1942, *19* (4),167-17.

97. Mann T, Keilin D. Sulphanilamide as a Spesific Inhibitor of Carbonic Anhydrase, *Nature*, 1940, 146, 164-165.

98. DeRuiter J. Carboxylic Acid Structure and Chemistry: Part 1. http://www.auburn.edu/~deruija/pda1_acids1.pdf. 26 Haziran 2015.

99. Moeker J, Peat TS, Bornaghi LF, Vullo D, Supuran CT, Poulsen SA. Cyclic secondary sulfonamides: unusually good inhibitors of cancer-related carbonic anhydrase enzymes, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57(8):3522-31.

100. Alp C, Maresca A, Alp NA, Gültekin MS, Ekinci D, Scozzafava A, Supuran CT. Secondary/tertiary benzenesulfonamides with inhibitory action against the cytosolic human carbonic anhydrase isoforms I and II, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013, 28(2):294-8.

101. Arun Bahl, BS Bahl. Advanced Organic Chemistry, Revised Multicolour Edition, Ram Nagar, New Delhi, Chand & Company, 2010: 1068-1091.

102. Akdemir A, Güzel-Akdemir O, Scozzafava A, Capasso C, Supuran CT. Inhibition of tumor-associated human carbonic anhydrase isozymes IX and XII by a new class of substituted-phenylacetamido aromatic sulfonamides, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(17):5228-32.

103. Edwards AM, Howell JB. The chromones: history, chemistry and clinical development. A tribute to the work of Dr R. E. C. Altounyan, *Clinical & Experimental Allergy*, 2000, 30(6):756-74.

104. Dyrager C. Design And Synthesis Of Chalcone And Chromone Derivatives As Novel Anticancer Agents, Kimya Anabilim Dalı, Göteborg: Gothenburg Üniversitesi, Doktora Tezi, 2012.

105. Huang W, Liu MZ, Li Y, Tan Y, Yang GF. Design, syntheses, and antitumor activity of novel chromone and aurone derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007, 15(15):5191-7.

106. Matos MAR, Sousa CCS, Miranda MS, Morais VMF, Liebman JF, Energetics of Coumarin and Chromone, *The Journal of Physical Chemistry*, 2009, 113(32): 11216-11221.

107. Kaur R, Taheam N, Sharma AK, Kharb R, Important Advances on Antiviral Profile of Chromone Derivatives, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2013, 4(2): 79-96.

108. Ceylan-Ünlüsoy M. Antidiyabetik Etkili Yeni Bazı Kromonil-Tiyazolidindion Türevleri Üzerinde Araştırmalar, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2009.

109. Stopped-Flow. http://thelab.photophysics.com/stopped-flow/stopped-flow-spectroscopy-a-beginners-guide-ii/. 26 Temmuz 2015.

110. Stopped-Flow. http://www.chem.agilent.com/Library/applications/uv75.pdf. 26 Temmuz 2015.

111. Schematic layout of the single mixing mode used in the stopped-Flow. http://www.photophysics.com/tutorials/stopped-flow-spectrometry/1-understanding-stopped-flow. 26 Temmuz 2015.

112. Stopped-Flow Instrument. http://www.photophysics.com/products/sx20-stopped-flow-spectrometer. 26 Temmuz 2015.

113. Stopped-Flow Instrument. http://thelab.photophysics.com/stopped-flow/stopped-flow-spectroscopy-a-beginners-guide/. 26 Temmuz 2015.

114. Stopped-Flow Instrument area of utilization. http://www.photophysics.com/tutorials/stopped-flow-spectroscopy. 26 Temmuz 2015.

115. Puccetti L, Fasolis G, Vullo D, Chohan ZH, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff_s bases

incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(12):3096-101.

116. Al-Rashida M, Ashraf M, Hussain B, Nagra SA, Abbas G. Discovery of new chromone containing sulfonamides as potent inhibitors of bovine cytosolic carbonic anhydrase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, 19(11):3367-71.

117. Ekinci D, Al-Rashida M, Abbas G, Şentürk M, Supuran CT. Chromone containing sulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2012, 27(5): 744-747.

118. Ekinci D, Karagöz L, Ekinci D, Şentürk M, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: *in vitro* inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoids, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2013, 28(2): 283-288.

8. EKLER

EK-1. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Fonksiyonları ve Ekspresyon Bölgeleri (51)

İzoenzimler	Fonksiyonları	Ekpresyon Bölgeleri
CA-I	Antireflü savunma, gaz değişimi ve iyon transportu	Sindirim sistemi ve eritrositler
CA-II	Antireflü savunma, kemik rezorpsiyonu, aköz humor'un üretimi, sperm hareketi, idrar asidifikasyonu, serebrospinal sıvı sekresyonu ve gaz değişimi	Hemen hemen tüm hücrelerde
CA-III	Antireflü savunma, yağ asidi metabolizması, oküler sıvı transportu ve homeostazis	İnsan embriyosunun iskelet kasında ve notokortta, miyotomlar ve ekstremite tomurcuklarının ön kaslarında
CA-IV	Antireflü savunma, HCO_3^- rezorpsiyonu, NH_4^+ çıkışı, pH düzenlenmesi, oküler sıvının üretimi, gaz değişimi ve serebral kan akışı	Gastrointestinal sistem, böbrek, endotelyum, pankras, tükrük bezleri, kalp kası, göz, kolon
CA-VA	Adipositlerde ve biyosentetik reaksiyonlarda piruvat karboksilaz için bikarbonat sağlayan mitokondriyal enzim	Karaciğer, böbrek, pankreatik adacıklar ve beta hücreleri
CA-VB	Biyosentetik reaksiyonlar ve amonyağın detoksifikasyonu	Pankreas, böbrek, tükrük bezleri, spinal kord, kalp, iskelet kası ve gastrointestinal mukoza
CA-VI	pH düzenlenmesi, antireflü savunma, karsinojenlerden koruma, tat fonksiyonu	Tükürük, gözyaşı ve süt, nazal, lakrimal, von Ebner ve meme bezi
CA-VII	Serebrospinal sıvı üretimi	Merkezi sinir sistemi
CARP-VIII	İşlevsiz	Serebral Purkinje hücreleri
CA-IX	pH düzenlenmesi, hücre adezyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, iyon taşınması, testiküler sıvının konsantrasyonu ve asidifikasyonu	Normal gastrointestinal sistem, bir çok kanser, erkek atım kanalı
CARP-X	İşlevsiz	Myelin tabaka, kolorektal neoplazm yüzey mikrovilisinde, merkezi sinir sistemi ve beyinde yüksek ekspresyon
CARP-XI	İşlevsiz	Spinal kord ve tiroitte orta ekpresyon, beyin ve merkezi sinir sisteminde güçlü ekspresyon
CA-XII	pH düzenlenmesi, aköz humor'un üretimi, HCO_3^- rezorpsiyonu, H^+ sekresyonu, testiküler sıvının konsantrasyonu ve asidifikasyonu	Kolon, böbrek, prostat, bağırsak ve aktive lenfositler, kanser, meme, akciğer göz, erkek atım kanalıı üretim epiteli
CA-XIII	Gastrointestinal sistem, üreme sistemi ve böbrekte asit-baz dengesinin onarımı ve pH düzenlenmesi	Timus, ince bağırsak, dalak, prostat, ovaryum, kolon ve testis
CA-XIV	HCO_3^- absorbsiyonu ve nöronal iletimin geçişi	Yetişkin karaciğer ve merkezi sinir sisteminin parçalarında, kalp, ince bağırsak, kolon, böbrek, sidik torbası, iskelet kası ve beyin

EK-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Beyza Ecem ÖZ
Doğum tarihi	: 06/05/1989
Doğum yeri	: Ankara
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim, Ankara
E-mail	: beyzaecem.oz@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Nermin-Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi
Lisans	: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 83,75 (ÜDS)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
UK Biochemical Society	

EK-3. Tezden Üretilen Yayın

European Journal of Medicinal Chemistry 96 (2015) 425–435

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Synthesis, carbonic anhydrase inhibition and cytotoxic activity of novel chromone-based sulfonamide derivatives

Fadi M. Awadallah [a, *], Tamer A. El-Waei [a], Mona M. Hanna [a], Safinaz E. Abbas [a], Mariangela Ceruso [b], Beyza Ecem Oz [b, c], Ozen Ozensoy Guler [b, c], Claudiu T. Supuran [b, *]

[a] Pharmaceutical Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Kasr El-Eini Street, 11562, Cairo, Egypt
[b] University of Florence, Neurofarba Department, Via Ugo Schiff 6, Polo Scientifico, 50019, Sesto Fiorentino, Firenze, Italy
[c] Yildirim Beyazit University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Cinnah Campus, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 January 2015
Received in revised form
31 March 2015
Accepted 14 April 2015
Available online 15 April 2015

Keywords:
Chromone
Sulfonamide
Breast cancer
Lung cancer
Carbonic anhydrase

ABSTRACT

Four series of sulfonamides incorporating chromone moieties were synthesized and assessed for their cytotoxic activity against MCF-7 and A-549 cell lines, considering the fact that some of these tumors overexpress isoforms of carbonic anhydrase (CA, EC 4.2.1.1) which is inhibited by sulfonamides. Most new sulfonamides showed weak inhibitory activity against the offtarget, cytosolic isoforms hCA I, II but effectively inhibited the tumor-associated hCA IX and XII. The most active compounds featured a primary SO_2NH_2 group and were active in the low micromolar range against MCF-7 and A-549 cell lines. Compound **4a** showed IC_{50} of 0.72 and 0.50 μM against MCF-7 and A-549 cell lines, respectively, and was further evaluated for its proapoptotic activity which proved enhanced in both tumor types.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

EK-4. Uluslararası Platformda Sunulmuş Bildiri (Poster)

10th International Carbonic Anhydrase Conference

April 20-22, 2015

Maastricht, The Netherlands



BOOK OF ABSTRACTS

Topic I *"CA chemical aspects"*

P3: SYNTHESIS, CARBONIC ANHYDRASE INHIBITION AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF NOVEL CHROMONE-BASED SULFONAMIDE DERIVATIVES

Fadi M. Awadallah,[a] Tamer A. El-Waei,[a] Mona M. Hanna,[a] Safinaz E. Abbas,[a] Mariangela Ceruso,[b] Beyza Ecem Oz,[b,c] Emine Terzi, [b,c] Ozen Ozensoy Guler,[b,c] Claudiu T. Supuran[b]

[a] Pharmaceutical Chemistry department, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Kasr El-Eini street, 11562, Cairo, Egypt
[b] University of Florence, Neurofarba Department, Via Ugo Schiff 6, Polo Scientifico, 50019, Sesto Fiorentino (Firenze) Italy
[c]Yildirim Beyazit University Faculty of Medicine Department of Medical Biology, Bilkent Campus Ankara, Turkey

The carbonic anhydrases are widespread enzymes, present in all life kingdoms including prokaryotes and eukaryotes. CA enzyme comprises six genetic families including; α, β, γ, δ, ζ and η-classes. 16 different α-CA isoenzymes were described in mammals which are located different parts of the cell. hCA I and hCA II are the target isoenzymes for anticonvulsant, diuretic and anti-glaucoma drugs, among others. hCA IX and hCAXII are tumour associated isoenzymes. Due to clinical importance of CA isoenzymes, many classes of CA inhibitors have been developed over the years.[1-3] In our current study, four series of sulfonamides incorporating chromone moieties were tested for hCA I, hCA II, hCA IX and hCA XII inhibition. Most of the new sulfonamides compounds showed weak inhibitory activity against the off target cytosolic isoforms hCA I, II but effectively inhibited the tumor-associated hCA IX and XII. The most active compounds in inhibiting the enzyme were those featuring a primary SO_2NH_2 group. Sulfonamides incorporating chromone moieties may be thus of interest for developing antitumor agents with a new mechanism of action.[4]

[1] Supuran C.T. *Nature Rev. Drug. Discov.* 2008, *7*, 181; [2] Neri, D.; Supuran, C.T. *Nature Rev. Drug. Discov.* 2011, *10*. 767; [3] De Simone et al., *Expert Opin. Drug Discov.* 2013, *8*, 793; [4] Manuscript submitted for publication to *Eur. J. Med. Chem.*