

β -D-Glukan, Lektin, Linoleik Asit ve β -Karoten Bileşiklerinin Karbonik Anhidraz Enzimleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Rabia AKKAŞ¹, Ekrem TUNCA², Metin BÜLBÜL³

^{1,2,3}Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 43100, Kütahya, Türkiye

(Alınış / Received: 24.01.2020, Kabul / Accepted: 13.05.2020, Online Yayınlanma / Published Online: 20.08.2020)

Anahtar Kelimeler

β -D-glukan,
Lektin,
Linoleik asit,
 β -karoten,
Karbonik anhidraz

Özet: β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten; hayvansal, bitkisel ve bakteriyel kaynaklarda bulunan, biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Glokom, dünya genelinde körlüğe neden olma bakımından katarakttan sonra ikinci sırada gelen bir hastalıktır. Karbonik anhidraz (CA) inhibitörleri uzun yıllardır glokom tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak, inhibitör ajanların yan etkileri azımsanmayacak derecede çoktur. Yeni CA inhibitörlerinin geliştirilmesi üzerine çeşitli araştırma grupları çalışmalar yapmaktadırlar. Doğal kaynaklı bileşiklerin CA inhibitörü olarak kullanımının araştırılması da son yıllarda popülerlik kazanmıştır. Bu çalışmada, β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten bileşiklerinin, insan eritrosit CA izoenzimleri olan hCA I ve hCA II üzerine etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Bileşiklerin K_i değerleri hCA I için $0.45 \pm 0.09 \mu\text{M} - 37.02 \pm 17.85 \mu\text{M}$ aralığında, hCA II için $3.12 \pm 1.38 \mu\text{M} - 61.23 \pm 25.46 \mu\text{M}$ aralığındadır.

Investigation of the Effects of Compounds, β -D-Glucan, Lectin, Linoleic Acid and β -Carotene on Carbonic Anhydrase Enzymes

Keywords

β -D-glucan,
Lectin,
Linoleic acid,
 β -carotene,
Carbonic anhydrase

Abstract: β -D-glucan, lectin, linoleic acid and β -carotene are biologically active compounds and they are found in animal, herbal and bacterial sources. Glaucoma is the second most common cause of blindness worldwide after cataract. Carbonic anhydrase (CA) inhibitors have been used in the treatment of glaucoma for years. However, inhibitory agents have a lot of side effects. Research groups have been working on the development of new CA inhibitors. Research into the use of compounds of natural origin as CA inhibitors has also gained popularity in recent years. In this study, the inhibitory effects of β -D-glucan, lectin, linoleic acid and β -carotene on human erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes, hCA I and hCA II, have been studied *in vitro*. The K_i values of the compounds were in the range of $0.45 \pm 0.09 \mu\text{M} - 37.02 \pm 17.85 \mu\text{M}$ for hCA I, and $3.12 \pm 1.38 \mu\text{M} - 61.23 \pm 25.46 \mu\text{M}$ for hCA II.

1. Giriş

β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten, doğada pek çok canlı türünde karşımıza çıkan biyomoleküllerdir. β -D-glukan, $\beta(1,3)$ ve $\beta(1,4)$ glikozidik bağlarıyla birbirine bağlanmış glukoz birimlerinden oluşan bir polisakkarittir [1, 2]. β -D-glukanın, koroner kalp rahatsızlıkları ve kardiyovasküler rahatsızlık risklerini azalttığı, serum kolesterol seviyesini düşürdüğü ve kan glukoz seviyesini düzenlediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [2, 3]. Lektinler, yaşayan bütün canlı türlerinde bulunan ve karbohidrat bağlayıcı olarak tanımlanan proteinlerdir. Spesifik monosakkaritleri ve oligosakkaritleri seçici olarak tanıma ve bu

moleküllere geri dönüşümlü olarak bağlanma yetenekleri, lektinlerin başlıca özelliğidir. Bitki yaşamı için temel moleküller olan lektinler, hücre-hücre iletişimde, gelişme ve savunma stratejilerinde önemli roller üstlenirler [4]. Lektin proteinlerinin antibakteriyel, mitojenik, bağışıklığı güçlendirici, anti-proliferatif ve antitümör aktiviteleri vardır [5, 6]. Terpen yapısında olan β -karoten ise retinol ve retinoidlerin öncüsüdür. β -karotenin antikanser aktivitesi olmakla birlikte kardiyovasküler rahatsızlıklara karşı da koruma sağlamaktadır [7, 8]. Esansiyel bir yağ asidi olan linoleik asit, iltihaplanma ve adipogenez indüklemeye ve endokannabinoid sistem regülasyonunda rol oynayan araşidonik aside dönüştürülür [9]. Linoleik asidin interlökin-6 ve

interlökin-1 β salınımını azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir [10].

Karbonik anhidrazlar (CA, E.C. 4.2.1.1), katalitik merkezinde Zn²⁺ iyonu bulunduran, basit, ancak önemli bir fizyolojik olay olan karbon dioksitin (CO₂) bikarbonat (HCO₃⁻) ve protona (H⁺) dönüşümlü hidrasyonu reaksiyonunu katalizleyen, yedi farklı gen ailesi (α , β , γ , δ , ζ , η , θ) tarafından kodlanan metaloenzimlerdir [11-13]. α - gen ailesi tarafından insanlarda kodlanan on beş farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir [11]. CA izoenzimleri; pH dengesi, elektrolit salınımı, solunum, CO₂ ve iyon taşınımı, bazı biyosentez reaksiyonları (glukoneogenez, lipogenez vb.) ve tümör oluşumu gibi birçok önemli fizyolojik süreçte aktif rol oynarlar[14-16]. Göz dokusunda bulunan sitozolik CA izoenzimi olan hCA II, göz içi sıvısının (aköz humor) oluşumunda görev alır [17]. Glokom, göz içi basıncındaki (IOP) yükselmeye bağlı olarak kademeli görme alanı kaybı ile karakterize bir hastalıktır [18, 19]. CA inhibitörleri aköz humor oluşumunu yavaşlatarak, göz içi basıncını düşürürler. Glokomun tedavisi için, göz içi sıvısının oluşumunda rol alan CA izoenzimleri terapötik hedef konumundadırlar [20, 21].

Son yıllarda, hastalıkların tedavisi veya önlenmesi amacıyla sentetik bileşiklerin yerine, olası yan etkilerinin daha az olması nedeniyle, doğal bileşiklerin kullanımında artış meydana gelmiştir. Bu bağlamda, kuersetin, gallik asit, kafeik asit, ellajik asit, resveratol ve kateşin gibi polifenoller ile spermin ve spermidin gibi bazı doğal bileşiklerin CA inhibisyon çalışmaları çeşitli gruplar tarafından yapılmıştır [15, 16, 22-24]. Ancak β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten bileşiklerinin CA izoenzimleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışma literatürde mevcut değildir.

Bu çalışmada, insan karbonik anhidraz izoenzimleri olan hCA I ve hCA II insan eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten bileşiklerinin bu izoenzimlerin üzerindeki etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Araştırma kapsamında kullanılan β -D-glukan (arpa), lektin (fıstık), linoleik asit ve β -karoten bileşikleri ve diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Eritrosit hücre membranlarının hemolizattan uzaklaştırılması soğutmalı santirfüj (SIGMA 3K30) kullanılarak sağlanmıştır. Afinite kromatografisi esnasında peristaltik pompa (ISMATEC REGLO Digital MS-2/6) kullanılmıştır. İzoenzimlerin esteraz aktiviteleri ve bileşiklerin esteraz inhibisyon potansiyelleri UV-Visible

spektrofotometre (SHIMADZU UV1700 PharmaSpec) kullanılarak belirlenmiştir.

2.2. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılması

Antikoagülanlı tüplere alınan kan örnekleri 1500 rpm devirde 20 dk santrifüjlendi ve plazma ayrıldı. Eritrositler izotonik çözelti (%0.9 NaCl) ile birkaç kez yıkandı ve hacimlerinin 1.5 katı buzlu su ile hemoliz edildi. Hücre membranları, hemolizatin 4 °C sıcaklıkta, 20000 rpm devirde 30 dk. süreyle santrifüj edilmesi suretiyle ortamdan uzaklaştırıldı. Hemolizatin pH'ı katı TRIS (tris(hidroksimetil)amino metan) kullanılarak 8.7 değerine ayarlandı ve daha önceden 25.0 mM TRIS-HCl/100 mM Na₂SO₄ (pH 8.7) çözeltisi ile dengelenmiş afinite kolonuna (Sepharose®4B-L-tirozin-*p*-aminobenzen-sülfonamit) yüklendi. 25.0 mM TRIS-HCl/22.0 mM Na₂SO₄ (pH 8.7) çözeltisi ile yapılan yıkama işlemi sonrasında, hCA I izoenzimi 1000 mM NaCl/25.0 mM Na₂HPO₄ (pH 6.3) çözeltisi kullanılarak, hCA II izoenzimi ise 100 mM NaCH₃COO/500 mM NaClO₄ (pH 5.6) çözeltisi ile afinite kolonundan elüe edildi [25]. Protein miktarı Bradford metoduna göre belirlendi [26]. İzoenzimlerin saflık kontrolleri SDS-PAGE ile yapıldı [27].

2.3. Saflaştırılan enzimlerin hidrataz ve esteraz aktivitelerinin belirlenmesi

hCA I ve hCA II' nin CO₂ hidrataz aktivitesi pH-stat yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin prensibi, CO₂ bileşiğinin H₂O ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan kaynaklı olarak, pH' ın 8.15 den 6.15 e düşmesi için geçen sürenin pH metre ve kronometre kullanılarak belirlenmesine dayanır. [28, 29].

Enzim aktivitesi, $((t_0 - t_c) / t_c)$ eşitliği kullanılarak hesaplandı. Burada t_0 enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi, t_c enzimli CO₂ hidrasyon süresidir.

Esteraz aktivitesi, substrat olarak kullanılan 4-nitrofenilasetat bileşiğinin, CA izoenzimleri katalizörlüğünde, 4-nitrofenol(at) bileşiğine hidrolizi esnasında meydana gelen absorban değişiminin 348 nm de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Ölçümler 25 °C sıcaklıkta, 3 dakika süreyle yapılmıştır [30].

2.4. Çalışmada kullanılan bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin ve K_i sabitlerinin belirlenmesi

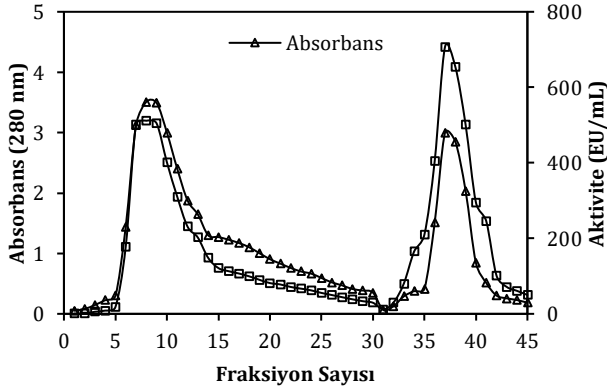
Bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi için, farklı inhibitör konsantrasyonlarında, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri, "Kesim 2.3" de tarif edildiği şekilde ölçüldü. İnhibitörsüz ortamdaki ölçümlerde enzim aktivitesi %100 kabul edilerek, %Aktivite-[İnhibitör] eğrileri çizildi ve eğrinin denklemi yardımıyla bileşiklerin IC₅₀ değerleri belirlendi [17].

İnhibisyon sabiti (K_i), izoenzimlerin esteraz aktivitesi esas alınarak belirlendi. K_i değerlerinin belirlenmesi için, enzimli reaksiyon hızını %30, %50 ve %70 oranında yavaşlatan üç farklı inhibitör konsantrasyonu seçildi ve her bir inhibitör konsantrasyonu için beş farklı substrat konsantrasyonunda (0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ve 0.7 mM) CA enzim aktiviteleri ölçüldü. Aynı ölçümler inhibitörsüz ortamda da tekrarlandı ve Lineweaver-Burk eğrileri çizilerek K_i sabiti belirlendi [31].

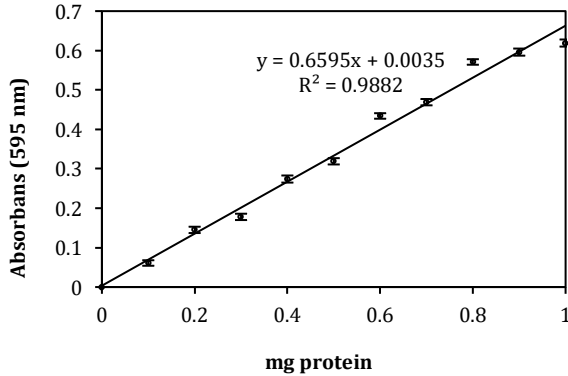
3. Bulgular

3.1. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırılması

hCA I ve hCA II, Sepharose®4B-L-tirozin-*p*-aminobenzen-sülfonamid afinite kolonundan saflaştırıldı. Elüatlarda kalitatif protein analizi, kantitatif protein miktar analizi ve hidrataz aktivitesi ölçümü gerçekleştirildi (Şekil 1, Şekil 2)

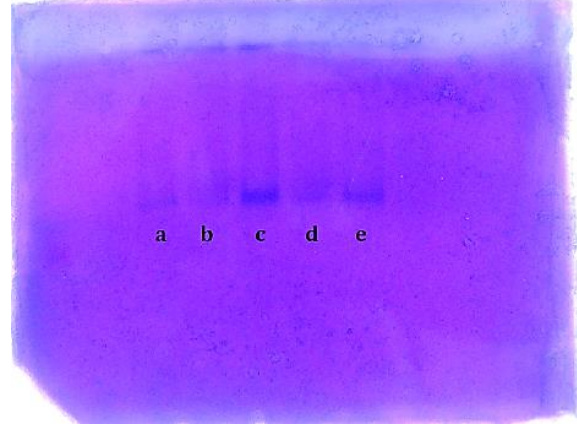


Şekil 1. hCA I ve hCA II elüatlarında yapılan kalitatif protein analizi ve hidrataz aktivitesi ölçümü (1. - 30. fraksiyon hCA I, 31. - 45. fraksiyon hCA II içindir).



Şekil 2. Bradford metoduna göre oluşturulan standart eğri.

Afinitite kolonundan elüe edilen hCA I izoenzimi 1345.82 EU.mg protein⁻¹ spesifik aktivite ile 184.88 kat, hCA II izoenzimi ise 3928.61 EU.mg protein⁻¹ spesifik aktivite ile 539.68 kat saflaştırılmıştır (Tablo 1). Ayrıca izoenzimlerin saflıkları SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Saflaştırılan enzimlerin SDS-PAGE analizi (a: standart sığır karbonik anhidraz (29 kDa), b, c: saflaştırılan hCA I, d, e: saflaştırılan hCA II).

3.2. β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten bileşiklerinin IC_{50} değerleri ve K_i sabitlerinin belirlenmesi

Bileşiklerin hidrataz ve esteraz IC_{50} değerlerinin belirlenmesi için, saflaştırılan CA izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri, farklı konsantrasyonlardaki β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten varlığında "Kesim 2.3" de tarif edildiği şekilde ölçüldü. Her ölçüm üç kez tekrarlandı ve %Aktivite-[İnhibitör] eğrileri çizilerek bileşiklerin IC_{50} değerleri hesaplandı (Tablo 2).

Tablo 2 de görüldüğü üzere, β -D-glukan bileşiği hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermemiştir. β -karoten bileşiği ise, izoenzimlerin hidrataz aktivitelerini inhibe etmemiş, esteraz aktivitelerini ise ortalama bir düzeyde inhibe etmiştir. Lektin bileşiği, CA izoenzimlerinin hidrataz ve esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Linoleik asit bileşiği ise özellikle CA izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde en güçlü inhibitör etkiye sahip bileşiktir. Hidrataz ve esteraz IC_{50} değerlerinin hesaplanması için çizilen eğrilere birer örnek "Şekil 4" ve "Şekil 5" de gösterilmiştir.

Tablo 1. Saflaştırılan enzimlerin spesifik aktivite değerleri ve saflaştırma verimleri.

Saflaştırma Adımı	Aktivite (EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	105.19	50.00	14.45	722.50	5259.50	7.28	100.00	1.00
Afinitite (hCAI)	511.41	5.00	0.38	1.90	2557.05	1345.82	48.62	184.88
Afinitite (hCAII)	707.15	5.00	0.18	0.90	3535.75	3928.61	67.23	539.68

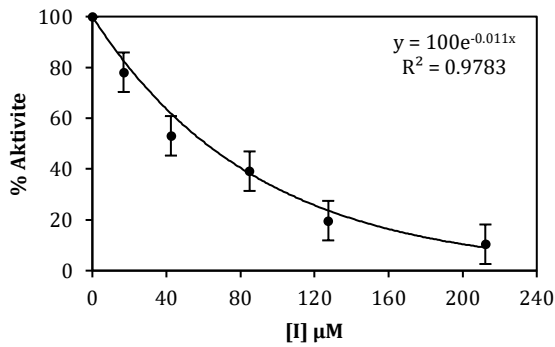
Tablo 2. Bileşiklerin hesaplanan IC_{50} değerleri ve K_i sabitleri.

Bileşik	Hidrataz IC_{50} (μM) $\pm SD^{a,b}$		Esteraz IC_{50} (μM) $\pm SD^{a,b}$		K_i (μM) $\pm SD^{a,b}$		Inhibisyon Türü	Inhibisyon Türü
	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II		
AAZ ^c	0.39 \pm 0.008	0.20 \pm 0.005	0.42 \pm 0.004	0.31 \pm 0.008	0.26 \pm 0.003		0.14 \pm 0.005	
Lektin	13.43 \pm 1.93	20.22 \pm 4.33	20.07 \pm 3.71	8.31 \pm 0.59	8.35 \pm 2.89	Yarışmasız	4.76 \pm 1.38	Yarışmasız
Linoleik asit	60.25 \pm 18.26	104.50 \pm 9.53	0.71 \pm 0.04	7.09 \pm 0.44	0.45 \pm 0.09	Yarışmasız	3.12 \pm 1.38	Yarışmasız
β -karoten	-	-	161.70 \pm 20.01	100.38 \pm 14.48	37.02 \pm 17.85	Yarışmasız	61.23 \pm 25.46	Yarışmasız
β -D-glukan	-	-	-	-	-	-	-	-

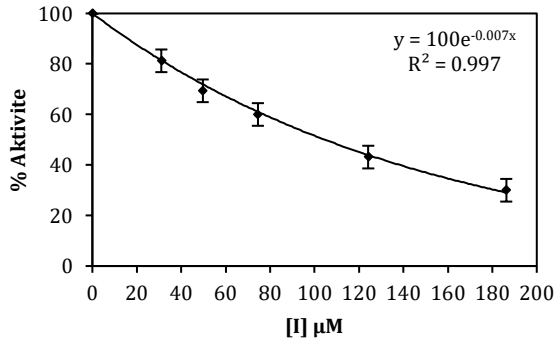
^aÜç ölçüm sonucundan elde edilen ortalama \pm standart sapma değeri.

^bTüm ölçümler için $p < 0.0001$ dir.

^cAAZ (asetazolamit) kontrol olarak kullanılmış olup, tablodaki değerler kaynak 17'den alınmıştır.



Şekil 4. Linoleik asit bileşiğinin hCA I hidrataz IC_{50} değerinin belirlenmesi için çizilen grafik.

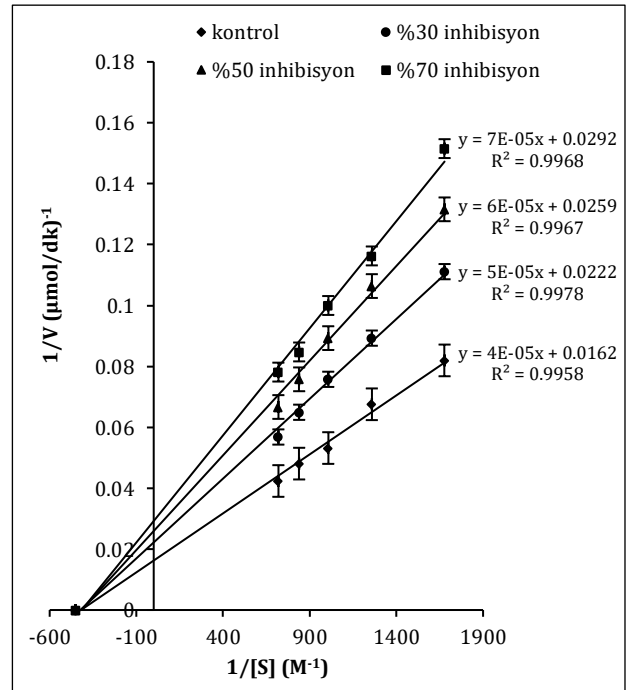


Şekil 5. β -karoten bileşiğinin hCA II esteraz IC_{50} değerinin belirlenmesi için çizilen grafik.

Bileşiklerin K_i değerleri ise, esteraz aktivitesi ölçümü esas alınarak "Kesim 2.4" de tarif edildiği şekilde hesaplandı. Üç farklı inhibitör konsantrasyonunun her biri için beş farklı substrat konsantrasyonunda yapılan esteraz aktivitesi ölçümleri üçer kez tekrarlandı ve elde edilen ortalama değerler kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafikleri yardımıyla K_i sabitleri hesaplandı (Tablo 2). Ayrıca çizilen grafikler yardımıyla inhibisyonun türü de belirlendi.

Tablo 2 deki değerler incelendiğinde, özellikle linoleik asit bileşiğinin hCA I K_i sabitinin, referans bileşik olan AAZ bileşiğinin K_i sabitine yakın bir değerde olması kayda değer bir durumdur. hCA I ve

hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon gösteren tüm bileşiklerin, inhibisyon mekanizmalarının yarışmasız mekanizma üzerinden yürüdüğü belirlenmiştir. Çalışma kapsamında çizilen Lineweaver-Burk grafiklerine bir örnek "Şekil 6" da gösterilmiştir.



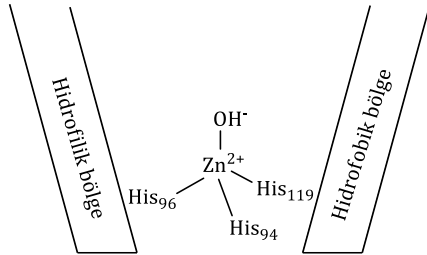
Şekil 6. Linoleik asit bileşiğinin hCA I K_i sabitinin ve inhibisyon türünün belirlenmesi için çizilen grafik

4. Tartışma ve Sonuç

Karbonik anhidrazlar (CA); taşıma ve homeostaz, glukoneogenez, lipogenez ve ürogenez gibi biyosentez reaksiyonları, solunum, kalsifikasyon, tümör oluşumu, çeşitli organ ve dokulardan elektrolit salınımı ve kemik resorpsiyonu gibi kritik patofizyolojik süreçlerle ilişkili olan CO_2/HCO_3^- dönüşümünü katalizleyen metaloenzimlerdir [32]. Bu çalışmada insan eritrositlerinden hCA I ve hCA II, Sepharose®4B-L-tirozin-p-aminobenzen-sülfonamit afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. hCA I izoenziminin 1345.82 EU.mg protein⁻¹ spesifik

aktivite ile 184.88 kat, hCA II izoenziminin ise 3928.61 EU.mg protein⁻¹ spesifik aktivite ile 539.68 kat saflaştırıldığı belirlendi (Tablo 1). Standart sığır karbonik anhidrazı (29 kDa) kullanılarak yapılan SDS-PAGE analizi, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin afinite kolonundan saf bir şekilde elüe edildiğini göstermektedir (Şekil 3).

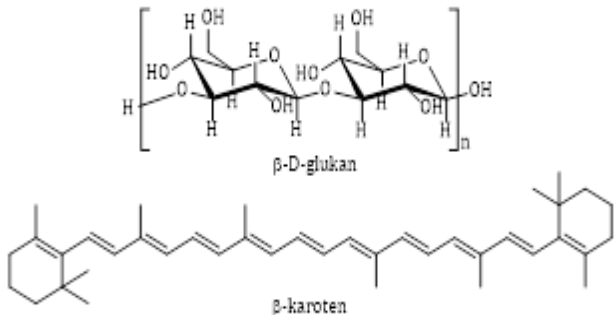
CA izoenzimlerinin aktif bölgesi, genişliği 12 Å, derinliği 13 Å olan konik bir boşluk şeklindedir. Aktif bölge boşluğu, bir tarafı hidrofobik amino asitlerden, diğer tarafı ise hidrofilik amino asitlerden oluşan iki kısma bölünmüştür (Şekil 7) [11]. Bu durum enzimin geniş bir bileşik sınıfı tarafından inhibe edilmesini sağlamaktadır.



Şekil 7. CA izoenzimlerinin aktif bölgesinin şematik gösterimi.

CA inhibitörleri doğrudan çinkoya bağlanarak, çinko iyonuna bağlı hidroksit iyonuna bağlanarak, aktif bölge girişindeki amino asitlerle etkileşip aktif bölge girişini kapatarak ya da aktif bölgenin dışına dışına bağlanıp konformasyonu değiştirerek etki gösterirler [33].

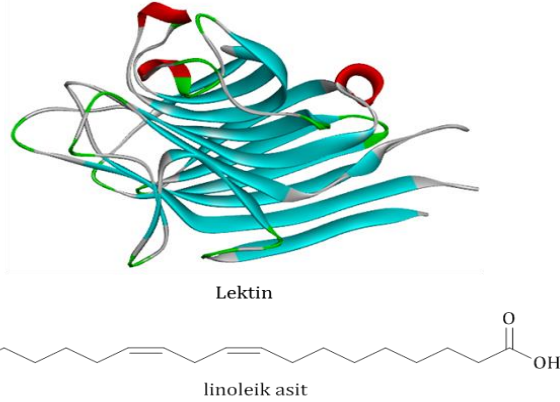
Çalışmada kullanılan bileşikler olan β -D-glukan, lektin, linoleik asit ve β -karoten bileşiklerinin hCA I ve hCA II' nin hidrataz aktiviteleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, β -D-glukan ve β -karoten bileşiklerinin inhibisyon etkisi göstermediği, lektin ve linoleik asit bileşiklerinin ise hidrataz aktivitesini inhibe ettikleri görülmektedir. β -D-glukan molekülünün yapısı incelendiğinde bir polisakkarit olduğu görülmektedir (Şekil 8). Yapısındaki -OH gruplarından dolayı, β -D-glukan molekülünün, fenolik bileşiklerin CA inhibisyon mekanizması olan çinko iyonuna bağlı hidroksit iyonuna bağlanarak hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitelerini inhibe etmesi beklenirdi. İnhibisyon gözlenmemesi β -D-glukan molekülünün sterik etkisi ile açıklanabilir.



Şekil 8. β -D-glukan ve β -karoten molekülünün yapıları.

β -karoten molekülünün, aktif bölgedeki hidrofobik amino asitlerle etkileştiği, ancak bu etkileşimin hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitelerini inhibe edebilecek düzeyde olmadığı tahmin edilmektedir. hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktivitelerini inhibe etmesinden dolayı β -karoten bileşiğinin enzim ile etkileşmediğini söyleyemeyiz.

Çalışmada kullanılan lektin molekülü (fıstık), doğal hali 100.8 kDa molekül ağırlığında olan tetramerik yapıdaki bir proteindir. Çalışmamızda kullanılan şekli ise 25.2 kDa ağırlığındaki monomeridir (Şekil 9). hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitelerini inhibe eden lektin molekülünün, bu izoenzimlerinin aktif bölge girişini kapatarak inhibisyon etkisi gösterdiği düşünülmektedir. Kontrol bileşiği olan AAZ bileşiğine göre zayıf inhibisyon göstermekle beraber, lektin molekülü kayda değer bir inhibisyon etkisine sahiptir.



Şekil 9. Lektin (PDB: 2PEL) ve linoleik asit molekül-lerinin yapıları.

Linoleik asit bileşiği de lektin molekülüne göre zayıf olmakla beraber, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitelerini inhibe etmiştir. Linoleik asidin hCA I ve hCA II ile etkileşme şeklinin, -COOH grubunun çinko iyonuna bağlı hidroksit grubu ile etkileşip, hidrofobik kuyruğunun ise aktif bölgedeki hidrofobik amino asitlerle etkileşerek veya -COOH grubunun aktif bölgenin hidrofilik kısmındaki amino asitlerle etkileşip, hidrofobik kuyruğunun ise aktif bölgedeki hidrofobik amino asitlerle etkileşmek suretiyle olduğu tahmin edilmektedir.

Bileşiklerin hCA I ve hCA II esteraz aktiviteleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, β -D-glukan molekülünün inhibisyon etkisi göstermediği görülmektedir. Bu durum hidrataz aktivitesi inhibisyonuna benzer şekilde, sterik etkilerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Linoleik asit bileşiği ise, hCA I ve hCA II esteraz aktivitesi üzerinde önemli derecede inhibitör etki göstermiştir. Tablo 2 incelendiğinde, linoleik asidin hCA I üzerindeki inhibisyon etkisinin, AAZ bileşiğinin inhibisyon etkisine yakın bir düzeyde olduğu görülmektedir. Lektin molekülünün, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon şiddetinin,

aynı izoenzimlerin hidrataz aktiviteleri üzerinde gösterdiği inhibisyon şiddetine yakın olduğu görülmektedir. β -karoten bileşiği ise, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin hidrataz aktivitelerini inhibe etmediği halde, esteraz aktivitelerini inhibe etmiştir. β -karoten molekülünün hidrofobik yapısından dolayı, hCA I ve hCA II izoenzimlerinin aktif bölgelerindeki hidrofobik amino asitlerle etkileşime girdiği ve bu etkileşimin, izoenzimlerin esteraz aktivitelerini yavaşlatıcı yönde etki gösterdiği düşünülmektedir.

Bileşiklerin K_i inhibisyon sabitlerinin belirlenmesi için yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda, hCA I ve hCA II esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren tüm bileşiklerin yarışmasız inhibisyon mekanizması üzerinden etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer araştırma grupları tarafından, bazı doğal bileşiklerin CA izoenzimlerine etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur. *p*-kumarik asit, kafeik asit, gallik asit, kuersetin, ellajik asit, kurkumin ve silmarin gibi fenolik bileşiklerin inhibisyon etkilerinin incelendiği çalışmalarda bu moleküllerin K_i değerlerinin ortalama 2.0 μ M civarında seyrettiği görülmektedir [23, 34, 35]. Kumarin bileşiğinin CA izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, bu bileşiğin hCA I için K_i değerinin 3.1 μ M, hCA II için K_i değerinin 9.2 μ M olduğu belirlenmiştir [36]. Carta vd. [37] tarafından, doğal kaynaklı poliamin bileşikler olan spermin ve spermidin bileşiklerinin CA izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerinin incelendiği bir çalışmada spermin bileşiğinin zayıf inhibisyon etkisi gösterdiği, spermidin bileşiğinin ise hCA I için K_i değerinin 1.40 μ M, hCA II için K_i değerinin 1.11 μ M olduğu bulunmuştur. Bir flavonoid türevidir olan taksifolin (dihidrokuersetin) bileşiğinin ise kuersetin bileşiğinden çok daha güçlü CA inhibitörü olduğu bulunmuştur [38].

Mevcut çalışma kapsamında, hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde etkisi incelenen moleküllerin inhibisyon potansiyellerinin, daha önce çalışılmış olan ve bir kısmı yukarıda özetlenen bileşiklerin büyük çoğunluğunun inhibisyon potansiyelleri ile kıyaslanabilir büyüklükte olduğu görülmektedir. Öte yandan bu çalışmada gözlemlenen inhibisyon potansiyelleri pek çok sentetik bileşiğin inhibisyon potansiyeli ile yakın seviyededir. Dolayısıyla bu çalışma kapsamındaki bileşiklerin, glokom tedavisi araştırmalarında daha ileri çalışmalar olan *in vivo* çalışmalarda kullanılabilecek potansiyelde oldukları açıkça ortadadır.

Teşekkür

Desteklerinden dolayı Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimizi sunarız (Proje No: 2010/8).

Kaynakça

- [1] Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H. 2007. Effects of dietary β -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22, 394-402.
- [2] Tiwari, U., Cummins, E. 2011. Meta-analysis of the effect of β -glucan intake on blood cholesterol and glucose levels. *Nutrition*, 27, 1008-1016.
- [3] Dietrich-Muszalska, A., Olas, B., Kontek, B., Rabe-Jabłońska, J. 2011. Beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* reduces plasma lipid peroxidation induced by haloperidol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 113-116.
- [4] Bellande, K., Bono, J. J., Savelli, B., Jamet, E., Canut, H. 2017. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense outside?. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1164.
- [5] Zheng, S., Li, C., Ng, B. T., Wang, H. X. 2007. A lectin with mitogenic activity from edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochemistry*, 42, 1620-1624.
- [6] Li, Y. R., Liu, Q. H., Wang, H. X., Ng, T. B. 2008. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the mushroom *Pleurotus citrinopleatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, 51-57.
- [7] Dulińska, J., Gil, D., Zagajewski, J., Hartwich, J., Bodzioch, M., Dembińska-Kieć, A., Langmann, T., Schmitz, G., Laidler, P. 2005. Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740, 189-201.
- [8] Qiu, D., Chen, Z. R., Li, H. R. 2009. Effect of heating on solid β -carotene. *Food Chemistry*, 112, 344-349.
- [9] Naughton, S. S., Mathai, M. L., Hryciw, D. H., McAinch, A. J. 2016. Linoleic acid and pathogenesis of obesity. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 125, 90-99.
- [10] Jung, S., Han, B. H., Nam, K., Ahn, D. U., Lee, J. H., Jo, C. 2011. Effect of dietary supplementation of gallic acid and linoleic acid mixture or their synthetic salt on egg quality. *Food Chemistry*, 129(3), 822-829.
- [11] Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., De Simone, G. 2012. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrase: How to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *Chemical Reviews*, 112, 4421-4468.

- [12] Supuran, C. T. 2008. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 168-181.
- [13] Kikutani, S., Nakajima, K., Nagasato, C., Tsuji, Y., Miyatake, A., Matsuda, Y. 2016. Thylakoid luminal θ -carbonic anhydrase critical for growth and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 9828-9833.
- [14] Winum, J. Y., Vullo, D., Casini, A., Montero, J. L., Scozzafava, A., Supuran, C. T. 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane tumor associated isozyme IX with sulfamates including EMATE also acting as steroid sulfatase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 2197-2204.
- [15] Şentürk, M., Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Küfrevioğlu, Ö. İ., Supuran C. T. 2011. *In vitro* inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology and Drug Design*, 77, 494-499.
- [16] Sarıkaya, S. B. Ö., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, İ., Supuran, C. T. 2011. *In vitro* inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 4259-4262.
- [17] Yenikaya, C., İlkimen, H., Demirel, M. M., Ceyhan, B., Bülbül, M., Tunca, E. 2016. Preparation of two maleic acid sulfonamide salts and their copper(II) complexes and antiglaucoma activity studies. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 27(10), 1706-1714.
- [18] Scozzafava, A., Banciu, M. D., Popescu, A., Supuran, C. T. 2000. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of isoenzymes I, II and IV by sulfonamide and sulfamic acid derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 15, 443-453.
- [19] Schuman, J. S. 2000. Antiglaucoma medications: a review of safety and tolerability issues related to their use. *Clinical Therapeutics*, 22, 167-208.
- [20] Brzozowski, Z., Sławiński, J., Innocenti, A., Supuran, C. T. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Regioselective synthesis of novel 1-substituted 1,4-dihydro-4-oxo-3-pyridinesulfonamides and their inhibition of human cytosolic isozymes I and II and transmembrane cancer-associated isozymes IX and XII. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 3656-3661.
- [21] Balaydın, H. T., Şentürk M., Göksu, S., Menzek A. 2012. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel bromophenols and their derivatives including natural products: Vidalol B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 54, 423-428.
- [22] Supuran, C. T. 2011. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Molecular Diversity*, 15, 305-316.
- [23] Innocenti, A., Sarıkaya, S. B. Ö., Gülçin, İ., Supuran, C. T. 2010. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of natural product polyphenols and phenolic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 2159-2164.
- [24] Sarıkaya, S. B. Ö., Gülçin, İ., Supuran, C. T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of phenolic acids. *Chemical Biology and Drug Design*, 75, 515-520.
- [25] Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A., Gibbons, B. H., Edsall, J. T. 1964. Carbonic anhydrases from human erythrocytes. Preparation and properties of two enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 239, 1065-1078.
- [26] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [27] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [28] Wilbur, K. M., Anderson, N. G. 1948. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 176, 147-154.
- [29] Maren, T. H. 1960. A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130, 26-29.
- [30] Verpoorte, J. A., Mehta, S., Edsall, J. T. 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242, 4221-4229.
- [31] Lineweaver, H., Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658-666.
- [32] Topal, M. Gülçin, İ. 2014. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitör. *Turkish Journal of Chemistry*, 38, 894-902.
- [33] Supuran, C. T. 2016. Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal* 473, 2023-2032.
- [34] Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A. Supuran, C. T. 2008. Carbonic anhydrase inhibitors. Interactions of phenols with the 12 catalytically active mammalian isoforms (CA I-XIV). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 1583-1587.

- [35] Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A. Supuran, C. T. 2008. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mammalian isoforms I-XIV with a series of substituted phenols including paracetamol and salicylic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 7424-7428.
- [36] Maresca, A., Supuran, C. T. 2010. Coumarins incorporating hydroxy and chloro moieties selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 4511-4514.
- [37] Carta, F., Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Kaila, K., Supuran, C. T. 2010. Polyamines inhibit carbonic anhydrases by anchoring to zinc-coordinated water molecule. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 5511-5522.
- [38] Gocer, H., Topal, F., Topal, M., Küçük, M., Teke, D., Gülçin, İ., Alwasel, S. H., Supuran, C. T. 2016. Acetylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibition profiles of taxifolin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 441-447.