

## Potansiyel karbonik anhidraz I ve II inhibitör keşfi: D-Penisilamin türevleri

*Discovery of potential carbonic anhydrase I and II inhibitors: D-Penicillamine derivatives*

Işıl Nihan KORKMAZ\* 

Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 25240, Erzurum

• Geliş tarihi / Received: 13.09.2023

• Kabul tarihi / Accepted: 27.12.2023

### Öz

Protein yapısına katılmayan bir aminoasit türevi olan penisilamin; bir karboksilik asit, bir tiyol ve aminden oluşan üç işlevli bir organik moleküldür. Başta Wilson hastalığı olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan D-Penisilamin (PEN-1), N-Asetil-D-Penisilamin (PEN-2) ve D-Penisilamin disülfid (PEN-3) *in vitro* koşullarda karbonik anhidraz I ve II (hCA I, hCA II) izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. İnsan eritrosit hücrelerinden hCA I, hCA II enzimleri izole edildi. Saflaştırılan her iki enzimin D-Penisilamin ve türevleri tarafından etkili bir şekilde inhibe edildiği belirlendi. PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin  $IC_{50}$  değerleri hCA I için sırasıyla 387.21; 407.49 ve 106.75  $\mu M$ , hCA II için sırasıyla 563.72; 364.87 ve 136.91  $\mu M$  olarak hesaplandı. Bütün moleküller için inhibisyon tipi her iki enzimde de yarışmalı inhibisyon olarak belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** Afinite kromatografisi, İnhibisyon, Karbonik anhidraz, Penisilamin

### Abstract

*Penicillamine, an amino acid derivative that does not participate in the protein structure, is a trifunctional organic molecule composed of a carboxylic acid, a thiol, and an amine. D-Penicillamine (PEN-1), N-Acetyl-D-Penicillamine (PEN-2) and D Penicillamine disulfide (PEN-3), which are used in the treatment of many diseases, especially Wilson's disease, are produced by carbonic anhydrase I and II (hCA I) *in vitro*. Inhibition effects on hCA II isoenzymes were investigated. hCA I, hCA II enzymes were isolated from human erythrocyte cells. It was determined that PEN-1, PEN-2, and PEN-3 effectively inhibited both purified enzymes. The  $IC_{50}$  values of PEN-1, PEN-2, and PEN-3 molecules were calculated to be 387.21, 407.49, and 106.75  $\mu M$  for hCA I, 563.72 364.87, and 136.91  $\mu M$  for hCA II, respectively. The inhibition type for all molecules was determined as competitive inhibition in both enzymes.*

**Keywords:** Affinity chromatography, Inhibition, Carbonic anhydrase, Penicillamine

\* Işıl Nihan KORKMAZ; isil.krkmz@gmail.com

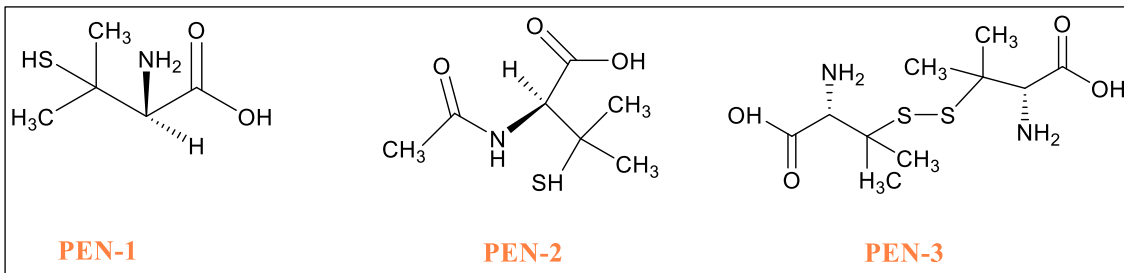
## 1. Giriş

### 1. Introduction

Metaloenzim ailesinin bir üyesi olan karbonik anhidrazlar (E.C. 4.2.1.1., CA), tüm prokaryotik ve ökaryotik yaşam krallıklarında pH düzenleyici bir enzim olarak görev yapmaktadır (Bibi et al., 2019).  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  ve  $\theta$  CA'lar 7 değişik genetik familyaya ayrıldığı bilinmektedir. Algler, yeşil bitkiler, protozoalar, omurgalılar ve bazı bakteriler gibi birçok organizmada bulunan  $\alpha$ -CA'lar, dünyada üzerinde en çok çalışılan CA ailesidir (Karioti et al., 2016). Şimdiye kadar, katalitik aktivite, farklı inhibitör sınıflarına duyarlılık ve hücre altı lokalizasyon (sitozolik, zara bağlı, mitokondriyal ve tükürük salgısı) açısından 16  $\alpha$ -CA izozimleri tanımlanmıştır (Akbaba & Kalin, 2022). CA'lar, bir metal hidroksit nükleofilik mekanizma yoluyla CO<sub>2</sub>'yi (karbon dioksit) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>e (bikarbonat) ve H<sup>+</sup>ya (proton) geri dönüşümlü olarak hidratlar (Gulcin & Beydemir, 2013). Ayrıca bu izozimler, kemik rezorpsiyonu, sıvı dengesi, kalsifikasyon, ödem, osteoporoz, glokom, tümör üretimi, pH regülasyonu, kanser, karboksilasyon reaksiyonları ve epilepsi gibi birçok metabolik süreçte çok önemli bir rol oynar (Kazancı et al., 2021).

Penisilamin, bir tiyol grubu içeren proteinojenik olmayan bir amino asittir. Bir amin, bir tiyol ve bir karboksilik asitten oluşan penisilamin, üç işlevli bir organik bileşiktir. Yapısında bulundurduğu bu üç fonksiyonel grup yardımıyla özel birçok kimyasal tepkime gerçekleştirebilmektedir (Bhushan & Kumar, 2010). Yapısal olarak sisteine çok benzer bir amino asittir. Aralarındaki tek fark tiyole bağlı olan iki adet dimetil grubudur. Birçok amino asitte olduğu gibi, fizyolojik pH'da zwitter iyonik formda bulunan renksiz bir katı moleküldür (Munro & Capell, 1997). Şelatlayıcı bir ajan özelliğine sahip olan D-penisilamin klinik olarak uzun süredir Wilson hastalığı, ağır metal zehirlenmesi, sistinüri ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır (Chong & Auld, 2000). Diğer bir metal şelatlama özelliğine sahip molekül olan N-Asetil-D-penisilamin, D-penisilaminin asetilenmiş analogudur. Yüksek şelatlama kapasitesinden dolayı klinik olarak metal zehirlenmelerine karşı panzehir olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Chipiso et al., 2019). Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklara sebep olan en önemli etkilerden bir tanesi de ağır metal iyonlarının çevrede her yerde bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kark et al., 1971). Bu yüzden ağır metallerin toksikolojik etkilerini azaltmak veya tamamen ortadan kaldırmak için şelatlama kapasitesine sahip moleküller ile tedavi klinik olarak kullanılan yöntemler arasındadır. N-Asetil-D-penisilamin, özellikle cıva zehirlenmelerinde kullanılan bir şelatlayıcı ajandır (Budimir, 2011).

Sunulan bu çalışma ile, 30 yılı aşkın bir süredir özellikle romatoid artrit tedavisinde kullanılmakta olan PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin *in vitro* koşullarda hCA I ve hCA II enzimleri üzerindeki inhibisyon potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır (Şekil 1). Bu amaç kapsamında ilk önce hCA I, hCA II enzimleri insan kanından saf bir şekilde izole edilmiştir. Daha sonra ise gerçekleştirilen inhibisyon çalışmalarlarıyla ayrı ayrı bütün bileşik için IC<sub>50</sub>, K<sub>i</sub> değerleri ve inhibisyon tipleri tespit edildi.



Şekil 1. Moleküllerin kimyasal yapıları

Figure 1. Chemical structures of molecules

## 2. Materyal ve metot

### 2. Material and method

#### 2.1. Kimyasallar

##### 2.1. Chemicals

Enzim kaynağı olarak Erzurum Türk Kızılay'ından temin edilen eritrosit peletleri kullanıldı. Saflaştırma, biyolojik aktivite, elektroforez için kullanılan tüm kimyasallar ve analitik reaktifler ile PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 Sigma-Aldrich ve Merck KGaA'dan temin edildi.

## 2.2. hCA aktivitesinin ölçümü

### 2.2. Measurement of hCA activity

PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin hCA I, hCA II üzerindeki potansiyel inhibisyon etkileri, Verpoorte ve ark. tarafından hCA'lar için sunulan aktivite yöntemiyle (348 nm) spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Verpoorte et al., 1967).

## 2.3. hCA'nın saflaştırılması

### 2.3. Purification of hCA

hCA I-II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinden izole edildi. Önceki çalışmalarda açıklandığı gibi saflaştırma, CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B için ligand olarak sülfanilamidin kullanıldığı bir afinite kolonu ile gerçekleştirildi (Adem et al., 2019).

## 2.4. SDS-PAGE

### 2.4. SDS-PAGE

Eritrosit hücrelerinden izole edilen hCA I-II enzimlerinin saflığını belirlemek için daha önce yapılan çalışmalarda daha detaylı bir şekilde anlatılan Laemmli prosedürüne göre SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) gerçekleştirildi (Laemmli, 1970).

## 2.5. İnhibisyon çalışması

### 2.5. Inhibition study

IC<sub>50</sub> değerlerini elde etmek için hCA I-II'ye yönelik ayrı ayrı aktiviteler 5 farklı inhibitör (PEN-1, PEN-2 ve PEN-3) konsantrasyonunda ölçüldü. Çizilen % Aktivite-Konsantrasyon grafiklerinden IC<sub>50</sub> değerleri belirlendi. Daha sonra inhibisyon tiplerini ve K<sub>i</sub> değerlerini belirlemek için 5 farklı substrat (p-Nitrofenil asetat (p-NPA) konsantrasyonu ve 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapılmıştır. İnhibisyon tipleri ve K<sub>i</sub> değerleri, ayrı ayrı çizilen 1/V'ye karşı 1/[S] grafiklerinden belirlendi.

## 3. Bulgular ve tartışma

### 3. Results and discussion

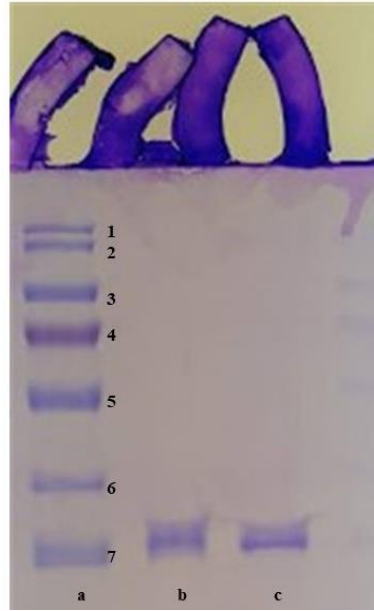
Enzimler, farklı biyokimyasal reaksiyonlarda yer alan biyolojik katalizörlerdir. Ancak bu biyomoleküllerin aşırı aktivasyonu hastalığa neden olabilir, bu nedenle mevcut klinik uygulamada enzimlerin farklı inhibitörleri tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Enzimler genellikle ilaç geliştirmede ana hedef olarak kullanılır. Enzimler için uygun inhibitörler tasarlanarak potansiyel ilaçlara dönüştürülebilir. Yapılan çalışmalarda doğru ilacın ortaya çıkması için inhibisyon tipinin ve inhibisyon gücünün doğru belirlenmesi çok önemlidir (Jonsson & Liljas, 2020).

Canlıların birçoğunda bulunan ve metalloenzimlerin bir grubu olan CA'lar, glukoneojenez, lipogenez, ürejeniz, tümörjenite ve çeşitli patojenlerin büyümesi ve virülansı dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte yer alır. CA inhibitörlerinin; antiglokomlar ve diüretik ilaçların yerleşik rolüne ilave, son yıllarda CA'ların yeni anti-enfektif, anti-obezite ve antikanser ilaç potansiyeline sahip olma ihtimalleri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Bibi et al., 2019). Uzun yıllardır klinik olarak kullanılan karbonik anhidraz inhibitörleri, inflamasyon, nörolojik bozukluklar, epilepsi, hipoksik tümörler, glokom, obezite, artrit, kanser, hemolitik anemi ve diş çürüğü gibi birçok hastalığın tedavisinde potansiyel terapötik ilaçlardır (Supuran, 2020). Diklorofenamid, asetazolamid, dorzolamid, fentermin, sulpirid, metazolamid, sulthiam, brinzolamid, zonisamid, indisulam, topiramet ve etokszolamid molekülleri klinikte kullanılan karbonik anhidraz inhibitörlerinden bazılarıdır (Kumar et al., 2020).

Penisilamin, D- (veya S) ve L- (veya R) olmak üzere iki enantiyomerik formu bulunur. Birçok ilaçta olduğu gibi iki stereoizomerin toksikolojik etkileri önemli ölçüde farklılık göstermektedir. L-Penisilaminin aşırı toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak D-Penisilaminde böyle bir durum söz konusu olmadığı için klinik olarak D formu kullanılmaktadır. Bu nedenle, Penisilaminin enantiyomerik saflığının değerlendirilmesi, özellikle farmasötik preparasyonlar için tasarlandığında, son derece önemlidir. D-Penisilamin terapötik amaçlar için dikkatli bir şekilde tıbbi gözetim altında kullanılabilirken, L- Penisilamin veya rasemat

karışımların yüksek toksisitesi sebebiyle klinik olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Bu bağlamda D-Penisilamin; bebeklerde retina hastalığı önlenmesi, klinikte hepatit ve romatoid artrit, tedavisinde kullanılmıştır (Bhushan & Kumar, 2010; Friedman, 2004; Kean et al., 1991; Phelps et al., 2000).

Literatürde, D-penisilamin veya türevleri ile ilgili yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde bu moleküllerin saf enzimlerdeki inhibisyon potansiyellerini belirlemeye yönelik yapılmış çok fazla çalışma olmadığı görülebilmektedir. Bu yüzden literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin insan eritrositlerinden saflaştırılmış olan hCA I-II enzimleri üzerine inhibisyon etkileri belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında ilk önce, insan eritrosit hücrelerinden hCA I- II enzimleri ligandı sülfanilamit bileşiği olan bir afinite kromatografisi tekniği kullanılarak tek kademede yüksek saflıkta izole edildi. hCA I, hCA II enzimlerinin saflıkları gerçekleştirilen SDS-PAGE ile teyit edildi (Şekil 2).



**Şekil 2.** SDS-PAGE fotoğrafı. a: Standartlar (1: 170 kDa 2: 130 kDa 3: 100 kDa, 4: 70 kDa 5: 55 kDa 6: 40 kDa 7: 35kDa), b: hCA I, c: hCA II

**Figure 2.** SDS-PAGE photo. Standards (1: 170 kDa 2: 130 kDa 3: 100 kDa, 4: 70 kDa 5: 55 kDa 6: 40 kDa 7: 35kDa), b: hCA I, c: hCA II

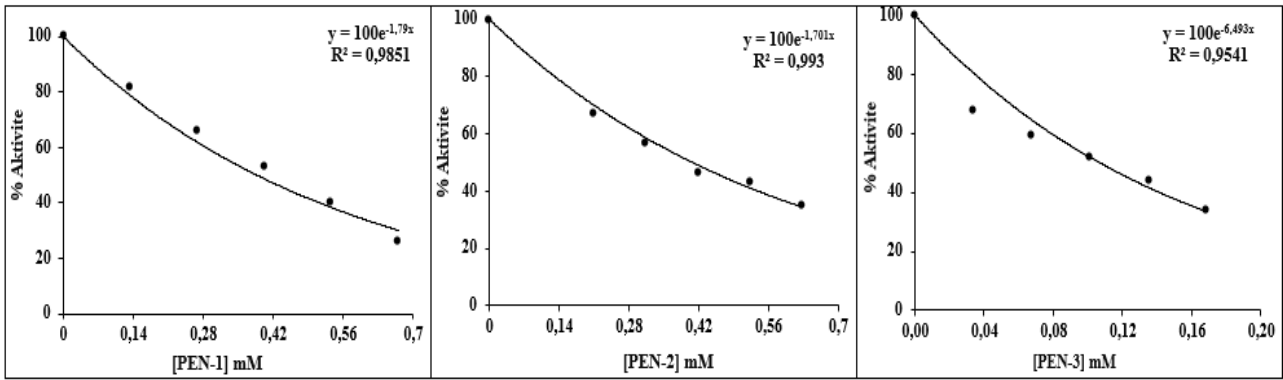
Özellikle hemolitik anemi hastalığı ile ilişkili sitozolik bir izoform olan hCA-I enzimi için D-Penisilamin ve türevlerinin inhibisyon parametreleri ( $IC_{50}$ ,  $K_i$  ve inhibisyon tipleri) belirlendi (Tablo 1).

**Tablo 1.** PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin hCA I-II enzime karşı enzim inhibisyon sonuçları.  
**Table 1.** Enzyme inhibition results of PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 molecules against hCA I-II enzyme.

Molekül	hCA I			hCA II		
	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$K_i$ ( $\mu M$ )	İnhibisyon tipi	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$K_i$ ( $\mu M$ )	İnhibisyon tipi
PEN-1	387.21	226.38±24.79	Yarışmalı	563.72	417.88±45.71	Yarışmalı
PEN-2	407.49	193.21±52.89	Yarışmalı	364.87	106.19±13.83	Yarışmalı
PEN-3	106.75	112.52±9.655	Yarışmalı	136.91	69.944±14.44	Yarışmalı
AZA *	0.68	0.71±0.004	Yarışmasız	0.261	0.231±0.002	Yarışmasız

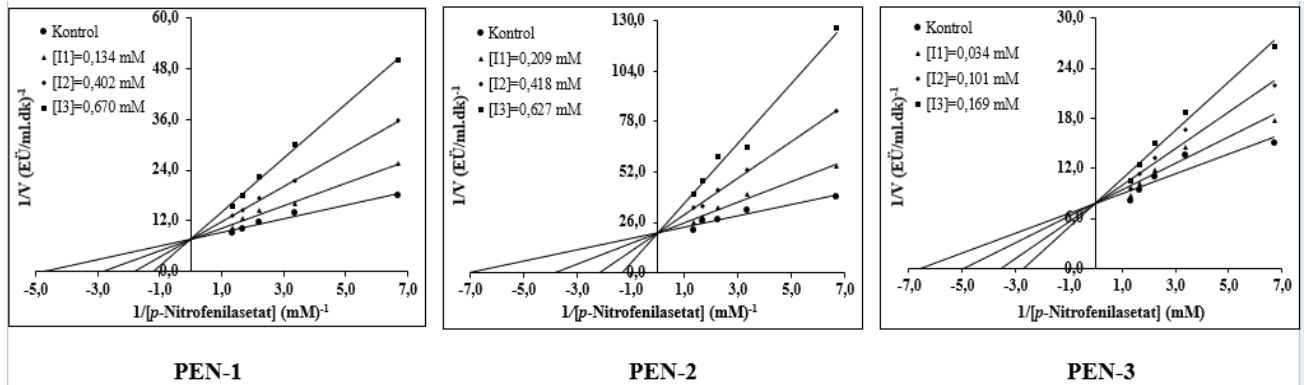
\* Korkmaz, (2023)

Aktivite ölçümleri sonucunda çizilin %Aktivite-[İnhibitör] grafiklerinden (Şekil 3)  $IC_{50}$  değerleri PEN-1 için 387.21  $\mu M$ , PEN-2 için 407.49  $\mu M$  ve PEN-3 için 106.75  $\mu M$  olarak belirlendi.

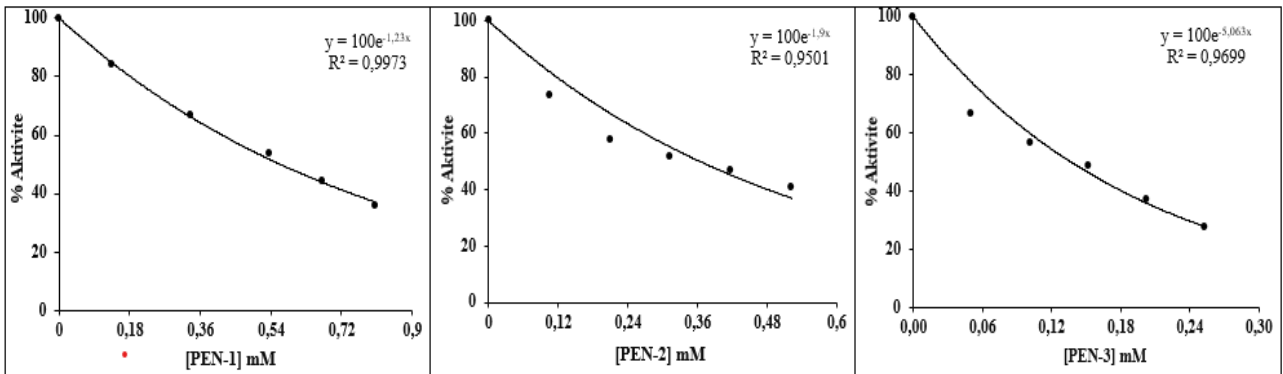


**Şekil 3.** PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin hCA I için  $IC_{50}$  değerleri  
**Figure 3.**  $IC_{50}$  values for hCA I-II of molecules PEN-1, PEN-2 and PEN-3

PEN-1 ve türevlerinin inhibisyon sabitleri ( $K_i$ ), Lineweaver-Burk grafikleri vasıtasıyla hesaplandı (Şekil 4). Bu sabitler, PEN-1 için  $226.38 \pm 24.79 \mu\text{M}$ , PEN-2 için  $193.21 \pm 52.89 \mu\text{M}$  ve PEN-3 için  $112.52 \pm 9.655 \mu\text{M}$  olarak hesaplandı. hCA I için standart madde olan asetozolamid (AZA)  $K$  değeri  $0.71 \pm 0.004 \mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Çalıştığımız maddeler AZA' dan daha fazla etki göstermemiştir. Bütün penisilamin bileşikleri için inhibisyon türü yarışmalı inhibisyon olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre tüm moleküllerin hCA I enzimini  $\mu\text{M}$  seviyesinde etkili bir şekilde inhibe ettiği, PEN-3 molekülünün ise bunlar arasında hCA I'e karşı en etkili inhibisyon potansiyeline sahip molekül olduğu saptanmıştır.



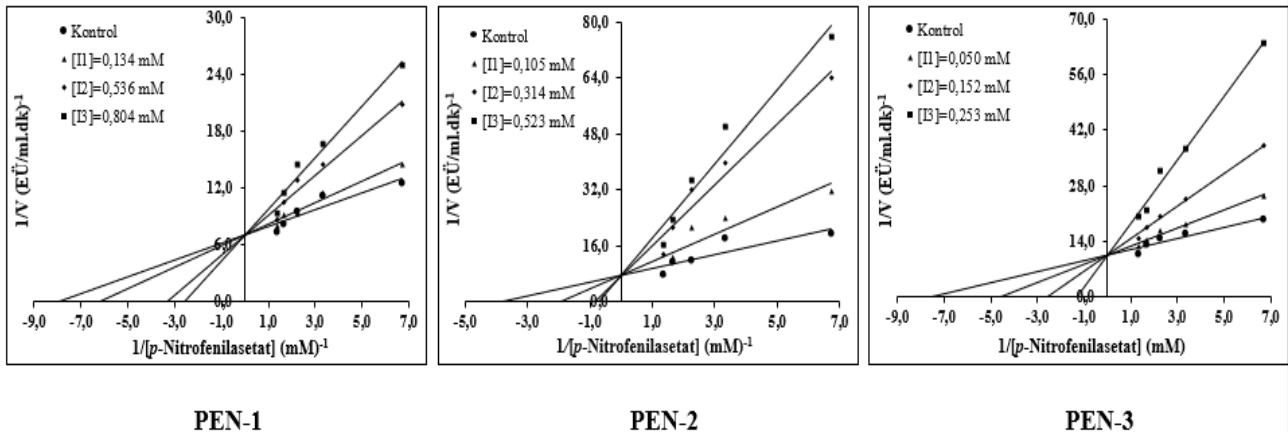
**Şekil 4.** hCA I enziminin PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 molekülleri için  $1/V$  ve  $1/[S]$  grafikleri (PEN-1, PEN-2, PEN-3)  
**Figure 4.**  $1/V$  and  $1/[S]$  graphs for hCA I enzyme's PEN-1, PEN-2 and PEN-3 molecules (PEN-1, PEN-2, PEN-3)



**Şekil 5.** PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin hCA II için  $IC_{50}$  değerleri  
**Figure 5.**  $IC_{50}$  values for hCA II of molecules PEN-1, PEN-2 and PEN-3

Diğer bir sitozolik izozim olan hCA II, başta glokom olmak üzere renal tübüler asidoz, ödem, osteoporoz, epilepsi ve irtifa hastalığı gibi çeşitli hastalıklarda hayati bir rol oynamaktadır. D-Penisilamin ve türevlerinin hCA II üzerindeki inhibisyon sonuçları tablo 1'de özetlenmiştir. Tablodan da görülebileceği gibi aktivite ölçümleri sonucunda çizilin %Aktivite-[Inhibitör] grafiklerinden (Şekil 5) hCA II enzimi için  $IC_{50}$  değerleri PEN-1 için 563.72  $\mu$ M, PEN-2 için 364.87  $\mu$ M ve PEN-3 için 136.91  $\mu$ M olarak belirlendi.

hCA için yapılan çalışmalar sonucunda çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinden (Şekil 6)  $K_i$  sabitleri PEN-1 için 417.88 $\pm$ 45.71  $\mu$ M, PEN-2 için 106.19 $\pm$ 13.83  $\mu$ M ve PEN-3 için 69.944 $\pm$ 14.44  $\mu$ M olarak hesaplandı. hCA II için standart madde olan AZA  $K_i$  0.231 $\pm$ 0.002  $\mu$ M olarak belirlenmiştir. Çalıştığımız maddeler AZA'dan daha fazla etk, göstermemiştir. hCA I enziminde elde edilen sonuçlara benzer bir şekilde bütün bileşikler için inhibisyon türü yarışmalı inhibisyon olarak belirlendi. Aynı şekilde tüm penisilamin molekülleri hCA II enzimini  $\mu$ M seviyesinde etkili bir şekilde inhibe ettiği, PEN-3 molekülü ise bunlar arasında hCA II 'ye karşı en etkili inhibisyon potansiyeline sahip molekül olduğu saptanmıştır.



**Şekil 6.** hCA II enziminin PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 molekülleri için 1/V ve 1/[S] grafikleri (PEN-1, PEN-2, PEN-3)

**Figure 6.** 1/V and 1/[S] graphs for hCA II enzyme's PEN-1, PEN-2 and PEN-3 molecules (PEN-1, PEN-2, PEN-3)

hCA I-II üzerine literatürde yapılmış olan çalışmalara bakıldığı zaman özellikle yeni sentezlenmiş bir çok molekülün inhibisyon parametrelerinin belirlendiği görülmektedir. Bu çalışmalarda, benziliden malononitril türevleri, azido sülfonil karbamat türevleri, tiyofen bazlı sülfonamidler, 2-aminoindan  $\beta$ -laktam türevleri, 1-aminoindanlardan ve anilinlerden türetilen sülfamidler, aminotetralinlerin ve aminoindanların sülfonamid türevleri, benzilsülfamidler, bromofenol türevleri, sülfamid türevleri, fenolik bileşikler, yeni norbomen ile kaynaşmış piridazinler ve pirazolin türevleri gibi birçok sentezlenmiş molekülün hCA I-II enzimlerini etkili bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Akbaba et al., 2013; Akbaba, Akıncioğlu, et al., 2014; Akbaba, Bastem, et al., 2014; Alm et al., 2020; Genç et al., 2016; Güller, Atmaca, et al., 2021; Güller, Dağalan, et al., 2021; Kocak et al., 2016; Köksal et al., 2019; Kucukoglu et al., 2016). Özellikle organik sentez yapan akademisyenler bu enzimlerin inhibisyonunu hedefleyen moleküllerin dizaynını ve sentezini gerçekleştirmektedir.

Literatürde yeni sentezlenmiş moleküllerin hCA I-II enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini belirlemeye yönelik birçok çalışma olmasının yanı sıra bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda bulunmaktadır. Durmaz tarafından yapılan bir çalışmada interferon beta-1a (IFN $\beta$ -1a) ilacının insan eritrosit hCA I-II enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma ile hCA I enzimi için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  sırasıyla 1.73 ve 0.78  $\pm$  0.21  $\mu$ M olarak hCA II izoenzimi için ise 1.33  $\mu$ M ve 1.46 $\pm$ 0.13  $\mu$ M olarak belirlendiği bildirilmiştir (Durmaz, 2022). Diğer bir çalışmada ise, Argan ve arkadaşları kardiyak ilaçların hCA I ve II enzimleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır.  $IC_{50}$  değerleri, % aktivite- [I] grafiklerinden hesaplanmıştır. En güçlü inhibisyonu Atropin Sülfat (hCA I: 5.86 mM ve hCAI I: 6.59 mM) molekülü gösterdiğini belirlemiştir. Norepinefrin Tartrat (hCA I: 460 mM ve hCA II: 844.45 mM) ise bu moleküller arasında en düşük inhibisyon potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (Argan et al., 2022).

PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 moleküllerinin enzim inhibisyonları üzerine yapılmış olan bir çalışmada Özyürek ve arkadaşları sığır sütünden saflaştırılan laktoperoksidaz (LPO) enzimi üzerine bu moleküllerin inhibisyon

parametrelerini belirlemiştir. Yapılan çalışma kapsamında LPO için IC<sub>50</sub> değerleri PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 bileşikleri için sırasıyla 0.584, 0.552 ve 0.207 µM olarak K<sub>i</sub> değerleri ise sırasıyla 1.422±0.288, 1.061±0.462 ve 0.136±0.069 µM olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon türleri ise PEN-2 molekülü için yarışmasız iken PEN-1 ve PEN-3 molekülleri için yarışmalı inhibisyon gösterdiği rapor edilmiştir (Özyürek et al., 2020). Sunulan bu makale kapsamında elde edilen sonuçların önceki yapılan çalışmayla hemen hemen benzer sonuçlar gösterdiği görülmektedir.

#### 4. Sonuçlar

##### 4. Conclusions

Sonuç olarak hCA I-II enzimleri öncelikle insan eritrosit hücrelerinden izole edildi. İkinci aşamada ise *in vitro* şartlarda PEN-1, PEN-2 ve PEN-3 molekülleri hCA I-II enzimlerini µM seviyelerde inhibe ettiği belirlendi. İnhibisyon sonuçlarına göre en iyi inhibisyon etkisi gösteren molekül hem hCA I için (IC<sub>50</sub>:106.75; K<sub>i</sub>: 112.52±9.655 µM) hem de hCA II için (IC<sub>50</sub>:136.91; K<sub>i</sub>: 69.944±14.44 µM) PEN-3 molekülü olduğu bulundu. Sonuçlara göre, ileri seviyede *in vivo* ve toksisite çalışmaları ile desteklendikten sonra D-Penisilamin ve türevlerinin CA izozimleri için retina patolojisi, glokom, epilepsi ve beyin ödemi gibi birçok hastalığın tedavisinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.

#### Yazar katkısı

##### Author contribution

The manuscript was written by the corresponding author.

#### Etik beyanı

##### Declaration of ethical code

The author declares that the materials and methods used in this study do not require ethical committee approval or legal-specific permission.

#### Çıkar çatışması beyanı

##### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Kaynaklar

##### References

- Adem, S., Akkemik, E., Aksit, H., Guller, P., Tüfekci, A. R., Demirtas, İ., & Ciftci, M. (2019). Activation and inhibition effects of some natural products on human cytosolic CAI and CAII. *Medicinal Chemistry Research*, 28, 711-722.
- Akbaba, Y., Akıncioğlu, A., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., & Supuran, C. T. (2014). Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel sulfonamide derivatives of aminoindanes and aminotetralins. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(1), 35-42.
- Akbaba, Y., Balaydın, H. T., Menzek, A., Göksu, S., Şahin, E., & Ekinci, D. (2013). Synthesis and biological evaluation of novel bromophenol derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 346(6), 447-454.
- Akbaba, Y., Bastem, E., Topal, F., Gülçin, İ., Maraş, A., & Göksu, S. (2014). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory effects of novel sulfamides derived from 1-aminoindanes and anilines. *Archiv der Pharmazie*, 347(12), 950-957.
- Akbaba, Y., & Kalin, R. (2022). Design, synthesis, biological evaluation, and *in silico* study of novel urea derivatives as inhibitors of carbonic anhydrase and acetylcholine esterase. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia*, 67(2).
- Alım, Z., Köksal, Z., & Karaman, M. (2020). Evaluation of some thiophene-based sulfonamides as potent inhibitors of carbonic anhydrase I and II isoenzymes isolated from human erythrocytes by kinetic and molecular modelling studies. *Pharmacological Reports*, 72, 1738-1748.
- Argan, O., Çıkrıkçı, K., & Gencer, N. (2022). Sıvı kardiyak ilaçların karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(2), 545-554.

- Bhushan, R., & Kumar, R. (2010). Enantioresolution of dl-penicillamine. *Biomedical Chromatography*, 24(1), 66-82.
- Bibi, S., Javed, T., Alam, F., Ali, A., Ali, S., Ullah, M., Asad, H. Bin, Hassham, M., Hasan, F., & Muhammad, S. (2019). Therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2).
- Budimir, A. (2011). Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharmaceutica*, 61(1), 1-14.
- Chipiso, K., Duca, T., & Simoyia, R. H. (2019). Kinetics and mechanism of oxidation of N-acetyl-d-penicillamine in acidified iodate and aqueous iodine. *South African Journal of Chemistry*, 72, 1-9.
- Chong, C. R., & Auld, D. S. (2000). Inhibition of carboxypeptidase A by D-penicillamine: mechanism and implications for drug design. *Biochemistry*, 39(25), 7580-7588.
- Durmaz, L. (2022). İnterferon Beta-1a ilacının enzim inhibisyon etkilerinin incelenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 12(4), 2331-2339.
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385-406.
- Genç, H., Kalin, R., Köksal, Z., Sadeghian, N., Kocyigit, U. M., Zengin, M., ... & Özdemir, H. (2016). Discovery of potent carbonic anhydrase and acetylcholinesterase inhibitors: 2-aminoindan  $\beta$ -lactam derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1736.
- Gulcin, I., & Beydemir, S. (2013). Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(3), 408-430.
- Güller, P., Atmaca, U., Güller, U., Çalışır, U., & Dursun, F. (2021). Antibacterial properties and carbonic anhydrase inhibition profiles of azido sulfonyl carbamate derivatives. *Future Medicinal Chemistry*, 13(15), 1285-1299.
- Güller, P., Dağalan, Z., Güller, U., Çalışır, U., & Nişancı, B. (2021). Enzymes inhibition profiles and antibacterial activities of benzylidenemalononitrile derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1239, 130498.
- Jonsson, B. H., & Liljas, A. (2020). Perspectives on the classical enzyme carbonic anhydrase and the search for inhibitors. *Biophysical Journal*, 119(7), 1275-1280.
- Karioti, A., Carta, F., & Supuran, C. T. (2016). Phenols and polyphenols as carbonic anhydrase inhibitors. *Molecules*, 21(12), 1649.
- Kark, R. A. P., Poskanzer, D. C., Bullock, J. D., & Boylen, G. (1971). Mercury poisoning and its treatment with N-acetyl-D, L-penicillamine. *New England Journal of Medicine*, 285(1), 10-16.
- Kazancı, A., Gök, Y., Kaya, R., Aktaş, A., Taslimi, P., & Gülçin, İ. (2021). Synthesis, characterization and bioactivities of dative donor ligand N-heterocyclic carbene (NHC) precursors and their Ag (I) NHC coordination compounds. *Polyhedron*, 193, 114866.
- Kean, W. F., Howard-Lock, H. E., & Lock, C. J. L. (1991). Chirality in antirheumatic drugs. *The Lancet*, 338(8782-8783), 1565-1568.
- Kocak, R., Akın, E. T., Kalın, P., Talaz, O., Saracoglu, N., Dastan, A., Gülçin, İ., & Durdagi, S. (2016). Synthesis of some novel norbornene-fused pyridazines as potent inhibitors of carbonic anhydrase and acetylcholinesterase. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 53(6), 2049-2056.
- Korkmaz, I. N. (2023). 2-Amino thiazole derivatives as inhibitors of some metabolic enzymes: An in vitro and in silico study. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(2), 659-669.
- Köksal, Z., Alım, Z., Bayrak, S., Gülçin, İ., & Özdemir, H. (2019). Investigation of the effects of some sulfonamides on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(5), e22300.
- Kucukoglu, K., Oral, F., Aydin, T., Yamali, C., Algul, O., Sakagami, H., Gulcin, I., Supuran, C. T., & Gul, H. I. (2016). Synthesis, cytotoxicity and carbonic anhydrase inhibitory activities of new pyrazolines. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(sup4), 20-24.



- Kumar, S., Rulhania, S., Jaswal, S., & Monga, V. (2020). Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112923.
- Laemmli, D. K. (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head. *Nature*, 227, 680–683.
- Munro, R., & Capell, H. A. (1997). Penicillamine. *British Journal of Rheumatology*, 36(1), 104–109.
- Özyürek, İ., Kalın, R., & Özdemir, H. (2020). D-Penisilamin, D-Penisilamin disülfid ve N-Asetil-D-penisilamin'in Laktoperoksidaz Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(2), 1146–1153.
- Phelps, D. L., Lakatos, L., & Watts, J. L. (2000). D-Penicillamine for preventing retinopathy of prematurity in preterm infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2, CD001073–CD001073.
- Supuran, C. T. (2020). An update on drug interaction considerations in the therapeutic use of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 16(4), 297–307.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S., & Edsall, J. T. (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221–4229.