

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**



**YENİ TADALAFİL TÜREVLERİNİN BAZI İZOENZİMLER  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ZÜBEYDE SAÇKES**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2018**

**T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**



**YENİ TADALAFİL TÜREVLERİNİN BAZI İZOENZİMLER  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**ZÜBEYDE SAÇKES**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Tez Danışmanı)**

**Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU**

**Doç. Dr. Nahit GENÇER**

**Doç. Dr. Mustafa ZENGİN**

**Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Zübeyde SAÇKES tarafından hazırlanan “YENİ TADALAFİL TÜREVLERİNİN BAZI İZOENZİMLER ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 23.02.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Oktay ARSLAN

Üye  
Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Üye  
Doç. Dr. Nahit GENÇER

Üye  
Doç. Dr. Mustafa ZENGİN

Üye  
Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

## ÖZET

**YENİ TADALAFİL TÜREVLERİNİN BAZI İZOENZİMLER ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI  
DOKTORA TEZİ  
ZÜBEYDE SAÇKES  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)**

**BALIKESİR, ŞUBAT - 2018**

Araştırmamızın birinci bölümünde, tadalafil ve yeni sentezlenen tadalafil türevlerinin siklik nükleotid fosfodiesteraz 1 (PDE1) izoenzimi üzerine inhibisyon etkileri saptanmıştır. Tadalafil ( $IC_{50}=178 \mu M$ ), alliltadalafil ( $IC_{60}=105 \mu M$ ), morfolintadalafil ( $IC_{50}=375 \mu M$ ) ve furfuriltadalafil ( $IC_{60}=97 \mu M$ ) PDE1'i  $\mu M$  düzeyde inhibe ederken; sikloheksiltadalafil ve piperoniltadafilin çalışılan konsantrasyonlarda (20-600  $\mu M$ ) PDE1 üzerinde belirli oranlarda aktivatör özelliği gösterdiği saptanmıştır.

Araştırmamızın ikinci bölümünde ise, söz konusu bileşiklerin karbonik anhidraz I-II (hCA-I, hCA-II) ve paraoksonaz 1 (hPON1) enzimi üzerine etkileri araştırıldı. CA izoenzimleri, Sepharose-4B-etilendiamin-4-tiyüredibenzensülfonamid afinite jeli kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Araştırmamızda kullanılan hPON1, Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin jeli kullanılarak hidrofobik etkileşim kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. CA-I-II ve hPON1 izoenzimlerinin saflıkları SDS-PAGE ile kontrol edildi ve bileşiklerin inhibisyon etkileri araştırıldı.

Alliltadalafil, furfuriltadalafil, morfolintadalafil ve piperoniltadafilin hCA-I'yi inhibe ettiği (sırasıyla;  $IC_{80}=26 \mu M$ ,  $IC_{80}=87 \mu M$ ,  $IC_{80}=266 \mu M$  ve  $IC_{50}=90,9 \mu M$ ) saptanmıştır. Ayrıca, morfolintadalafil ve piperoniltadafilin hCA-II'yi inhibe ettiği (sırasıyla;  $IC_{80}=548 \mu M$ ,  $IC_{80}=55 \mu M$ ) gözlenmiştir. hCA-I ve hCA-II üzerine etkisi araştırılan diğer bileşikler ise çalışılan konsantrasyonlarda düşük düzeyde inhibisyon etkisi göstermektedir. Ancak,  $IC_{50}$ - $IC_{80}$  değerleri hesaplanamamıştır. Ayrıca, tadalafilin hCA-II'ye karşı belirli oranda aktivatör etki gösterdiği saptanmıştır.

Etkisi incelenen bileşiklerden sikloheksiltadafilin hPON1'i inhibe ettiği ( $IC_{50}=119,2 \mu M$ ) gözlenmiştir. Morfolintadafilin sadece yüksek konsantrasyonda (238  $\mu M$ ) enzimi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarda önemli bir etki göstermediği saptanmıştır. Piperoniltadafilin hPON1 aktivitesine karşı düşük konsantrasyonlarda (20-50  $\mu M$ ) inhibe edici, yüksek konsantrasyonlarda (>50  $\mu M$ ) aktivatör etki gösterdiği saptanmıştır. Tadalafil, hPON1 aktivitesini minimal düzeyde inhibe etmiştir ancak çalışılan konsantrasyonlarda (0-190  $\mu M$ )  $IC_{50}$  değeri hesaplanamamıştır. Çalışmamızda kullanılan diğer tadalafil türevlerinin hPON1 üzerine önemli bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELELER:** cAMP Fosfodiesteraz, tadalafil türevleri, Karbonik Anhidraz (CA), Paraoksonaz (PON).

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NEW TADALAFIL DERIVATIVES ON SOME ISOENZYMES

PH.D THESIS

ZÜBEYDE SAÇKES

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. OKTAY ARSLAN)

BALIKESİR, FEBRUARY 2018

In the first part of our study, we determined inhibition effects of tadalafil and newly synthesized tadalafil derivatives on cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 (PDE1). While tadalafil ( $IC_{50}=178 \mu M$ ), allyltadalafil ( $IC_{60}=105 \mu M$ ), morpholinotadalafil ( $IC_{50}=375 \mu M$ ) and furfuryltadalafil ( $IC_{60}=97 \mu M$ ) inhibited PDE1 in  $\mu M$  level, cyclohegzyltadalafil and piperonyltadalafil showed activator properties in working concentrations (20-600  $\mu M$ ).

In the second part of our study, the effects of compounds on carbonic anhydrase I-II (hCA-I, hCA-II) and paraoxonase 1 (hPON1) were investigated. CA isoenzymes were purified by affinity chromatography using Sepharose-4B-ethylene diamine-4-thioureido-benzensulfonamide affinity gel. The hPON1 was purified by hydrophobic interaction chromatography using Sepharose-4B-L-tyrosine-1-naphthylamine gel. The purity of hCA-I-II and hPON1 isoenzymes was checked by SDS-PAGE and the inhibition effects of compounds were investigated.

We have observed that allyltadalafil, furfuryltadalafil, morpholinotadalafil and piperonyltadalafil inhibit hCA-I ( $IC_{80}=26 \mu M$ ,  $IC_{80}=87 \mu M$ ,  $IC_{80}=266 \mu M$ , and  $IC_{50}=90.9 \mu M$ , respectively). It has been also observed that morpholinotadalafil, and piperonyltadalafil inhibit hCA-II ( $IC_{80}=548 \mu M$ ,  $IC_{80}=55 \mu M$ , respectively). Other compounds investigated for effect on hCA-I and hCA-II exhibited a low inhibitory effect in the studied concentrations. However,  $IC_{50}$ - $IC_{80}$  values could not be calculated. In addition, tadalafil has been shown to have an activator activity against hCA-II.

We have observed that cyclohegzyltadalafil inhibits hPON1 ( $IC_{50}=119.2 \mu M$ ). It has been determined that morpholinotadalafil inhibited the enzyme only at high concentration (238  $\mu M$ ) and did not show any significant effect at low concentration. Piperonyltadalafil has shown inhibitory effect against hPON1 at low concentration (20-50  $\mu M$ ), and activatory effect at high concentration (>50  $\mu M$ ). Tadalafil inhibited hPON1 activity in a minimal extent, but  $IC_{50}$  values could not be calculated at working concentrations (0-190  $\mu M$ ). Other tadalafil derivatives used in our study were observed to have no significant effect on hPON1.

**KEYWORDS:** cAMP Phosphodiesterase, tadalafil derivatives, Carbonic Anhydrase (CA), Paraoxonase (PON).

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1    Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enzimi.....	4
1.1.1    Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enzimine Tarihsel Bakış .....	5
1.1.2    Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enziminin Klinik Önemi ve Farmakolojik Hedef Olma Nedenleri.....	6
1.1.3    Siklik Nükleotid Fosfodiesterazların Genel Yapıları.....	8
1.1.4    Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz İzoenzimleri.....	12
1.1.5    Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enziminin Katalitik Mekanizması	17
1.1.6    Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz İnhibitörleri .....	20
1.2    Karbonik Anhidraz Enzimi .....	23
1.3    Paraoksonaz Enzimi .....	25
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>27</b>
2.1    Materyaller .....	27
2.1.1    Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	27
2.1.2    Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	30
2.1.3    Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması .....	30
2.1.3.1    PDE1 Aktivite Tayini için Kullanılan Çözeltiler .....	30
2.1.3.2    Afinite Jeli Dengelem Tamponu.....	31
2.1.3.3    Afinite Jeli Yıkama Tamponu .....	31
2.1.3.4    Afinite Jeline Bağlanmış hCA-I Elüsyonu için Kullanılan Tampon.....	32
2.1.3.5    Afinite Jeline Bağlanmış Olan hCA-II Elüsyonu için Kullanılan Tampon .....	32
2.1.3.6    CA Esteraz Aktivitesi Ölçümü ve Diyalizde Kullanılan Tampon:.....	32
2.1.3.7    CA Esteraz Substratı.....	32
2.1.3.8    Hidrofobik Jelin Dengelenmesi için Kullanılan Tampon.....	32
2.1.3.9    Hidrofobik Jele Bağlanmış PON1 Enziminin Elüsyonu için Kullanılan Tampon:.....	33
2.1.3.10    Amonyum Sülfat Çöktürmesi Sonucu Oluşan Çökeleğin Alındığı Tampon: .....	33
2.1.3.11    PON Aktivite Ölçümünde Kullanılan Bazal Aktivite Tamponu:.....	33
2.1.3.12    PON Substrat Çözeltileri:.....	33
2.1.3.13    Stok İnhibitör Çözeltileri:.....	34
2.1.3.14    SDS-PAGE’de Kullanılan Numune Tamponu:.....	34
2.1.3.15    SDS-PAGE’de Kullanılan Yürütme Tamponu: .....	34

2.1.3.16 SDS-PAGE’de Kullanılan Ayırma ve Yığıma Jellerinin Hazırlanışı.....	34
2.1.3.17 SDS-PAGE’de Kullanılan Renklendirme Çözeltisi .....	34
2.1.3.18 SDS-PAGE’de Kullanılan Renk Açma Çözeltisi.....	35
2.2 Yöntemler .....	36
2.2.1 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz 1 İzoenzimi Aktivite Tayin Yöntemi .....	36
2.2.1.1 5'- AMP Standart Eğrisinin Hazırlanması .....	37
2.2.1.2 DMSO’nun PDE1A Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Kontrolü.....	38
2.2.1.3 PDE1 İzoenzim Aktivitesinin Tayini .....	38
2.2.2 İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA-I ve hCA-II) Saflaştırılması ve Aktivite Tayini .....	40
2.2.2.1 Kan Numunelerinin Alınması ve Hemozilatın Hazırlanması.....	40
2.2.2.2 Hemolizatın Afinitite Kolonuna Tatbiki ve CA İzoenzimlerinin Elüsyonu .....	40
2.2.2.3 hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Diyalizi .....	41
2.2.2.4 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayini ...	41
2.2.3 İnsan PON1 İzoenziminin Saflaştırılması ve Aktivite Tayini.....	43
2.2.3.1 Kan Serumunun Ayrılması .....	43
2.2.3.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	43
2.2.3.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması .....	44
2.2.3.4 Paraoksonaz Enzim Aktivite Tayini .....	44
2.2.4 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	45
2.2.5 Tadalafil ve Türevlerinin İzoenzimler Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi .....	46
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>48</b>
3.1 PDE1 Analizleri İçin 5'- AMP Standart Eğrisinin Hazırlanması .....	48
3.2 DMSO’nun PDE1A Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi ..	49
3.3 Tadalafil ve Yeni Sentezlenen Türevlerinin PDE1A İzoenzimi Üzerine Etkileri .....	49
3.4 İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Afinitite Kromatografisi ile Saflaştırılması .....	56
3.5 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	57
3.6 DMSO’nun hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkisi .....	57
3.7 Tadalafil ve Türevlerinin CA Substratına Etkisinin İncelenmesi.....	60
3.8 Tadalafil ve Türevlerinin hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi.....	63
3.9 İnsan PON 1 İzoenziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	70
3.10 İnsan serum PON1 İzoenziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi .	71
3.11 DMSO’nun hPON1 İzoenzimi Üzerine Etkisi .....	72
3.12 Tadalafil ve Türevlerinin hPON1 Substratına Etkisinin İncelenmesi ....	73
3.13 Tadalafil ve Türevlerinin hPON1 İzoenziminin Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	76
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>82</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>88</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

<b>Şekil 1.1:</b>	Siklik nükleotid fosfodiesterazların 3'-siklik fosfat bağımlı hidrolizi [1].....	4
<b>Şekil 1.2:</b>	Maya PDE1 (yPDE1) ve insan PDE10 (hPDE10) izomerlerinin 3'-siklik fosfat bağlarını hidrolizi [31].....	5
<b>Şekil 1.3:</b>	Fosfodiesterazların genel yapısı [28].....	8
<b>Şekil 1.4:</b>	PDE X-ışını kristal yapıları. A, PDE4B2D (PDB ID 1F0J)' nin 17 $\alpha$ -heliksten oluşan, 3 yan bölge içeren (mavi, yeşil ve kahverengi ile gösterilmiş) katalitik bölge. Aktif bölge çinko atomu (gri) ve magnezyum atomu (mor) içermektedir. B, insan PDE5A (PDB 1T9S)' in katalitik bölge yapısı. Q817 amid yan-zincirini kullanarak reaksiyon ürünü olan 5'-GMP' nin guanin halkası ile H-bağı yapmıştır. Sterik engelden dolayı guanin halkasının dönemediği, bu sayede substrat olarak cAMP' den ziyade cGMP' ye karşı seçiciliğin olduğu belirtilmiştir. PDE4A' da yan-zincirin ters dönmesinden dolayı cAMP'ye karşı bir seçicilik sözkosudur ve ikili-substrat seçiciliği olan izoenzimlerde glutaminin serbest dönme yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir. C, fare PDE2A'nin GAF-AB dimerinin yapısı. Monomerlerden biri turuncu heliksler ve sarı $\beta$ -kırmalı tabakalı olarak, diğeri ise mavi heliksler, yeşil tabakalar olarak gösterilmiştir. Her bir GAF-B domainine bağlı cGMP ise kırmızı ile gösterilmiştir [1].....	9
<b>Şekil 1.5:</b>	Nükleotid seçiminde Glutamin dönüşü mekanizması.(a) PDE4D-AMP, (b) PDE5A-GMP, (c) PDE1B-AMP, (d) PDE1B-GMP [47]. .....	11
<b>Şekil 1.6:</b>	PDE4D'nin aktif bölgesinde cAMP hidrolizi için 2003'te Huai ve arkadaşları tarafından öne sürülen katalitik mekanizma [32]. .....	17
<b>Şekil 1.7:</b>	PDE4 tarafından katalizlenen cAMP hidroliz reaksiyon mekanizması. Daha net anlaşılması açısından, His164, His200, Asp201, Asp318, Asn321, ve Gln859 rezidüleri şekilde gösterilmemiştir [32]. .....	19
<b>Şekil 1.8:</b>	cGMP, sildenafil, vardenafil ve tadalafilin kimyasal yapıları. ....	22
<b>Şekil 2.1:</b>	Tadalafil ve türevlerinin oluşum şeması ve kullanılan R grupları.....	28
<b>Şekil 2.2:</b>	PDE1 analiz kitinin çalışma prensibinin şematik gösterimi. ....	37
<b>Şekil 3.1:</b>	5'- AMP standart eğrisinin hazırlanması. (a) Deneyde kullanılan mikropalkanın reaksiyon sonundaki görüntüsü. (b) Reaksiyonda kullanılan maddeler ve 620nm'de yapılan ölçüm sonuçları. (c) 5'- AMP standart eğrisi. ....	48
<b>Şekil 3.2:</b>	Tadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği. ....	52
<b>Şekil 3.3:</b>	Alliltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği. ....	52
<b>Şekil 3.4:</b>	Furfuriltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği. ....	53



<b>Şekil 3.5:</b>	Morfolintadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği. ....	53
<b>Şekil 3.6:</b>	Sikloheksiltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği. ....	54
<b>Şekil 3.7:</b>	Piperoniltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği. ....	54
<b>Şekil 3.8:</b>	hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin afinite kolonundan elüsyon grafiği. ....	56
<b>Şekil 3.9:</b>	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE görüntüleri. ....	57
<b>Şekil 3.10:</b>	DMSO'nun hCA-I izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini gösteren % aktivite-DMSO hacmi grafiği. ....	59
<b>Şekil 3.11:</b>	DMSO'nun hCA-II izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini gösteren % aktivite-DMSO hacmi grafiği. ....	60
<b>Şekil 3.12:</b>	Tadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	64
<b>Şekil 3.13:</b>	Alliltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	65
<b>Şekil 3.14:</b>	Furfuriltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	66
<b>Şekil 3.15:</b>	Morfolintadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	67
<b>Şekil 3.16:</b>	Sikloheksiltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	68
<b>Şekil 3.17:</b>	Piperoniltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	69
<b>Şekil 3.18:</b>	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan PON1 enziminin elüsyon grafiği. ....	71
<b>Şekil 3.19:</b>	Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan insan serum PON1 izoenziminin SDS-PAGE görüntüsü. ....	71
<b>Şekil 3.20:</b>	DMSO'nun hPON1 enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite-DMSO hacmi grafiği. ....	73
<b>Şekil 3.21:</b>	hPON1 izoenzim aktivitesinin tadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	76
<b>Şekil 3.22:</b>	hPON1 izoenzim aktivitesinin alliltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	77
<b>Şekil 3.23:</b>	hPON1 izoenzim aktivitesinin furfuriltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	78
<b>Şekil 3.24:</b>	hPON1 izoenzim aktivitesinin morfolintadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	79
<b>Şekil 3.25:</b>	hPON1 izoenzim aktivitesinin sikloheksiltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	80
<b>Şekil 3.26:</b>	hPON1 izoenzim aktivitesinin piperoniltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği. ....	81
<b>Şekil 4.1:</b>	hCA-II aktivitesi üzerine sikloheksiltadalafil bileşiğinin etkisi incelenirken yüksek inhibitör konsantrasyonunda (soldaki) küvetin bulanıklaşmasını ve ölçümü olumsuz etkilemesini gösteren fotoğraf. ....	86

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> PDE ailesinin sınıflandırılması [43,48].	13
<b>Tablo 1.2:</b> PDE izoenzimlerinin kinetik özellikleri [1,41].	14
<b>Tablo 1.3:</b> PDE izoenzimlerinin dokulara dağılımları [1,29,48].	15
<b>Tablo 1.4:</b> PDE izoenzimlerinin fonksiyonları [1].	16
<b>Tablo 2.1:</b> İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşiklerin şekilleri ve molekül ağırlıkları.	29
<b>Tablo 2.2:</b> Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar.	30
<b>Tablo 2.3:</b> SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.	35
<b>Tablo 2.4:</b> PDE1 aktivite ölçümlerinde kullanılan bileşiklerin konsantrasyonları ve hacimleri.	39
<b>Tablo 3.1:</b> Farklı DMSO miktarlarının PDE1A izoenzimi aktivitesi üzerine etkileri.	49
<b>Tablo 3.2:</b> PDE1A izoenzimi aktivitesine etkisi incelenen bileşiklerin 620 nm’de okunan absorban değerleri.	51
<b>Tablo 3.3:</b> Tadalafil ve türevlerinin PDE1 izoenzimi aktivitesi üzerine etkileri.	51
<b>Tablo 3.4:</b> Tadalafil ve türevlerinin PDE1A izoenzimi için 0,1 mM cAMP substrat konsantrasyonunda, % aktivite-[I] grafiklerinden bulunan IC <sub>50</sub> veya IC <sub>60</sub> değerleri.	55
<b>Tablo 3.5:</b> DMSO’nun hCA-I izoenzimi aktivitesi üzerine etkisi.	58
<b>Tablo 3.6:</b> DMSO’nun hCA-II izoenzimi aktivitesi üzerine etkisi.	59
<b>Tablo 3.7:</b> Tadalafilin p-NFA substratına etkisi.	61
<b>Tablo 3.8:</b> Alliltadalafilin p-NFA substratına etkisi.	61
<b>Tablo 3.9:</b> Furfuriltadalafilin p-NFA substratına etkisi.	61
<b>Tablo 3.10:</b> Morfolintadalafilin p-NFA substratına etkisi.	62
<b>Tablo 3.11:</b> Sikloheksiltadalafilin p-NFA substratına etkisi.	62
<b>Tablo 3.12:</b> Piperoniltadalafilin p-NFA substratına etkisi.	62
<b>Tablo 3.13:</b> hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine tadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	64
<b>Tablo 3.14:</b> hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine alliltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	65
<b>Tablo 3.15:</b> hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine furfuriltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	66
<b>Tablo 3.16:</b> hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine morfolintadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	67
<b>Tablo 3.17:</b> hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine sikloheksiltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	68
<b>Tablo 3.18:</b> hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine piperoniltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	69

<b>Tablo 3.19:</b> Tadalafil ve türevlerinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için % aktivite-[I] grafiklerinden bulunan IC50-80 değerleri.....	70
<b>Tablo 3.20:</b> DMSO'nun hPON1 izoenzimi aktivitesi üzerine etkisi.....	72
<b>Tablo 3.21:</b> Tadalafilin hPON1 substratına etkisi.....	74
<b>Tablo 3.22:</b> Alliltadalafilin hPON1 substratına etkisi.....	74
<b>Tablo 3.23:</b> Furfuriltadalafilin hPON1 substratına etkisi.....	74
<b>Tablo 3.24:</b> Morfolintadalafilin hPON1 substratına etkisi.....	75
<b>Tablo 3.25:</b> Sikloheksiltadalafilin hPON1 substratına etkisi.....	75
<b>Tablo 3.26:</b> Piperoniltadalafilin hPON1 substratına etkisi.....	75
<b>Tablo 3.27:</b> Tadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.....	76
<b>Tablo 3.28:</b> Alliltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.....	77
<b>Tablo 3.29:</b> Furfuriltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.....	78
<b>Tablo 3.30:</b> Morfolintadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.....	79
<b>Tablo 3.31:</b> Sikloheksiltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.....	80
<b>Tablo 3.32:</b> Piperoniltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.....	81

## SEMBOL LİSTESİ

<b>PDE1</b>	: 3',5'-siklik nükleotid fosfodiesteraz 1
<b>CA</b>	: Karbonik Anhidraz
<b>hCA-I</b>	: İnsan Karbonik Anhidraz I izoenzimi
<b>hCA-II</b>	: İnsan Karbonik Anhidraz II izoenzimi
<b>PON</b>	: Paraoksonaz
<b>hPON1</b>	: İnsan Paraoksonaz I izoenzimi
<b>ED</b>	: Erektıl disfonksiyonu
<b>CaM</b>	: Kalmodulin
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>cGMP</b>	: Siklik guanozin monofosfat
<b>V<sub>max</sub></b>	: En yüksek reaksiyon hızı
<b>K<sub>m</sub></b>	: V <sub>max</sub> 'ın yarısına ulaşmak için gerekli substrat konsantrasyonu
<b>K<sub>i</sub></b>	: İnhibisyon sabiti
<b>EC</b>	: Enzim kod numarası
<b>IC<sub>50-80</sub></b>	: %50-80 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
<b>SDS</b>	: Soyum dodesil sülfat
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>TEMED</b>	: N, N,N',N'-tetrametil etilendiamin
<b>HDL</b>	: Yüksek dansiteli lipoprotein
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>ED</b>	: Erektıl disfonksiyonu
<b>IBMX</b>	: 3-izobütil-1-metilksantin
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>p-NFA</b>	: para-Nitro fenil asetat

## ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarım süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her daim desteğini yanımda hissettiğim, bana yol gösteren ve cesaretlendiren, esnek bir çalışma ortamı sağlayarak doktorayı bitirmemi mümkün kılan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a en derin saygı, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Doktora süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Nahit GENÇER'e en derin saygılarımı sunar, çok teşekkür ederim.

İlgi ve desteklerini ve ayrıca güzel kahvelerini esirgemeyen sayın hocalarım Doç. Dr. Semra IŞIK ve Doç. Dr. Serap UZUNOĞLU'na teşekkür eder, saygı ve sevgilerimi sunarım.

İnhibisyon çalışmalarımda kullandığım bileşiklerin sentezini yapan ve aynı zamanda tez komitemde yer alan sayın Doç. Dr. Mustafa ZENGİN ve ekibine teşekkür ederim. Tez komitemde yer alan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na da çok teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan arkadaşlarım sevgili Dr. Çiğdem BİLEN ve Dr. Adem ERGÜN başta olmak üzere, Dr. Nurcan DEDEOĞLU, Dr. Beste ŞİPAL, Miray REYHAN, Şeyma ERİK ve diğer grup arkadaşlarıma teşekkür eder, en içten sevgilerimi sunarım.

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim, dualarını ve karşılıksız sevgilerini benden esirgemeyen, beni bu günlere getiren canım aileme, hayatta olsaydı mezuniyetimle inanılmaz gurur duyacağını bildiğim rahmetli babama, anneme, ablalarım ve kardeşlerime en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Varlıklarıyla her zaman bana neşe kaynağı olan ikiz çocuklarım Gökçe ve Bilge Nebi'ye, maddi, manevi her türlü desteğiyle hep yanımda olan, beni cesaretlendiren, sonsuz sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Doç. Dr. Mesut SAÇKES'e ve ihtiyacım olduğunda hep yardımına gelen sevgili kayınvalideme en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

# 1. GİRİŞ

Söz konusu çalışma iki farklı bölüme ayrılabilir. İlk bölümde yeni tadalafil türevlerinin hedef enzim olan 3',5'-siklik nükleotid fosfodiesteraz 1 (PDE1) izoenzimi üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. Araştırmamızın ikinci bölümünde, tadalafil ve türevlerinin son derece önemli fizyolojik fonksiyonları olan karbonik anhidraz (CA) ve paraoksonaz (PON) izoenzimleri üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

PDE1, kalsiyum ve kalmodulin (CaM)-bağımlı fosfodiesteraz olarak da adlandırılır ve ilk kez 1967 yılında Wai Yiu Cheung tarafından keşfedilmiştir [1,2]. PDE1 olarak adlandırılmasının nedenlerinden biri bu enzim ailesinin düzenleyici özelliğinin ilk gözlemlendiği form olmasıdır. Ayrıca bir çok dokudan alınan örneklerde kromatografik ayırma işleminde enzim ailesi için ilk fraksiyonlarda aktivitesi ölçülen enzim PDE1'dir [1]. Bu enzim ailesinin ayırt edici özelliklerinin başında, enzimin substrat olarak siklik adenosin monofosfat (cAMP) veya siklik guanozin monofosfatı (cGMP) kullanabilen ilk dual-substrat esteraz olması ve aktivitesinin doğrudan  $Ca^{+2}/CaM$  tarafından düzenlenmesi gelmektedir [3]. Enzimin N-terminaline yakın bölgesinde bulunan  $Ca^{+2}/CaM$  bağlanma bölgesine kalmodulinin bağlanması siklik nükleotid hidrolizine neden olmaktadır [1,4,5]. Bu nedenle, bu  $Ca^{+2}/CaM$ -bağımlı PDE1 enzimi hücre içi  $Ca^{+2}$  ve siklik nükleotid molekülleri arasında düzenleyici bir role de sahiptir denilebilir [1,6]. PDE1 izoenzimi, PDE1A, PDE1B ve PDE1C olmak üzere 3 alt gruptan oluşmaktadır. İnsanda, PDE1A izoenziminin 10, PDE1B'nin 2 ve PDE1C'nin 7 izoformunun olduğu ve bunların molekül ağırlıklarının 50-90 kDa arasında değiştiği bilinmektedir [3,5]. Dört spesifik bölgeden oluşan PDE1 izoformlarında, iki CaM-bağlanma bölgesi, bir inhibisyon bölgesi ve bir katalitik bölgesi vardır. Bu bölgeler yapısal olarak oldukça benzer olmalarına rağmen farklı düzenleme özellikleri, substrat afinitesi ve spesifik aktiviteye sahiplerdir [3,7]. PDE1 izoformları memelilerde başlıca beyin, kalp, akciğer, düz kaslar, testis, sperm, merkezi ve periferik sinir sistemi, nöronlar, olfaktör epiteli, makrofajlar, ve akyuvarlarda bulunmaktadır [1,4,8]. Çeşitli doku ve organlarda bulunan PDE1 izoformları bu sayede siklik nükleotid bağımlı bir çok fizyolojik durumların

düzenlenmesinde görev almaktadır. PDE1A vasküler düz kas kasılmalarını düzenlemede ve sperm fonksiyonlarında; PDE1B, dopaminerjik sinyalizasyonda, immün hücre aktivasyonu ve varlığını sürdürmesinde; PDE1C, vasküler düz kas hücresinin çoğalmasında ve ayrıca sperm fonksiyonları ve nöronik sinyalizasyonunda görev almaktadır [1,8]. PDE1A ve PDE1B izoenzimleri tercihen cGMP' yi hidroliz ederken (PDE1A için;  $K_m$  (cAMP/cGMP): 2,6-3,5 / 72,7-124  $\mu$ M. PDE1B için;  $K_m$  (cAMP/cGMP): 1,2-5,9 / 10-24  $\mu$ M), PDE1C izoenzimi cAMP ve cGMP hidrolizine karşı oldukça yakın afiniteye sahiptir (PDE1C için;  $K_m$  (cAMP/cGMP): 0,6-2,2 / 0,3-1,1  $\mu$ M). [1,4].

Karbonik anhidraz (CA), hemen hemen bütün organizmalarda bulunan, geri dönüşümlü olarak karbondioksitin hidrasyonunu ve bikarbonat iyonunun dehidrasyonunu katalizleyen, aktif bölgesinde çinko iyonu içeren bir metaloenzimdir (Karbonat Hidrolizaz E.C. 4.2.1.1) [9]. CA izoenzimleri metabolizmada, solunum, pH ve CO<sub>2</sub> homeostazı, elektrolit sekresyonu, lipogenez, ürejeniz, glukoneogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, fotosentez, hücre büyümesi ve üreme yolu da dahil olmak üzere birçok oldukça önemli fizyolojik ve patolojik süreçlerde görev almaktadır [10-13]. Memelilerde şu ana kadar, sitozol, mitokondri, eritrositler, sindirim kanalı, göz, akciğerler, testisler, beyin, böbrek, iskelet kasları, pankreas, kalp kasları, karaciğer, tükrük bezleri gibi, farklı hücre içi ve doku dağılımı gösteren 16 CA izoformu tanımlanmıştır. [14-16]. Sitozolda bulunan ve üzerinde en fazla araştırma yapılan insan karbonik anhidraz (hCA) izoformlarından hCA-I ve hCA-II' nin, retinal ve serebral ödem, glokom, epilepsi, obezite ve yükseklik hastalığı gibi birçok hastalıkla bağlantılı olduğu ve bu hastalıkların tedavisinde söz konusu izoenzimlerin aktivatörlerinin veya inhibitörlerinin kullanıldığı bilinmektedir ve halen yeni CA modülatörlerinin araştırılmasına devam edilmektedir [17,18]. Bu kadar önemli fonksiyonlara sahip bir enzim olan karbonik anhidrazın aktivitesinin, yine spesifik olarak erektil disfonksiyonu için kullanılan bir başka ilaca, tadalafile ve onun türevlerine karşı nasıl değişeceği araştırılacaktır.

Araştırma kapsamında, tadalafil ve türevlerinin etkisinin inceleneceği bir diğer enzim olan paraoksonaz (PON), karaciğerde sentezlenen, hem paraoksonaz (EC 3.1.8.1) hem de arilesteraz (EC 3.1.1.2) aktivitesine sahip, yapısında kalsiyum

bulunan bir ester hidrolazdır. [19,20]. Paraoksonaz, organofosforlu bir insektisit olan parationun oldukça toksik olan metaboliti paraoksonu hidroliz etme özelliğinden dolayı bu şekilde adlandırılmıştır [20,21]. PON gen ailesi üç üyeden, PON1, PON2 ve PON3, oluşmaktadır. Yapısal olarak oldukça benzer olan bu üç izoenzimden PON1 içlerinde en fazla çalışma yapılanıdır. Çalışmamızda kullanılan insan serum paraoksonazı, hPON1, 43 kDa ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan, karaciğerde sentezlenip kana yüksek dansiteli lipoproteine (HDL) bağlı şekilde salınan bir glikoproteindir [21,22]. PON1'in, metabolizmada başlıca üç önemli role sahip olduğu bilinmektedir. PON1, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu ve lipid peroksidlerinin oluşumunu inhibe etmesi ile antioksidan özelliği ile bilinir [21,23]. Ayrıca detoksifikasyon sürecinde PON1 önemli fizyolojik işleve sahiptir. PON1 bu aktivitesi ile paration, diazinon ve klorpirifos gibi pestisitlerin çevresel tehdit olan toksik metabolitlerini ve sarin, somon gibi terörist saldırılarda da kullanılan sinir gazlarının da içinde bulunduğu birçok organofosfat bileşiklerinin detoksifikasyonunu sağlar [21,24]. Diğer yandan PON1'in, laktonaz aktivitesi ile antibakteriyel etkisi dikkat çekmektedir [25]. Yukarıda belirtildiği gibi, antioksidan, detoksifikasyon ve antibakteriyel etkilere sahip PON1' in aktivitesinin değişmesi bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada tadalafil ve türevlerinin PON1 enzim aktivitesini nasıl etkilediği de araştırılacaktır.

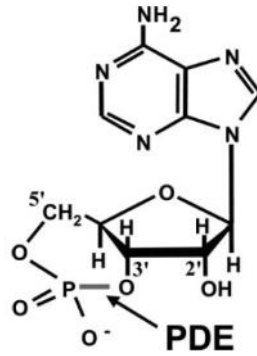
Son yıllarda oldukça popüler olan tadalafil, ticari adı Cialis®, erektil disfonksiyonu (ED) tedavisinde kullanılan PDE5 izoenziminin spesifik inhibitörlerinin en önemlilerinden biridir. ED ilaçlarının kardiyovasküler bozukluklar, görme bozuklukları sırt ağrısı ve yüzde kızarıklık gibi bazı olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir [26,27]. Bu etkilerin en aza indirilebilmesi ancak yeni sentezlenecek tadalafil türevleri ve diğer ED ilaç türevlerinin PDE enzimlerine karşı spesifliklerine bağlıdır. Bu nedenle yeni tadalafil türevlerinin sentezi ve PDE5 üzerindeki etkileri konusunda son yıllarda çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, söz konusu ilaçların hedef enzim dışında diğer biyomolekülleri etkilemesinin birçok fizyolojik sorunu ortaya çıkaracağı bilinmektedir. Bu nedenle tadalafil ilaçlarının hedef enzim dışında diğer önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip enzimlere karşı afinitesinin ortaya çıkarılmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz.



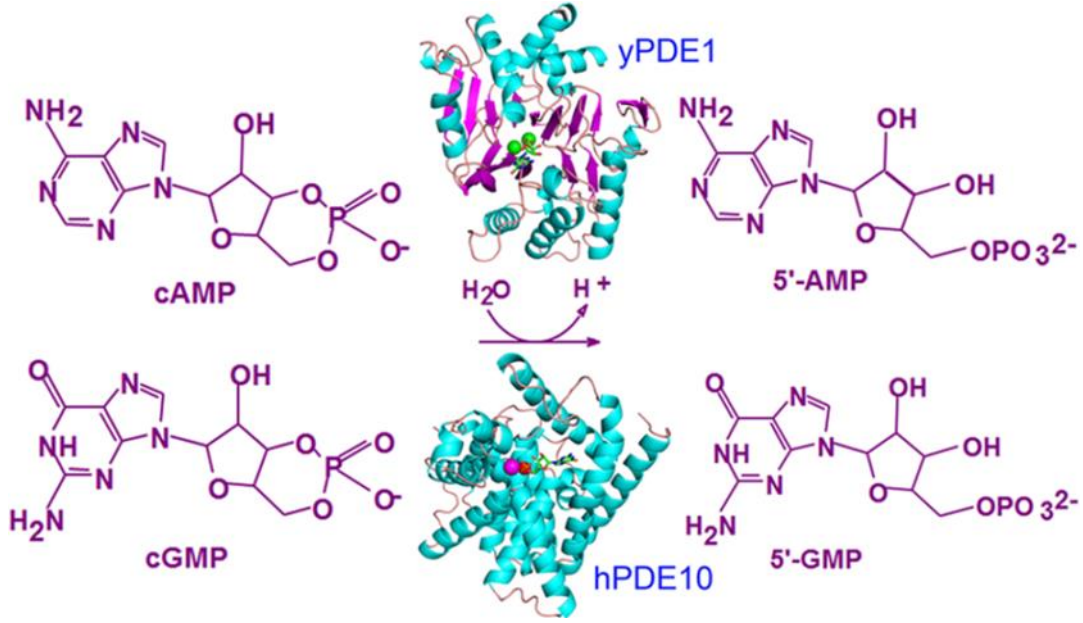
Bu çalışmada, söz konusu tadalafil türevlerinin şunda klinikte kullanılan ilaca göre PDE1 izoenzimini ne ölçüde inhibe ettiği saptanacaktır. Araştırma kapsamında ayrıca, tadalafil türevlerinin metabolizmada önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip hCA-I , hCA-II ve hPON1 izoenzimlerinin aktivitelerini nasıl değiştireceği saptanacaktır.

### 1.1 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enzimi

Siklik nükleotid fosfodiesterazlar (PDE, EC 3.1.4.17), birbiriyle ilişkili fosfohidrolazlar enzim ailesidir. PDE'ler, seçici bir şekilde, hücre içi ikincil haberci moleküller olan adenosin ve/veya guanosin 3',5' siklik monofosfat'ın (cAMP ve cGMP) 3'-siklik fosfat bağının hidrolizini katalizler. Bu nedenden dolayı, bu enzimler hücre içinde yaygın olarak bulunan bu ikincil habercilerin hücre içi düzeylerinin düzenlenmesinde, dolayısıyla da hücre içi sinyal iletiminde anahtar role sahiplerdir [1,28-33]. cAMP' nin şekli ve hidroliz edilen bağ şekil 1.1 ve 1.2' de gösterilmiştir [1,31].



**Şekil 1.1:** Siklik nükleotid fosfodiesterazların 3'-siklik fosfat bağını hidrolizi [1].



**Şekil 1.2:** Maya PDE1 (yPDE1) ve insan PDE10 (hPDE10) izomerlerinin 3'-siklik fosfat bağlarını hidrolizi [31].

### 1.1.1 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enzimine Tarihsel Bakış

PDE aktivitesi ilk kez 1962'de cAMP'nin keşfedilmesinin hemen ardından Sutherland ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [1,35,36]. Sonradan cGMP'nin bulunması ile beraber, hem cAMP hem de cGMP'nin aynı tip aktivite ile hidroliz olabileceği bulunmuştur. Siklik nükleotidler üzerinde yapılan önceki çalışmaların çoğunda, cAMP veya cGMP'nin kendilerine veya onları sentezleyen enzimlerin aktivitesine bakmak PDE aktivitesini ölçmekten daha zor olduğundan PDE aktivitesi anlaşılmaya çalışılmıştır [1]. Daha sonraki çalışmalarda, metilksantinler, kafein ve teofilin'in PDE aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir. Ayrıca, reaksiyonun 3'5'-pürin riboz siklik monofosfatlar olan cAMP ve cGMP'nin 3'-fosfoester bağının hidrolizine karşı spesifiklik gösterdiği bulunmuştur. İlerleyen zamanlarda yapılan araştırmalarda bazı dokulardan elde edilen PDE aktivitesinin kalsiyum iyonu ve küçük, ısıya dayanıklı molekül olarak bilinen kalmodulin tarafından arttığı keşfedilmiştir [35]. Radyoaktif substrat kullanılan deneylerin gelişmesi ile PDE aktivitesinin fizyolojik konsantrasyonlara yakın substrat düzeyinde ölçülmesine olanak sağlamıştır. Bu sayede, farklı substrat ilgisine, kinetik ve düzenleyici özelliklere sahip birçok PDE formları olduğu netlik kazanmıştır [1,35].

### 1.1.2 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enziminin Klinik Önemi ve Farmakolojik Hedef Olma Nedenleri

Organizmada bulunan farklı PDE'lerin türü ve konumu, hücredeki cAMP ve cGMP'nin lokal konsantrasyonunun düzenlenmesindeki başlıca faktördür. Çoğu PDE'lerin temel görevi, hücredeki siklik nükleotidlerin üç boyutlu yapılarını düzenlemek, hücredeki varlıklarının zamanını ayarlamak ve hücrede uygun olmayan kısımlara gitmelerine engel olmaktır. Bazı PDE'ler ise, hücredeki spesifik cAMP ve cGMP reseptörlerine lokal ulaşımı düzenlemektedir. Bununla beraber, PDE'lerin hepsi siklik nükleotid hidrolizini kontrol etmezler. Bunun yerine, bir iskele proteini olarak veya siklik nükleotidlerin bağlanmasıyla harekete geçen allosterik değişimleri kullanarak protein-protein etkileşimlerini değiştirmekte rol alabilir [1].

cAMP ve cGMP, insülin ve adrenalin gibi bazı hormonlara aracılık yaparak karbohidrat ve yağ metabolizmasında, görme, retinol rod hücrelerinin cGMP-bağımlı Na<sup>+</sup> kanallarının açık kalması, düz kas kasılmalarının düzenlenmesi, nörotransmisyon, ekzositoz, hücre büyümesi ve farklılaşmasında oldukça önemlidirler. *In vivo* cAMP ve cGMP, reseptör benzeri enzimler tarafından sentezlenirler (adenil ve guanil siklazlar) ve PDE'ler tarafından 5'-nükleotidlere (AMP ve GMP) metabolize edilirler [32,37,38]. Bu nedenlerden dolayı, PDE'ler retina dejenerasyonu, kalp yetmezliği, depresyon, astım, erektil disfonksiyonu, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA), şizofreni, pulmoner hipertansiyon, inflamasyon, bazı bilişsel ve hareket bozukluğu hastalıkları olan Alzheimer hastalığı, Parkinsons hastalığı ve Huntington hastalığı ve daha bir çok hastalığın klinik tedavisi için hedef haline gelmişlerdir [28,32,33,37,39].

PDE aktivitesinin keşfinden hemen sonra, kafeinin PDE'nin etkili bir inhibitörü olduğu bulundu ve aralarında kafein analogu, teofilin de olmak üzere çok sayıda seçici olmayan PDE inhibitörleri teröpatik ajan olarak yıllardır kullanılmaktadır. Bu nedenden dolayı PDE aktivitesinin inhibisyonu prensibinin geçerli bir terapötik hedef olarak kullanılabilmesi kabul görmektedir. Ancak, daha önceki çoğu PDE inhibitörleri non-spesifik PDE inhibitörleri olmasından dolayı her bir dokudaki PDE aktivitelerinin çoğunu veya tamamını inhibe ettiğinden oldukça dar bir terapötik indekse sahiplerdi [1].

Uzun yıllardan beri memeli dokularında çok sayıda farklı PDE formları bulunmuştur. Bu PDE izomerlerinin çoğunun vücutta farklı fizyolojik fonksiyonlarla ilgili olduğu ve buna dayanarak farklı patolojik durumlarla da yakından alakalı olabileceğine ilişkin deliller giderek artmaktadır. Bu nedenden dolayı, spesifik fonksiyonları ve patolojik durumları hedef alabilecek, çok fazla benzer non-spesifik yan etkilere sahip olmayan PDE izoformlarına spesifik inhibitörler geliştirmenin mümkün olabileceğine inanıldı. Birer PDE5 inhibitörleri olan sildenafil (Viagra<sup>TM</sup>), vardenafil (Levitra<sup>TM</sup>), tadalafil (Cialis<sup>TM</sup>), udenafil ve mirodenafil gibi ajanların terapötik ve ticari başarısı bu görüşü doğrulamıştır [1,40].

PDE'lerin muhtemel iyi birer farmakolojik hedef olabileceklerinin bir başka nedeni de substratlarının hücredeki konsantrasyonları ile alakalıdır. Birçok hücredeki cAMP ve cGMP seviyesi genelde <1-10 $\mu$ M arası olarak kabul edilmiştir. Yani bu durumda bir yarışmalı inhibitörün etkili olabilmesi için çok yüksek seviyedeki içsel bir substratla yarışmasına gerek olmayacaktır. PDE'ler substrat bağlama koşullarında da nispeten benzersizlerdir ve ayrıca PDE'lerin ATP'den 100 ila 1000 defa daha düşük miktarda substrat kullanmaları, bu enzimleri oldukça bol bulunan substratlar kullanan başka birçok enzimlere göre daha çekici farmakolojik hedef haline getirmektedir [1].

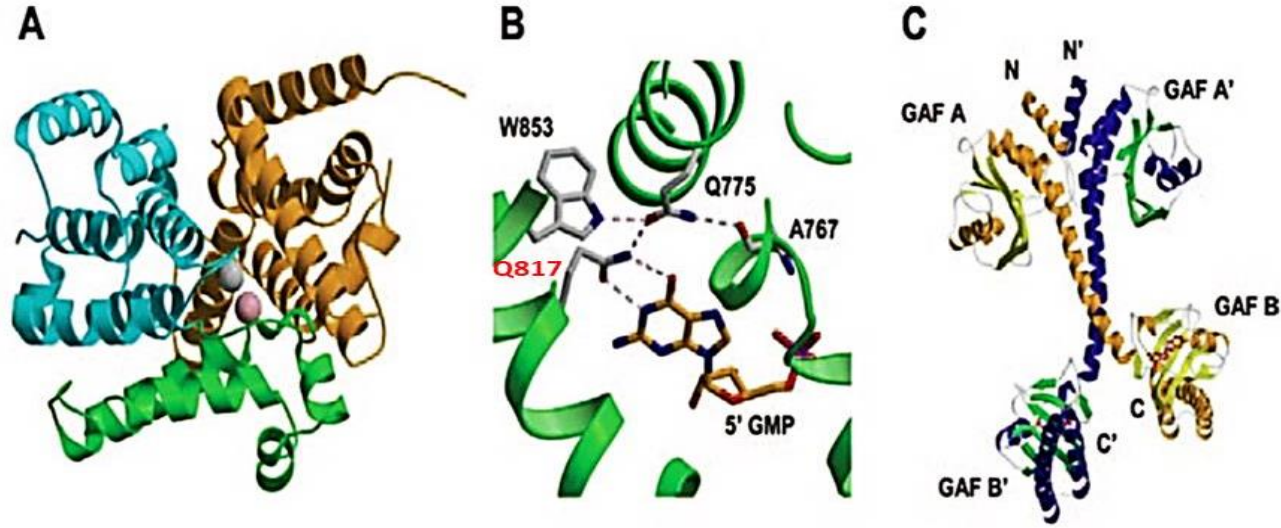
### 1.1.3 Sıklık Nükleotid Fosfodiesterazların Genel Yapıları

PDE izoenzimleri genel olarak dimer halde bulunurlar. Bunların monomer yapıları düzenleyici N-terminal bölgesi, C-terminale yakın konumda bulunan merkezi katalitik bölgesi ve C-terminal bölgesi olmak üzere kapsamlı fonksiyonlara sahip 3 bölgeden oluşmaktadır (Şekil 1.3) [28].



**Şekil 1.3:** Fosfodiesterazların genel yapısı [28].

PDE izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (250-300 amino asit), amino asit diziliminde sadece % 25-40 benzerlik göstermelerine rağmen genel katlanmaları ve fonksiyonel-yapısal öğelerinde oldukça yüksek benzerlik göstermektedirler. Aynı PDE gen ailesi içerisinde ise amino asit dizilimindeki homoloji %65'lere ulaşmaktadır [1,4,28,35,41-43]. Katalitik bölgeler, enzimin; substrat afinitesi, katalik özellikleri ve spesifik inhibitörlere karşı hassasiyetlerini ve ayrıca genel yapısal elementleri belirleyen, gen ailesine spesifik amino asit dizilimini içermektedir [35]. PDE ailesi katalitik bölgeleri çoğunlukla 16 heliks içeren üç alt bölümden oluşmaktadır (Şekil 1.4-A) [1]. Hidrofobik aktif bölge, helikslerin birleşme noktalarındaki ve bütün PDE'ler arasında yüksek oranda korunan rezidüleri tarafından oluşturulmuştur [1,44]. Yaklaşık 15Å derinlik ve 20 Å'a 10 Å' luk bir açıklığa sahiptir [45]. Hidrofobik aktif bölge, dört yan bölgeden oluşmaktadır: metal-bağlanma bölgesi (M site), Glutamin içeren ana cep (Q pocket), hidrofobik cep (H pocket) ve kapak bölgesi (L region) [32,46].

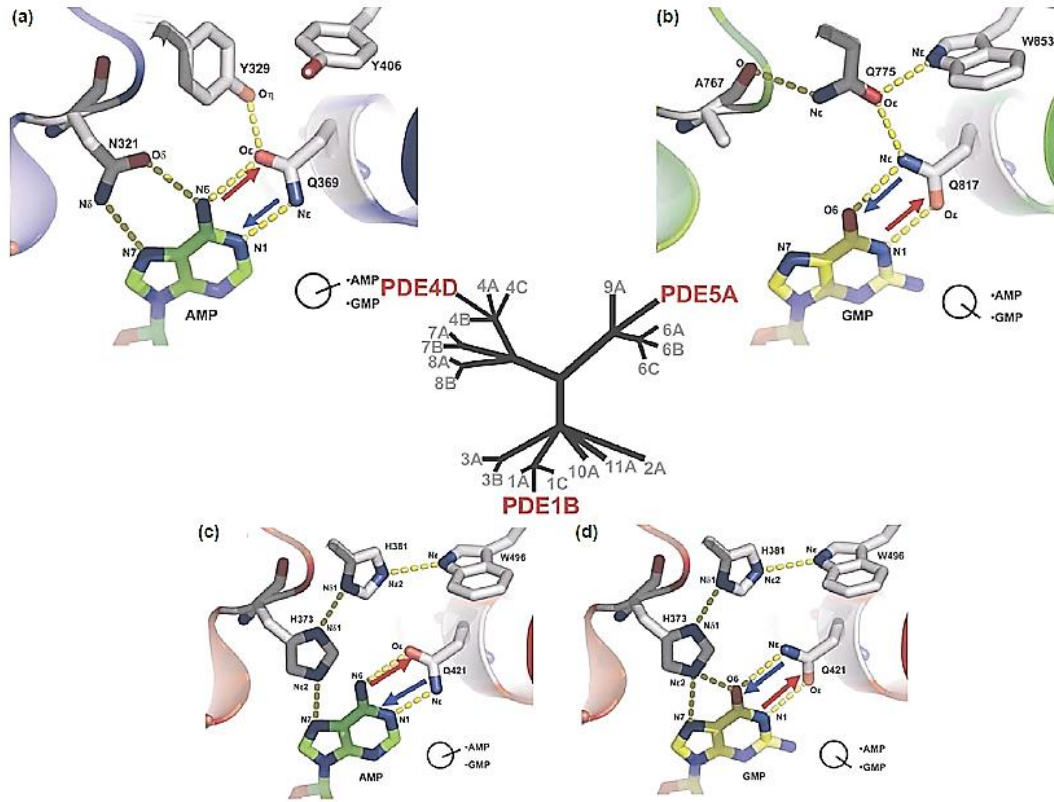


**Şekil 1.4:** PDE X-ışını kristal yapıları. **A**, PDE4B2D (PDB ID 1F0J)'nin 17  $\alpha$ -heliksten oluşan, 3 yan bölge içeren (mavi, yeşil ve kahverengi ile gösterilmiş) katalik bölge. Aktif bölge çinko atomu (gri) ve magnezyum atomu (mor) içermektedir. **B**, insan PDE5A (PDB 1T9S)'nin katalitik bölge yapısı. Q817 amid yan-zincirini kullanarak reaksiyon ürünü olan 5'-GMP' nin guanin halkası ile H-bağı yapmıştır. Sterik engelden dolayı guanin halkasının dönemediği, bu sayede substrat olarak cAMP'den ziyade cGMP'ye karşı seçiciliğinin olduğu belirtilmiştir. PDE4A'da yan-zincirin ters dönmesinden dolayı cAMP'ye karşı bir seçicilik söz konusudur ve ikili-substrat seçiciliği olan izoenzimlerde glutaminin serbest dönme yeteneğine sahip olduğu düşünülmektedir. **C**, fare PDE2A'nın GAF-AB dimerinin yapısı. Monomerlerden biri turuncu heliksler ve sarı  $\beta$ -kırmalı tabakalı olarak, diğeri ise mavi heliksler, yeşil tabakalar olarak gösterilmiştir. Her bir GAF-B domainine bağlı cGMP ise kırmızı ile gösterilmiştir [1].

Substrat bağlanma bölgesinin altında iki tane iki değerlikli metal bağlama bölgesi bulunmaktadır [1,4]. Metaller (çinko veya magnezyum) üç farklı bölgenin her birinde yer alan rezidüler ile düzenlenmektedir. PDE'nin yapısındaki metal iyonları oktahedral koordinasyon geometrisine sahiptir. Çinko, bu bölgede üç histidin, bir aspartat ve iki su molekülü ile koordinasyona girerken, magnezyum aynı aspartat ve beş su molekülü (bir tanesi çinko ile ortaklaşır) ile etkileşmektedir. Metal iyonlarının yapıyı stabilize ettiği ve hidroksitleri aktive ederek katalizde rol aldığı düşünülmüştür [46]. Metal iyonlarıyla bağ yapan histidin ve aspartat oldukça korunmuş rezidülerdir. Bu rezidüler, PDE'ler için özel olan tanıma diziliminin bir kısmını oluşturur ve HD(X<sub>2</sub>)H(X<sub>4</sub>) motifine sahiptir [1,42,44]. Katalitik bölgede yüksek oranda korunan rezidüler histidin ve arpartat olduğundan, bu rezidülerin iki değerlikli katyonları düzenlemede rol alabileceği ve bu nedenle de söz konusu proteinlerin aktiviteleri için gerekli olduğu düşünülmektedir [1]. Ayrıca, daha önceki çalışmalar göstermiştir ki iki değerlikli metal iyonları PDE'ler için önemli birer kofaktörlerdir. Örnek olarak, kalp veya böbrekten elde edilen PDE üzerine EDTA eklendiğinde, aktivitesinin neredeyse tamamını kaybettiği, ancak deney ortamına Mg<sup>2+</sup> eklendiğinde aktivitesini tekrar kazandığı gözlenmiştir. cAMP-PDE maksimum aktivitesine 10 mM veya daha fazla Mg<sup>2+</sup> ile tekrar ulaşılmıştır [42].

Katalitik bölge ile ilgili bir başka önemli nokta ise siklik nükleotid spesifikliğin nasıl belirlendiğidir. Bu konuda yapılan yapısal araştırmalara dayanarak elde edilen ilginç fikirlerden biri, "glutamine switch" yani glutamin-dönüşü teorisidir. Yapısı aydınlatılmış her bir PDE'de, pürin halkasını bağlanma bölgesinde kararlı tutan bir glutaminin olduğu görülmektedir (Şekil 1.4-B). Glutamin-dönüşü teorisine göre, PDE ailesinde sabit olarak bulunan glutaminin aktif bölgede aldığı pozisyona bağlı olarak cAMP ile etkileşirken, pozisyonunu değiştirdiğinde, 180° döndüğünde, cGMP ile etkileşmektedir [1,47]. Hem cAMP hem de cGMP ile uygun hidrojen bağlarının kurulması için, bu glutaminin dönme serbestliğinin olması şarttır. Mevcut yapısal bilgilere göre, her iki siklik nükleotidi de nispeten yüksek afinite ile hidroliz eden tüm PDE'lerde bu dönme serbestliği mümkün görünmektedir. Düşük substrat düzeyinde cAMP'ye oldukça spesifik olan PDE'lerde, cAMP'nin uygun pozisyonda bağlanması için bu glutaminin hareketi komşu rezidülerle olan H-bağı açısından dolayı kısıtlanmıştır. Buna karşılık, cGMP tercih eden PDE'lerde ise, mevcut H-bağı açısından dolayı glutaminin pozisyonu

cGMP'nin bağlanması kolaylaştıracak şekildedir. O halde, hem cAMP hem de cGMP'yi hidrolizleyen ikili-substrat spesikliği gösteren PDE'ler için glutamin dönmekte serbesttir ve bu "glutamin dönüşü" hipotezinin farklı fosfodiesterazlar arasındaki substrat seçiciliğinin moleküler temelini oluşturduğu görülmektedir (Şekil 1.5) [1,47,48]. Seçici PDE inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda, inhibitörlerin aktif bölgede bulunan hidrofobik rezidüleri ve nükleotid tanıma ve seçiminde oldukça önemli olan korunumlu glutamin rezidüsü ile yapılan H-bağları sayesinde aktif bölgeye bağlandığını göstermektedir [45,46].



**Şekil 1.5:** Nükleotid seçiminde Glutamin dönüşü mekanizması.(a) PDE4D-AMP, (b) PDE5A-GMP, (c) PDE1B-AMP, (d) PDE1B-GMP [47].

Katalitik domainin aksine, amino ve karboksil-terminal uçları amino asit dizilimleri açısından oldukça farklılık gösterirler ve bu sayede PDE ailesi içinde sınıflandırmaya olanak tanıyan özellikler ortaya çıkmaktadır [1,4,41,43]. N-terminal domaininin, katalitik domaini düzenleyici ve enzimin hücre içi lokalizasyonunu belirleyici görev aldığı düşünülmektedir [44,46]. PDE'lerin N-terminalindeki amino



asit dizilimi her bir aile içerisinde korunumlu bölgeler içermektedir ve bu dizilim sayesinde farklı düzenleme çeşitleri için özel bölgeler bulunmaktadır; küçük ligand/modülatör veya katalitik olmayan siklik nükleotid bağlanma bölgesi (GAF domaini-cGMP bağlayan PDE, *Anabaena* adenil siklaz, ve *E. coli* Fh1A transkripsiyon faktörü. Şekil 1.4-C), protein-protein etkileşim veya dimerleşme bölgesi, hidrofobik etkileşim bölgeleri, kinazlar için fosforilasyon bölgesi, Ca<sup>2+</sup>-kalmodulin bağlanma bölgesi ve membran hedeflemesinde görev almaktadır [1,41,44,46,47].

N-terminal domainine göre daha küçük olan C-terminal domaininde de bazı bölgelerin korunmuş olduğu bulunmuştur. Ancak, C-terminal domaininin fonksiyonel önemi henüz iyi bilinmemektedir. C-terminal domaininin ilave düzenleyici görevleri, lokalizasyonla ilgili görevleri veya dimerleşmede rolü olabileceği düşünülmektedir [42,44].

#### 1.1.4 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz İzoenzimleri

Başlangıçta, PDE'ler substrat spesifikliklerine, düzenlenme şekillerine ve DEAE iyon değişim kromatografisinden elüsyon sırasına göre sınıflandırılırlardı. Primer amino asit ve nükleotid dizilimlerinin ulaşılabilir hale gelmesi ile beraber, PDE ailesi primer dizilimlerdeki homolojiye dayanarak sınıflandırılmışlardır [1,28-31,34,41,44]. İlâveten, cAMP ve cGMP' yi hidroliz ettiği bilinen homolog olmayan başlıca iki enzim sınıfına, I ve II, da ayrılmışlardır. Memeliler ve sineklerde bulunan tüm PDE'ler, sınıf I'e girerken, maya ve protozoanlar sınıf I ve II PDE'leri içermektedir [31]. Memelilerde, 21 farklı gen tarafından kodlanan 11 farklı PDE ailesinin (PDE1-PDE11) olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir [1,28-31,34,41,42]. Ayrıca izomerlerin çoğu kendi içlerinde alt gruplara ayrılmış durumdadır. PDE ailesinin adlandırılması sistematik hale getirilmiştir. Örnek olarak, HSPDE1A: İlk 2 harf, HS (*Homo sapiens*), tür kökenini temsil eder, yani insan. Sonraki 3 harf, PDE, 3',5' siklik nükleotid fosfodiesteraz ve ardından gelen 1 veya 2 Arabik rakamlar ise bağlı bulunduğu siklik nükleotid fosfodiesteraz gen ailesini (11 PDE ailesinden birini) temsil eder. Daha sonra gelen büyük harf, A, ise söz konusu gen ürününün aile içerisindeki sıralamasını temsil eder [1,34,36,41,44].

Bu eşsiz PDE izoenzimleri, üç boyutlu yapıları, kinetik özellikleri, düzenlenme şekilleri, hücre içindeki konumu, hücresel ifadesi ve inhibitör hassasiyetleri bakımından farklılık gösterirler (Tablo 1.1-1.4) [1,28-31,34,41,43,44,48].

**Tablo 1.1:** PDE ailesinin sınıflandırılması [43,48].

PDE ailesi	Özgün Özellikleri	Substrat	Örnek İnhibitörler
<b>PDE1 (3)</b>	Ca <sup>2+</sup> /CaM-uyarımli	cAMP, cGMP	Nimodipin, IC86340, IC224, IC295, diyoklen, KS-505a, vinpocetin
<b>PDE2 (1)</b>	cGMP-uyarımli	cAMP, cGMP	EHNA, BAY-60-7750, PDP, IC933, oksindol, ND7001
<b>PDE3 (2)</b>	cAMP-selektif, cGMP-ile inhibe olan	cAMP>cGMP	Kilostamid, milrinon, siguazodan, kilostazol CI 930
<b>PDE4 (4)</b>	cAMP-selektif, cGMP-duyarsız	cAMP	Rolipram, roflumilast, NCS 613, Tibenelast
<b>PDE5 (1)</b>	cGMP-ile aktive olan, cGMP-spesifik	cGMP	Zaprinast, DMPP0, sildenafil, tadalafil, vardenafil
<b>PDE6 (3)</b>	cGMP-spesifik	cGMP	Seçici değil
<b>PDE7 (2)</b>	cAMP-spesifik, yüksek afinite rolipram-duyarsız	cAMP	BRL 50481, IC242, ASB16165
<b>PDE8 (2)</b>	cAMP-selektif, IBMX-duyarsız, rolipram- duyarsız	cAMP	PF-04957325
<b>PDE9 (1)</b>	cGMP-spesifik, IBMX- duyarsız	cGMP	BAY-73-6691, PF-04447943
<b>PDE10 (1)</b>	cGMP-duyarlı, cAMP-seçici	cAMP, cGMP	Papaverin, TP-10, MP-10
<b>PDE11 (1)</b>	cGMP-duyarlı, ikili spesiklik	cAMP, cGMP	Seçici değil

**Tablo 1.2:** PDE izoenzimlerinin kinetik özellikleri [1,41].

İzoenzim	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )		$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )		Bazı İnhibitörleri ( $K_i$ )
	cAMP	cGMP	cAMP	cGMP	
PDE1A	72,7-124	2,6-3,5	70-450	50-300	Vinpocetin (14 $\mu\text{M}$ ), W-7 (300 $\mu\text{M}$ )
PDE1B	10-24	1,2-5,9	10	30	
PDE1C	0,3-1,1	0,6-2,2	-	-	
PDE2A	30	10	120	123	EHNA (1 $\mu\text{M}$ )
PDE3A	0,18	0,02-0,15	3,0-6	0,34	Kilostamid (20nM), Milrinone (150nM), Zardaverin (IC <sub>50</sub> 0,5-2 $\mu\text{M}$ )
PDE3B	0,38	0,28	8,5	2,0	
PDE4A	2,9-10	-	0,58	-	Rolipram (1 $\mu\text{M}$ ), Ro 20-1724 (5 $\mu\text{M}$ ), Piklamilast (1 $\mu\text{M}$ ), Zardaveyn (IC <sub>50</sub> 0,8-4 $\mu\text{M}$ )
PDE4B	1,5-4,7	-	0,13	-	
PDE4C	1,7	-	0,31	-	
PDE4D	1,2-5,9	-	0,03-1,56	-	
PDE5A	290	2,9-6,2	1,0	1,3	Zaprinast (130nM), Sildenafil (10nM), Vardenafil (1nM), Tadalafil (10nM)
PDE6A/B	700	15	-	2300	Zaprinast (400nM), Dipiridamol (125nM), Sildenafil (50nM)
PDE6C	610	17	-	1400	
PDE7A	0,1-0,2	-	-	-	IBMX (4 $\mu\text{M}$ ), Dipiridamol (600nM)
PDE7B	0,03-0,07	-	-	-	
PDE8A	0,06	-	-	-	Dipiridamol (9 $\mu\text{M}$ )
PDE8B	0,10	-	-	-	
PDE9A	230	0,70-0,17	-	-	Zaprinast (35 $\mu\text{M}$ )
PDE10A	0,22-1,1	13-14	-	-	Dipiridamol (1 $\mu\text{M}$ )
PDE11A	2,0-3,2	0,95-2,1	-	-	Zaprinast (12 $\mu\text{M}$ ), Dipiridamol (0,4 $\mu\text{M}$ ), Tadalafil (60 $\mu\text{M}$ )

**Tablo 1.3:** PDE izoenzimlerinin dokulara dağılımları [1,29,48].

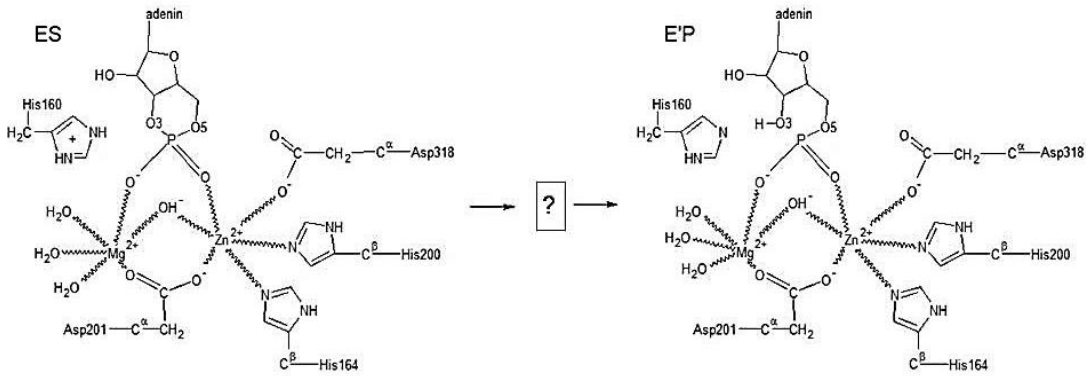
<b>PDE</b>	<b>Başlıca doku / organ</b>
<b>PDE1</b>	Düz kas, kalp, akciğer, beyin, sperm; PDE1A1 akciğer ve kalpte, PDE1A2 beyinde. PDE1B1 nöronlar, akyuvarlar ve düz kaslarda; PDE1B2 makrofajlar ve akyuvarlarda PDE1C Beyin, gelişen düz kaslar, spermatidler.
<b>PDE2</b>	PDE2A Adrenal bez, beyin, kalp, trombosit.
<b>PDE3</b>	Kalp, vasküler düz kas, yağ hücresi, karaciğer hücresi, böbrek, $\beta$ hücreleri, gelişen sperm, T lenfositleri, makrofajlar.
<b>PDE4</b>	PDE4A İmmün hücre, testis, hava yolu düz kası, beyin. PDE4B Çeşitli dokularda yüksek oranda mRNA tespit edilmiştir. En fazla göze çarpan beyin ve immün hücrelerdir. PDE4C Diğer PDE4 izoformlarına kıyasla daha kısıtlı bir dağılımı vardır; akciğer, testis ve başlıca nöronik olmak üzere birçok hücre dizisinde. PDE4D Çeşitli dokularda yüksek oranda mRNA tespit edilmiştir.
<b>PDE5</b>	PDE5A Akciğer, trombosit, düz kas, beyin, kalp, iskelet kası, böbrek.
<b>PDE6</b>	PDE6A/B Yüksek oranda, retinanın fotoreseptör katmanındaki çomak hücreler, beyin epifizi. PDE6C Yüksek oranda, retinanın fotoreseptör katmanındaki konik hücreler ve beyin epifizi.
<b>PDE7</b>	PDE7A İskelet kası, kalp, immün hücreler PDE7B Sıçanların beyin, kalp, karaciğer, iskelet kası, pankreas, testisinde mRNA bulunmuştur.
<b>PDE8</b>	PDE8A mRNA, birçok hücrede bulunmuştur ancak en fazla testis,dalak, ince ve kalın bağırsak, yumurtalık ve böbrek. PDE8B Beyin, tiroid.
<b>PDE9</b>	PDE9A böbrek, beyin, dalak, sindirim sistemiyle ilgili dokular ve prostat.
<b>PDE10</b>	En fazla beyin, testis, kalp ve tiroide bulunmuştur. PDE10A2'nin mRNA ifadesinin PDE10A1' den daha yüksek olduğu görülmüştür.
<b>PDE11</b>	PDE11A İskelet kası, böbrek, karaciğer, hipofiz, tükürük bezi. PDE11A1 en fazla iskelet kasında, PDE11A3 testise spesifik, PDE11A4 en fazla prostatta bulunmuştur.

**Tablo 1.4:** PDE izoenzimlerinin fonksiyonları [1].

<b>İzoenzim</b>	<b>Fonksiyonu</b>
<b>PDE1</b>	PDE1A vasküler düz kas kasılmalarını düzenlemede ve sperm fonksiyonlarında; PDE1B, dopaminerjik sinyalizasyonunda, immün hücre aktivasyonu ve varlığını sürdürmesinde; PDE1C, vasküler düz kas hücresinin çoğalmasında ve ayrıca sperm fonksiyonları ve nöronik sinyalizasyonunda görev almaktadır.
<b>PDE2</b>	Böbrek üstü bezlerinden aldosteron salınımını kontrol eder, kalpte Ca <sup>2+</sup> kanallarının cAMP ve PKA fosforilasyonu, nöronlarda cGMP' nin, uzun-dönem hafıza.
<b>PDE3</b>	PDE3A kalp kasılmasını düzenleme, trombosit agregasyonu, vasküler düz kas kasılması, ovosit olgunlaşması ve süt pıhtılaştırma enziminin salınımını düzenlenmesi; PDE3B insülin sinyalizasyonu, hücre döngüsü/gelişimini düzenleme, leptinin inhibe edici etkilerini düzenleme ve, ve insülin salgılamada ve renin salınımıyla ilgili diğer sinyallerle ilgili.
<b>PDE4</b>	En azından bir formu birçok hücrede ifade edilmiştir ve PDE4'ler, oldukça geniş bir işlem aralığına sahiptir. Bunlardan bazıları, beyin fonksiyonları, monosit ve makrofaj aktivasyonu, vasküler düz kas gelişimi, üretkenlik, damar genişlemesi,
<b>PDE5</b>	PDE5, vasküler düz kas kasılmasının düzenlenmesi, özellikle penis ve akciğer; trombositlerde agregasyonu kontrol etmek için NO-cGMP sinyalizasyonunda ve ayrıca beyinde cGMP sinyalizasyonu ile ilgili görevleri vardır.
<b>PDE6</b>	Gözde ışık tepkisinin sinyal iletiminde rol almaktadır; ayrıca, beyin epifizin melatonin salınımının kontrolünde de rol oynayabilir.
<b>PDE7</b>	T-hücre aktivasyonunda ve diğer iltihap hücrelerinin aktivasyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir.
<b>PDE8</b>	T-hücre aktivasyonunda, sperm veya Leydig hücre (testislerde bulunan ve testosteron hormonunu salgılayan hücre) fonksiyonlarında görev alabilir.
<b>PDE9</b>	PDE9'un görevi henüz bilinmemektedir ancak, beyinde NO-cGMP sinyalizasyonunda rol alabileceği düşünülmektedir.
<b>PDE10</b>	Beyinde cGMP'nin düzenleyicisi olduğu düşünülmekte ve öğrenme ve hafıza işlemlerinde rol alabilir.
<b>PDE11</b>	PDE11, muhtemelen sperm gelişimi ve fonksiyonunda rol oynamaktadır.

### 1.1.5 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz Enziminin Katalitik Mekanizması

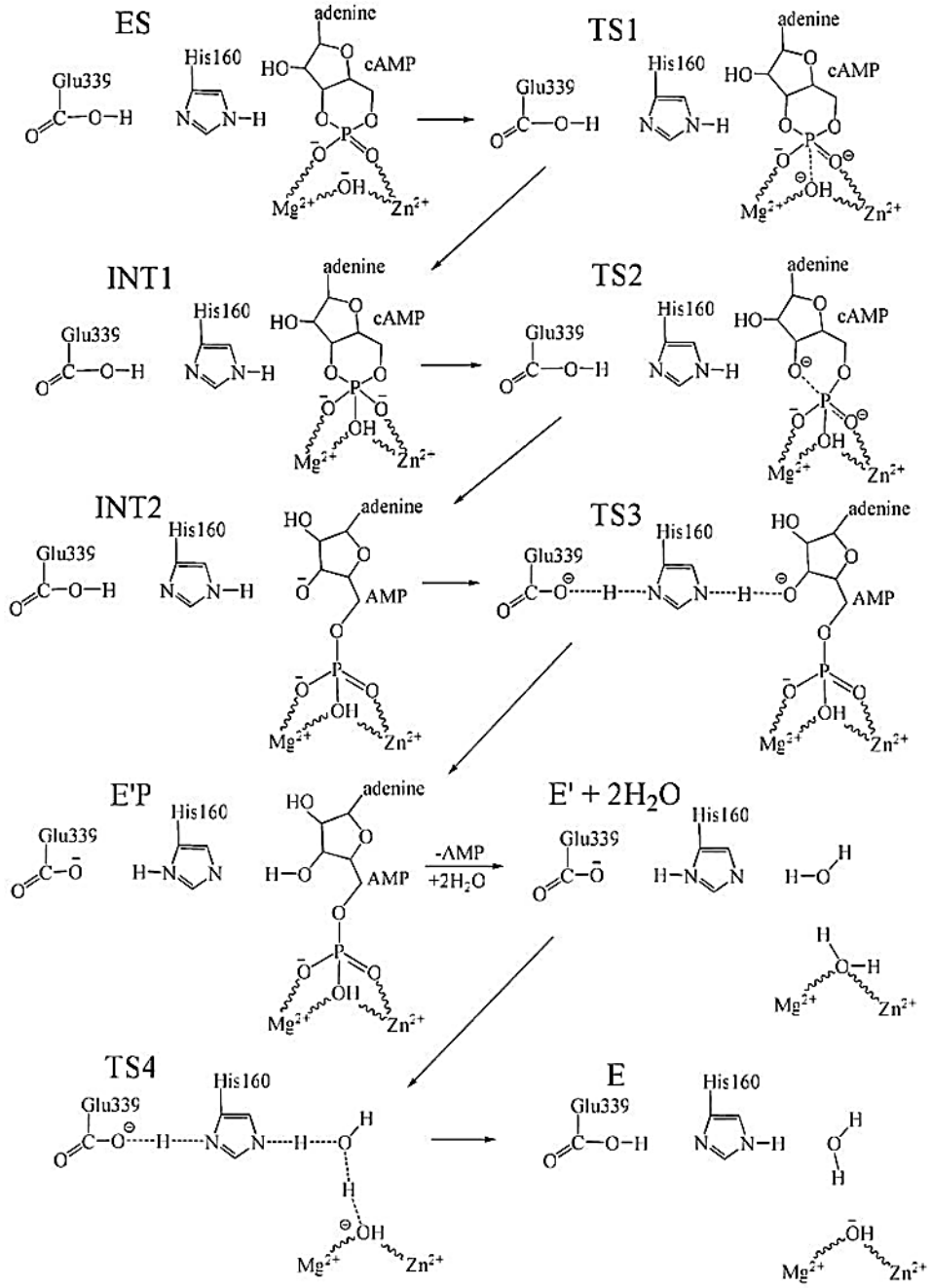
PDE'lerin yapısını ve siklik nükleotidlerin katalitik hidroliz mekanizmasını aydınlatmak için oldukça yoğun deneysel ve teorik çalışmalar yapılmıştır. PDE4D'nin AMP ile kompleks halde olduğu X-ışını kristal yapısına dayanarak öne sürülen binükleer katalitik mekanizması şekil 1.6'da gösterilmiştir [32,47,49].



**Şekil 1.6:** PDE4D'nin aktif bölgesinde cAMP hidrolizi için 2003'te Huai ve arkadaşları tarafından öne sürülen katalitik mekanizma [32].

Önerilen bu mekanizmaya göre, substrat cAMP PDE4D ile bağlandığında, cAMP'nin O3' atomu His160 rezidüsünün yan zinciri ile hidrojen bağı yapmaktadır ve cAMP'nin fosforil oksijen atomu M bölgesindeki bir veya her iki metal iyonu ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşimler, fosfodiester bağının polarize olmasına neden olur ve fosfor atomu üzerinde bir kısmi pozitif yük oluşur. cAMP fosfodiester bağının hidrolizinde, iki metal iyonu arasında köprü konumunda olan hidroksit iyonu nükleofil olarak görev yapar. Asp318, genel baz olarak davranarak köprü konumundaki su molekülünün hidroksit iyonu olarak nükleofilik saldırı yapması için aktive eder. Her iki metal iyonu ile etkileşimde bulunan Asp 201'in de nükleofile olan yakınlığından dolayı aktivasyona katkıda bulunduğu düşünülmektedir [49]. cAMP'nin O3'atomuna yaklaşık 4Å uzaklıkta bulunan His160'ın O3' atomuna bir proton vermesi ile fosfodiester bağının hidrolizi tamamlanmış olur [32,49].

Chen ve arkadaşları (2011), PDE tarafından kataliz edilen cAMP hidroliz mekanizmasını gösteren tam ve detaylı bir çalışma bulunmadığını ve ayrıca bu reaksiyon gerçekleşirken proteinin içinde bulunduğu ortamın etkilerinin hesaba katılarak bir reaksiyon koordinasyon hesaplamasının yapılmadığını belirtmişlerdir. Bundan dolayı, Chen ve arkadaşları (2011), bilgisayarlı hesaplama metotlarını (QM/MM-FE, QM/MM-PBSA) kullanarak PDE4 tarafından cAMP'nin hidroliz reaksiyonu mekanizmasını detaylı bir şekilde belirtmişlerdir. Önerdikleri mekanizmada PDE4D'nin X-ışını kristal yapısını (PDB ID, 1TB7) ve trans konformasyondaki cAMP yapısını kullanarak optimize edilmiş Michaelis-Menten ES (PDE4-cAMP) kompleksi hazırlanmıştır ve sonraki işlemler bu yapıdan yola çıkılarak devam ettirilmiştir [32]. Önerilen detaylı mekanizma (Şekil 1.7) iki aşama içermektedir: 1. aşama, cAMP'nin hidrolizi ve 2. aşama, substrat olmayan PDE4 aktif bölgesinde hidroksit iyonunun rejenerasyonu. 1. aşama reaksiyonları sırasıyla; cAMP'nin PDE4 aktif bölgesine bağlanması, hidroksit iyonu tarafından cAMP'nin fosfor atomuna nükleofilik saldırı, cAMP'deki 3'-fosfoesterik bağın kırılması, O3' atomunun protonlanması ve hidroliz ürünü AMP'nin PDE4 aktif bölgesinden ayrılması şeklindedir. 2. aşama reaksiyonları ise; çözücü su moleküllerinin aktif bölgeye bağlanması ve aktif bölgede köprü konumundaki hidroksit iyonunun rejenere edilmesidir [32].



**Şekil 1.7:** PDE4 tarafından katalizlenen cAMP hidroliz reaksiyon mekanizması. Daha net anlaşılması açısından, His164, His200, Asp201, Asp318, Asn321, ve Gln859 rezidüleri şekilde gösterilmemiştir [32].



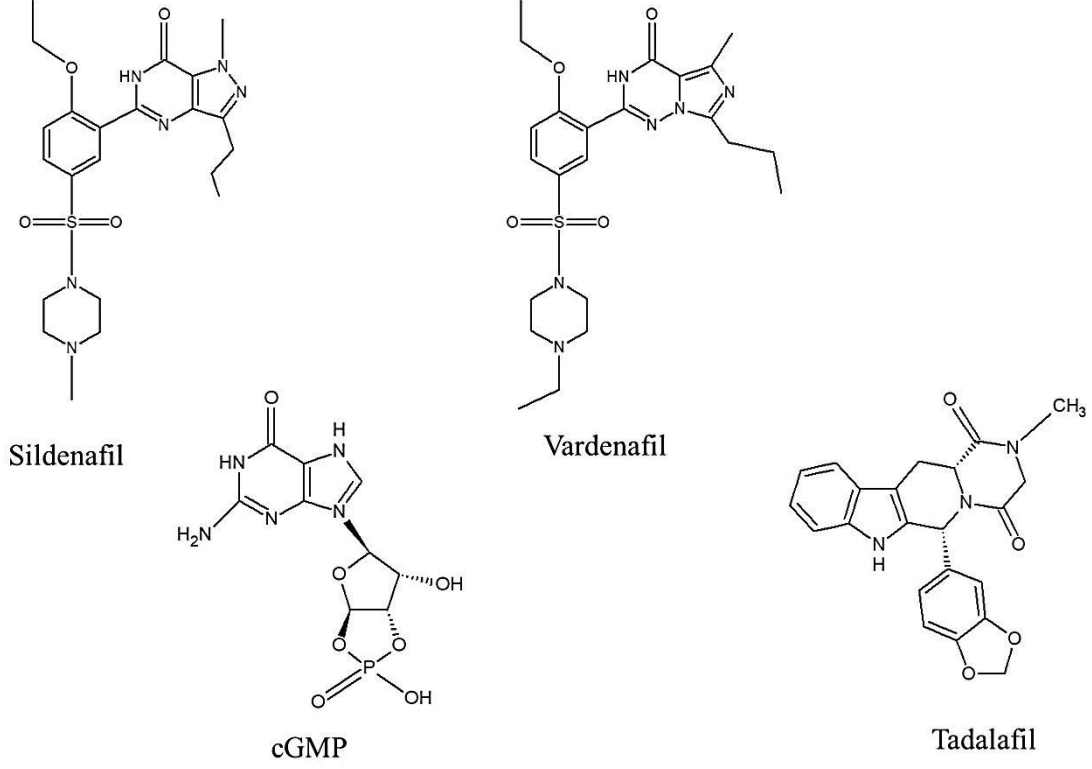
### 1.1.6 Sıklık Nükleotid Fosfodiesteraz İnhibitörleri

Bir alkaloid olan **vinpocetin**, ilk olarak Cavinton™ ticari adıyla 1978'de piyasaya sürülmüştür ve bir çok ülkede genel olarak beyin damar hastalıkları ve bilişsel bozukluk, kalp krizi, yaşlılığa bağlı bunama, hafıza karışıklığı gibi rahatsızlıkların tedavisi için kullanılmıştır [50-52]. Vinpocetin bir serebral vazolitördür ve bu sayede: 1) serebral damarların genişlemesini sağlayarak kanın beyine akışını artırır; 2) oksijen ve glukoz kullanımını ve ayrıca nöral ATP sentezini artırarak beyin metabolizmasını iyileştirir [50,51]; 3) kanın vizkozitesini düşürür ve pıhtı oluşumunu engeller [50]. Vinpocetin, bilinen en yaygın PDE1 inhibitörüdür ve fenodiazinler gibi diğer PDE1 inhibitörlerinin aksine inhibisyonu CaM'e bağlanarak değil direkt PDE1'i katalitik bölgesinde inhibe ederek gerçekleştirir. [6,47,53]. Başlangıçta vinpocetin sadece PDE1'i inhibe ettiği düşünülmekteydi (IC50=9,7 µM), ancak yapılan çalışmalar göstermiştir ki vinpocetin PDE5'e karşı da hemen hemen aynı oranda aktivite göstermekte ve ayrıca PDE7'yi de inhibe etmektedir (IC50=59 µM) [4, 6, 46]. Vinpocetin PDE1'in bilinen en yaygın inhibitörü olduğu bilinmesine rağmen PDE1'e karşı seçiliğinin düşük olması, sudaki çözünürlüğünün düşük olması, yarı ömrünün kısa olması (1-2 saat), insanlarda ağız yoluyla alınabilirliğinin düşük olması gibi nedenler bu inhibitörün dezavantajlarındandır [46,52].

Başlangıçta vazolitör özelliğinden dolayı hipertansiyon ve kalp ağrısı olarak da bilinen anjina rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılması hedeflenen bir PDE5 inhibitörü olan **sildenafil**, 1998 yılında Viagra™ ticari adıyla ED tedavisi için başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanan ilk PDE5 inhibitörüdür [54,55]. PDE5 için IC50 değeri 3,9 nM olan sildenafilin PDE6'ya kıyasla seçiciliği 10 kat, PDE2-4'e 1000 kat daha fazladır. Lipofilik bir molekül olan sildenafilin yağlı yiyeceklerle beraber alınması, ilacın emilimini ve etkisini düşürmektedir. Sildenafil başlıca yan etkileri olarak baş ağrısı, cilt kızarması, rinit, hazımsızlık ve görme bozuklukları gelmektedir [56]. Bu yan etkilerinin başında gelen görme bozukluklarının, sildenafilin PDE5'in yanısıra retina-spesifik PDE olan PDE6'yı da ve ayrıca yüz kızarıklığı ve baş ağrısı gibi yan etkilerinin de PDE1'i inhibe etmesiyle meydana geldiği düşünülmektedir [54-58]. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki mevcut yan etkilerine rağmen, sildenafil ED tedavisinde kullanılan etkili ve güvenli bir ilaçtır [56].

Sildenafilin ED tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmasının ardından yeni PDE5 inhibitörlerinin araştırılması hız kazanmıştır. Sildenafil gibi PDE5'in seçici ve kompetitif bir inhibitörü olan **vardenafil** (IC50=0,7 nM) [56,58], Levitra™ ticari adıyla, 2003 yılında ED tedavisi için kullanılmaya başlananan ikinci PDE5 inhibitörüdür [54,56]. Sildenafilden farklı olarak vardenafilin PDE5'e karşı seçiciliği, PDE6'ya kıyasla 15 kat, PDE1'e kıyasla 130 kat, PDE11'e kıyasla 300 kat ve PDE2,3,4,7,8,9,10'a kıyasla 1000 kat daha fazladır. Sildenafilin aksine, vardenafilin emilimi ve etkisi yağlı yiyeceklerle tüketiminden etkilenmemektedir [56]. Sildenafil gibi vardenafil de, baş ağrısı, cilt kızarması, baş dönmesi, hazımsızlık, sinüzit ve görme bozuklukları gibi yan etkilere sahiptir [54,59]. Vardenafilin, sildenafille kıyasla PDE5'e karşı daha seçici olması daha düşük dozda kullanılmasını sağlamaktadır. Ancak buna rağmen, sildenafilin biyoyararlığı yaklaşık %40 iken, vardenafilde bu oran %15 civarındadır [56].

Erektile disfonksiyonu tedavisinde kullanılan en önemli PDE5 inhibitörlerinden bir diğeri ise yine 2003 yılında Cialis™ ticari adıyla kullanılmaya başlanan **tadalafildir**. Tadalafil de başlangıçta kardiovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılmak için geliştirilmiş bir PDE5 inhibitörüdür [60]. Tadalafil, molekül yapıları benzer olan sildenafil ve vardenafilin yapısal olarak oldukça farklıdır ve bunun sonucu olarak da farklı farmakolojik ve klinik etkilere sahiptir [56,60]. Tadalafilin PDE5'e karşı seçiciliği PDE6'ya kıyasla 700 kat, PDE1-4 ve PDE7-10'a kıyasla 10000 kat, PDE11'e kıyasla 5 kat daha fazladır. PDE5 için 0.94 nM IC50 değerine sahip olan tadalafilin biyoyararlılık yüzdesi de %36'dan fazladır [56]. Tadalafilin emilimi ve etkisi sildenafilin aksine gıda tüketimine bağlı olarak değişmemektedir [61]. Tadalafil moleküler yapı olarak sildenafil ve vardenafilin farklı olmasına rağmen, her üç ilacında yapısında bulunan cGMP'ye benzer merkezi bir halkaya sahip heterosiklik azot içeren ikili-halkalı sistem sayesinde yarışmalı olarak PDE5'in katalitik bölgesine bağlanmaktadır (Şekil 1.8) [60,61].



**Şekil 1.8:** cGMP, sildenafil, vardenafil ve tadalafilin kimyasal yapıları.

İskelet kası, prostat ve testiste bulunan PDE11'in tadalafil tarafından inhibisyonunun sonuçları klinik olarak henüz tam olarak aydınlatılmamıştır ancak testis fonksiyonlarına ve sperm genetiğine zararlı bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Tadalafil kullanımında en çok rastlanan yan etkiler arasında, baş ağrısı, yüzde kızarıklık, hazımsızlık, kas ve sırt ağrısı gelmektedir [56,61]. Sildenafil ve vardenafilin aksine, tadalafilin PDE6'ya karşı inhibisyon etkisinin çok daha düşük olması sonucu tadalafil kullanımında yan etki olarak görme bozukluklarının görülmesi de %0,1'den daha azdır[60]. Tadalafil kullanımında görme bozukluklarının oldukça düşük oranlarda görülmesi ve ayrıca tadalafilin yarı ömrünün (17,5 saat), sildenafil ( $3,82 \pm 0,84$  saat) ve vardenafil ( $3,94 \pm 1,31$  saat) göre daha uzun olması, tadalafili bu iki ilaç karşısında oldukça güçlü bir alternatif haline getirmiştir [56,61].

## 1.2 Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (CA, E.C. 4.2.1.1), geri dönüşümlü olarak karbondioksitin hidratasyonunu ve bikarbonat iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen, aktif bölgesinde çinko iyonu içeren bir metaloenzimdir [9]. CA enzimi, CO<sub>2</sub>'in geri dönüşümlü hidratasyonunun yanısıra aldehitlerin hidratasyonu ve karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonları da katalizleyebilmektedir [62,63].

Şu ana kadar altı farklı CA ailesi ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -, ve  $\eta$ -) tanımlanmıştır [64].  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -CA enzimleri aktif bölgelerinde Zn(II) iyonları,  $\gamma$ -CA enzimleri Fe(II),  $\zeta$ -CA enzimleri Cd(II) veya Zn(II) iyonlarını kullanırken, Supuran grubu tarafından yeni keşfedilen  $\eta$ -CA enzimleri hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır [17,64]. CA enzimlerine birçok organizmada, farklı doku ve hücrelerde rastlanmıştır.  $\alpha$ -CA enzimleri omurgalılar, tek hücreliler, alg, yeşil bitkilerin sitoplazmasında ve bazı bakterilerde bulunurken,  $\beta$ -CA enzimleri başlıca bakterilerde, alg, birçok mantarlarda ve bazı arkelerde bulunmaktadır.  $\gamma$ -CA enzimleri arkede, siyanobakterilerde ve çoğu bakterilerde bulunurken,  $\delta$ - ve  $\zeta$ -CA enzimleri deniz tek hücrelileri ve  $\eta$ -CA enzimleri ise tek hücrelilerde bulunmaktadır [64].

Memelilerde şu ana kadar, sitozol, mitokondri, eritrositler, sindirim kanalı, göz, akciğerler, testisler, beyin, böbrek, iskelet kasları, pankreas, kalp kasları, karaciğer, tükrük bezleri gibi, farklı hücre içi ve doku dağılımı gösteren 16  $\alpha$ -CA izoformu tanımlanmıştır [14-17]. CA I-III, VII, XIII sitozolik, CA IV, IX, XII, XIV, ve XV membrana bağlı, CA VA ve CA VB mitokondrial ve CA VI tükrük ve süt salgılarında bulunmaktadır [65]. CA izoenzimleri metabolizmada, solunum, pH ve CO<sub>2</sub> homeostazi, elektrolit sekresyonu, lipogenez, üregenez, glukoneogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu, fotosentez, hücre büyümesi ve üreme yolu da dahil olmak üzere oldukça önemli birçok fizyolojik ve patolojik süreçte görev almaktadır [10-13]. Eritrositlerde, doku kılcallarında metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>'in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ye, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'nin CO<sub>2</sub>'e dönüşümü reaksiyonu CA'nın en önemli fonksiyonudur. Bu reaksiyon sayesinde, CA hayati bir olay olan solunum olayında yer almaktadır. Aynı reaksiyonlarla, böbrek tubullerinde Na<sup>+</sup> ve H<sub>2</sub>O geri emilimini sağlamak için ya CO<sub>2</sub> transferi ya da H<sup>+</sup> iyonu birikimi CA enzimi tarafından sağlanır. CA enzimi

tarafından gerçekleştirilen bu reaksiyonlar, omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon olan bikarbonat tampon sisteminini oluşturduğundan oldukça önemlidir [9,65,67].

Sitozolde bulunan ve üzerinde en fazla araştırma yapılan hCA izoformları hCA-I (30 kDa) ve hCA-II (29,3 kDa) izoenzimleridir. Eritrositlerde hemoglobinden sonra en fazla bulunan hCA-I izoenzimi, çözüner karakterdedir ve hCA-II'ye kıyasla yaklaşık 6 kat daha fazla bulunmaktadır. Ancak, hCA-I'in aktivitesi hCA-II'nin yaklaşık %15'i kadardır. hCA-I, eritrositlerde, kolon epitelyumunda, korneal epitelyumda, lenste, ter bezlerinde ve adipoz dokuda bulunur [11,66]. hCA-I daha çok eritrositlerde bulunurken, hCA-II gözde lensler ve retina müller hücreleri, eritrositler, trombositler, karaciğer, böbrek, pankreatik kanal hücreleri, gastrik parietal hücreleri, endotel hücreleri, spermatozoa, kemikte osteoklastlar, beyin, beyin epitelyumu gibi birçok doku ve organda bulunmaktadır [11]. hCA-II'nin kalıtsal eksikliği, CA-II eksikliği sendromu olarak belirlenmiştir. Bu sendromun, kemiklerde kireçlenme, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir [67]. hCA-II, hCA-I'e göre oldukça aktif bir izoenzim olup, bilinen enzimlerden katalitik aktivitesi (turnover sayısı) en yüksek olan enzimdir ( $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) [11]. Gözde bulunan CA-II, bikarbonatça zengin humor aköz (göz içi sıvısı) üretimini tetikleyerek görme olayında da yer almaktadır. Bazı patolojik durumlarda, göz içi basıncının artması sonucu oluşan ve %15-20 oranı ile dönüşümsüz körlüğe neden olan glokom hastalığı meydana gelir. Göz içi basıncının artmasına neden olan CA-II'nin önemi, glokom hastalığı tedavisinde CA-II inhibitörlerinin kullanımı ile ortaya çıkarılmıştır [14,66,68,69]. CA-II izoenziminin inhibisyonu sonucu silyer epitelin salgı aktivitesi 2/3 oranında azalmaktadır. Glokom hastalığının tedavisi için 40 yılı aşkın bir süredir CA inhibitörleri kullanılmaktadır [68,69]. Başta, CA'nın güçlü inhibitörlerinden olan asetazolamid kullanılmıştır ancak oral yolla verilen asetazolamidin CA-II yanında diğer izoenzimleri de inhibe etmesi önemli yan etkiler ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, CA-II enzime spesifik bir çok sülfonamid türevleri sentezlenmiş ve inhibisyon etkileri araştırılmıştır [14,68]. hCA-I ve hCA-II, retinal ve serebral ödem, glokom, epilepsi, obezite ve yükseklik hastalığı gibi bir çok hastalıkla bağlantılı olduğu ve bu hastalıkların tedavisinde söz konusu izoenzimlerin aktivatörlerinin veya inhibitörlerinin kullanıldığı da bilinmektedir [17,18].

### 1.3 Paraoksonaz Enzimi

Paraoksonaz (PON), karaciğerde sentezlenen, hem paraoksonaz (EC 3.1.8.1) hem de arilesteraz (EC 3.1.1.2) aktivitesine sahip, yapısında kalsiyum bulunan bir ester hidrolazdır. [19,20]. Paraoksonaz, organofosforlu bir insektisit olan parationun oldukça toksik olan metaboliti paraoksonu hidroliz etme özelliğinden dolayı bu şekilde adlandırılmıştır [20,21].

PON gen ailesi insan kromozom7 üzerinde yer almakta ve PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır [21,22,70]. Yapısal olarak oldukça benzer olan bu üç izoenzimden PON1ve PON3 izoenzimleri karaciğerde sentezlenmekte ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır. Ayrıca PON3 izoenziminin düşük oranlarda böbrekte de sentezlendiği bilinmektedir [71,72]. PON3, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz olarak tanımlanmıştır [74]. PON1 ve PON3 izoenzimlerinden farklı olarak, PON2 izoenzimi plazmada bulunmamaktadır. Ancak, beyin, karaciğer, böbrek ve testis gibi dokularda sentezlenmektedir [71,72]. PON2 ve PON3, 105.pozisyonunda lisin rezidüsü bulundurmadıkları için paraoksonu hidroliz edemezler [73].

Söz konusu izoenzimler içinde en fazla çalışma yapılanı PON1'dir. İnsan PON1 (hPON1), 43-45 kDa ağırlığında, 354 aminoasitten oluşmaktadır. Aktivitesi ve kararlılığı için  $Ca^{+2}$  iyonuna ihtiyacı olan PON1, karaciğerde sentezlenip kana HDL'ye bağlı şekilde salınan bir glikoproteindir. PON1 ayrıca, karaciğerde mikrozomlarda da bulunmaktadır [21,22,65]. PON1'in fizyolojik substratı henüz aydınlatılamamıştır ancak arilesteraz, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu bilinmektedir [70,73]. PON1 aktivitesini belirlemek için kullanılan en yaygın substratlar paraoksan ve fenil asetatdır [74].

PON1'in metabolizmada başlıca üç önemli role sahip olduğu bilinmektedir: 1- Antioksidan, 2- Detoksifikasyon, 3- Antibakteriyel. Serumda PON1, LDL oksidasyonunu ve lipit peroksitlerinin oluşumunu inhibe etmesi ile antioksidan özelliği gösterir [21,23]. Bunu sahip olduğu laktonaz aktivitesiyle gerçekleştirilmektedir ve bu sayede ateroskleroza karşı da koruyucu bir görev üstlenmektedir [72,73]. Ayrıca detoksifikasyon sürecinde, PON1 önemli fizyolojik işleve sahiptir. PON1 bu aktivitesi ile paration, diazinon ve klorpirifos gibi pestisitlerin çevresel tehdit olan toksik metabolitlerini ve sarin, somon gibi terörist saldırılarda da kullanılan sinir gazlarının da içinde bulunduğu birçok organofosfat

bileşiklerinin detoksifikasyonunu sağlar [21,24]. PON tarafından paraoksanın yıkımı sonucu oluşan p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri paraoksona oranla daha az zararlıdır [71]. Diğer yandan PON1'in, laktonaz aktivitesi ile antibakteriyel etkisi de dikkat çekmektedir [25].

Antioksidan, detoksifikasyon ve antibakteriyel etkilere sahip olan PON1'in aktivitesi ve düzeyi bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Bunlardan bazılarının, sigara kullanımı, yüksek kolesterol, obezite, böbrek yetmezliği, kalp damar hastalıkları, romatizmal kireçlenme, yüksek tansiyon ve tip 2 şeker hastalığı olduğu belirlenmiştir [65,72,75]. Ayrıca PON1'in aktivitesinin yaşa ve cinsiyete bağlı olarak değiştiği de gözlenmiştir [73]. PON1, çoğunluğu nörotoksik olan organofosfat bileşiklerini ve lipit peroksidlerini detoksifiye edebilme özelliğinden dolayı, Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik hastalıklara karşı hassasiyetin belirlenmesinde de anahtar element haline gelmiştir [75].

## 2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

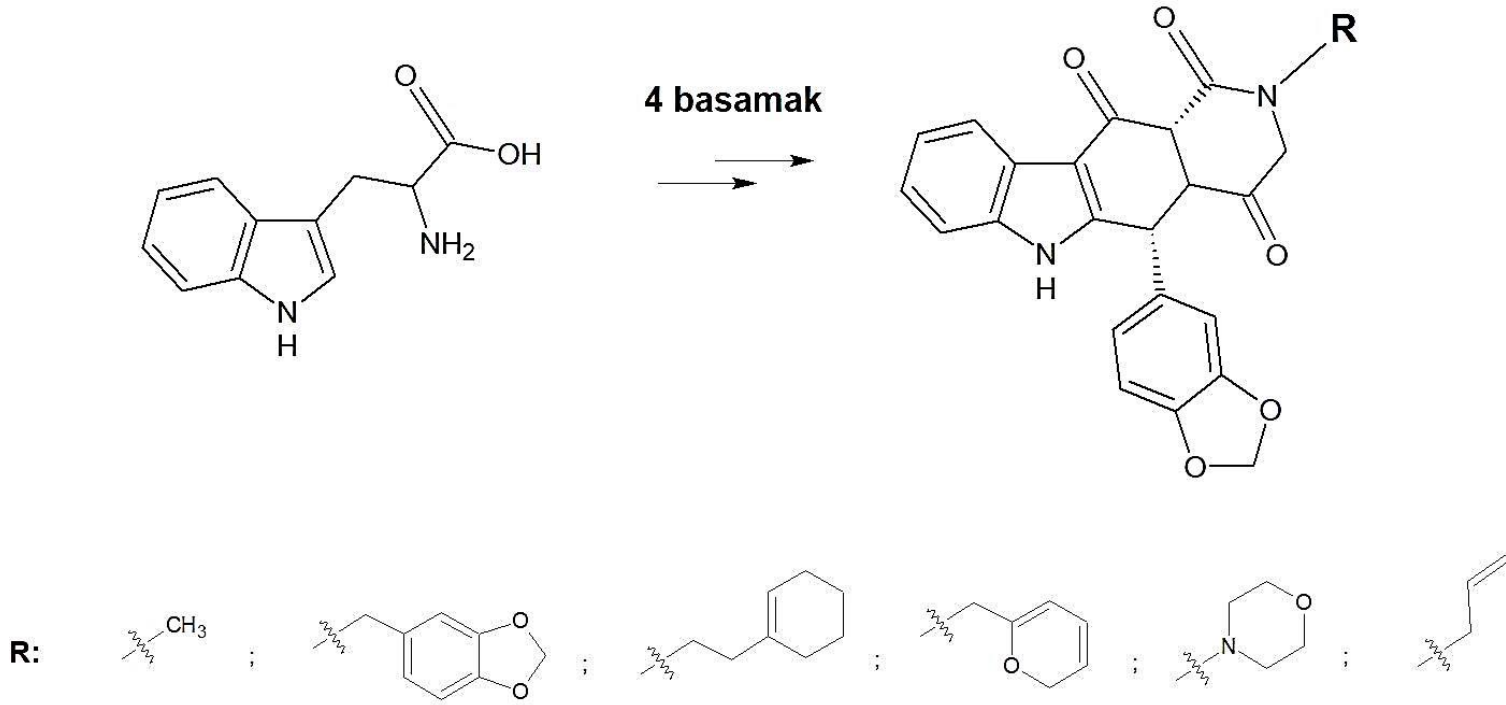
### 2.1 Materyaller

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan p-nitrofenil asetat, paraoksan-etil, Tris-baz, tris-HCl, sodyum hidroksit, sodyum sülfat, sodyum klorür, sodyum asetat, sodyum perklorat, sülfürik asit, aseton, disodyum hidrojen fosfat, hidroklorik asit, amonyum sülfat, dimetil sülfoksit, sodyum dodesil sülfat, gliserol,  $\beta$ -merkaptolanol, Bromofenol mavisi, glisin, Coomassie brilliant blue G-250, asetik asit, metanol, etanol, n-bütanol, akrilamid, N,N'-metilenbisakrilamid, amonyum persülfat, Merck veya Sigma Chemical'dan temin edilmiştir. SDS-PAGE'de kullanılan protein marker ThermoFisher Scientific'ten temin edilmiştir. PDE1 enzim aktivite tayini için kullanılan siklik nükleotid fosfodiesteraz analiz kiti (Katalog # BML-AK800), Enzo Life Sciences'dan temin edilmiştir.

PDE1, hCA-I, hCA-II ve hPON1 enzimleri üzerindeki etkileri incelenen bileşikler, Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü, Organik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda, Doç. Dr. Mustafa Zengin ve ekibi tarafından sentezlenen yeni tadalafil türevleridir. Çalışmada kullanılan bileşiklerin sentez şeması şekil 2.1'de verilmiştir. Söz konusu moleküllerin şekilleri ve moleküler ağırlıkları tablo 2.1'de gösterilmiştir.





**Şekil 2.1:** Tadalafil ve türevlerinin oluşum şeması ve kullanılan R grupları.

**Tablo 2.1:** İnhibisyon çalışmalarında kullanılan bileşiklerin şekilleri ve molekül ağırlıkları.

Bileşiğin Adı		Molekül Şekli	Molekül Ağırlığı (g/mol)
<b>Tadalafil</b>	(5 <i>R</i> ,11 <i>aR</i> )-5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-il)-2-metil-2,3,4 <i>a</i> ,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]karbazol-1,4,11(6 <i>H</i> ,11 <i>aH</i> )-trion		389,14
<b>Alliltadalafil</b>	(5 <i>R</i> ,11 <i>aR</i> )-2-alil-5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-il)-2,3,4 <i>a</i> ,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]karbazol-1,4,11(6 <i>H</i> ,11 <i>aH</i> )-trion		415,15
<b>Furfuriltadalafil</b>	(5 <i>R</i> ,11 <i>aR</i> )-5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-il)-2-(furan-2-ilmetil)-2,3,4 <i>a</i> ,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]karbazol-1,4,11(6 <i>H</i> ,11 <i>aH</i> )-trion		455,15
<b>Morfolintadalafil</b>	(5 <i>R</i> ,11 <i>aR</i> )-5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-il)-2-morfolin-2,3,4 <i>a</i> ,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]karbazol-1,4,11(6 <i>H</i> ,11 <i>aH</i> )-trion		488,21
<b>Sikloheksiltadalafil</b>	(5 <i>R</i> ,11 <i>aR</i> )-5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-il)-2-(2-(sikloheks-1-en-1-il)etil)-2,3,4 <i>a</i> ,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]karbazol-1,4,11(6 <i>H</i> ,11 <i>aH</i> )-trion		483,22
<b>Piperoniltadalafil</b>	(5 <i>R</i> ,11 <i>aR</i> )-5-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-il)-2-(benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioksol-5-ilmetil)-2,3,4 <i>a</i> ,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]karbazol-1,4,11(6 <i>H</i> ,11 <i>aH</i> )-trion		509,16

### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada tablo 2.2’de belirtilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır:

**Tablo 2.2:** Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar.

<b>Soğutmalı Santrifüj</b>	Sigma Laborzentrifügen 3K 15/ 10706/ 10707
<b>pH Metre</b>	Orion-Model 920A
<b>Mikroplaka okuyuculu UV- Spektrofotometre</b>	Biotek Power Wave XS
<b>Mikroplaka okuyuculu Florimetre</b>	Thermoscientific Varioskan Flash 4. 00. 53
<b>Manyetik Karıştırıcı</b>	ARE Magnetic, Heating Stirrer IKA Combimag RCO
<b>Hassas Terazi</b>	Libror, AEG-220 (Shimadzu)
<b>Otomatik Pipetler</b>	Eppendorf, Medisis
<b>Elektroforez Sistemi</b>	BIORAD
<b>Kromatografi Kolonu</b>	Sigma (1,5x10 cm)
<b>Vorteks</b>	Fisions Whirli Mixer
<b>Gradient Mikser</b>	Atta Magnetik karıştırıcı ve Gradient Tüp
<b>Buz Makinesi</b>	Fiocchetti AF 10
<b>Çalkalayıcı</b>	Biolab 1575-2B Çalkalayıcı

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal işlemlerde kullanılan çözeltiler, hazırlanışları ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir.

#### 2.1.3.1 PDE1 aktivite tayini için kullanılan çözeltiler

PDE1 enzimi aktivite deneylerinde Enzo Life Sciences’dan tedarik edilen “Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Assay” kiti BML-AK800 kullanılmıştır. Kite bulunan ve deneylerde kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilmiştir.

- 4U liyofilize sığır beyin PDE1 enziminin (BML-KI456-0020) buz kabı içinde çözünmesi sağlanarak liyofilize enzim tüpüne 200 µL PDE1 analiz tamponu eklendi ve 20 U/mL konsantrasyonunda enzim stoğu hazırlandı.
- 10mM Tris-HCl, pH 7,4, 125mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, %10 (h/h) gliserol karışımı içerisinde bulunan 5 kU/µl *Crotalus atrox* zehirinden elde edilen 5'-Nükleotidaz enzimi (BML-KI307-5000) kitte verildiği konsantrasyonda kullanıldı.
- 1 mM 3',5'-cAMP stok çözeltisinden 0,5 mL alınarak, PDE1 analiz tamponu eklenerek 0,5 mM cAMP çözeltisi hazırlandı.
- PDE1 analiz tamponu (BML-KI181-0040): 10 mM Tris-HCl, pH 7,4.
- BIOMOL GREEN ayıracı (BML-AK111-9090).
- 100 µM 5'-AMP stok çözeltisinden sırasıyla 150 µL ve 100 µL alındı ve PDE1 analiz tamponu ile 200 µL'ye tamamlanarak 75 ve 50 µM konsantrasyonlarında stok 3',5'-cAMP çözeltileri hazırlandı.
- 200 µM IBMX çözeltisi (PDE1 analiz tamponu içinde).

### 2.1.3.2 Afinite jeli dengeleme tamponu:

25 mM Tris-baz, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,7); 3,0275 g (25 mmol) Tris-baz ve 14,20 g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH'sı 8,7'ye ayarlanarak hacim 1 L'ye tamamlandı.

### 2.1.3.3 Afinite jeli yıkama tamponu:

25 mM Tris-baz, 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,7); 3,0275 g (25 mmol) Tris-baz ve 3,124 g (22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH'sı 8,7'ye ayarlanarak hacim 1 L'ye tamamlandı.

#### **2.1.3.4 Afinite jeline bağlanmış hCA-I elüsyonu için kullanılan tampon:**

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 M NaCl tamponu (pH 6,3); 3,55 g (25 mmol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 29,25 g (0,5 mol) NaCl 450 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH'sı 6,3'e ayarlanarak hacim 500 mL'ye tamamlandı.

#### **2.1.3.5 Afinite jeline bağlanmış olan hCA-II elüsyonu için kullanılan tampon:**

0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO, 0,5M NaClO<sub>4</sub> tamponu (pH 5,6); 10,5345 g (0,075 mol) NaClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 1,23 g (0,015 mol) NaCH<sub>3</sub>COO 120 mL distile suda çözülerek 1 M HCl ile pH'sı 5,6'ya ayarlanarak hacim 150 mL'ye tamamlandı.

#### **2.1.3.6 CA esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon:**

0,05 M Tris-SO<sub>4</sub>(pH 7,4); 6,055 g (0,05 mol)Tris-baz 950 mL distile suda çözülerek 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e ayarlanarak hacim 1L'ye tamamlandı.

#### **2.1.3.7 CA esteraz substratı:**

3 mM p-nitrofenil asetat çözeltisi; 27,2 mg p-nitrofenil asetat 1 mL asetonda çözüldükten sonra balon jode hızlıca karışan 49 mL distile suya yavaş yavaş eklendi. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi tayininde kullanılan çözelti çalışma günü taze olarak hazırlandı.

#### **2.1.3.8 Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon:**

1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,0); 17.8 g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 132,14 g (1 mol) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 950 mL distile suda çözülerek, 1 M HCl ile pH 8,0'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.

### **2.1.3.9 Hidrofobik jele bağlanmış PON1 enziminin elüsyonu için kullanılan tampon:**

Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tamponu (pH 8,0) ve 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tuzsuz tamponu ile gradient mikser kullanılarak tuz gradienti oluşturuldu; 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tamponu için, 17,8 g (0,1 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  950 mL distile suda çözüldükten sonra pH 8,0'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.

### **2.1.3.10 Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu oluşan çökeleğin alındığı tampon:**

0,1 M Tris-baz tamponu (pH 8,0); 1,211 g (0,01 mol) Tris-baz 95 mL distile suda çözülerek, 1 N HCl ile pH 8,0'e ayarlanarak son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

### **2.1.3.11 PON aktivite ölçümünde kullanılan bazal aktivite tamponu:**

2 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0); 3,0285 g (25 mmol) Tris-HCl 200 mL distile suda çözülerek 1 N HCl ile pH 8,0'e ayarlandı. 0,0555 g (0,5 mmol)  $\text{CaCl}_2$  eklenerek son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

### **2.1.3.12 PON substrat çözeltisi:**

2 mM paraoksan çözeltisi; 10,8  $\mu\text{L}$  paraokson 1 mL asetona eklenerek ve 10 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılarak iyice çözülmesi sağlandı. Üzerine 1 mL bazal aktivite tamponu eklenerek yine karıştırıcıda 30 dk boyunca iyice karışması sağlandı. PON1 aktivitesi tayininde kullanılan çözelti çalışma günü taze olarak hazırlandı.

### 2.1.3.13 Stok inhibitör çözeltileri:

İnhibitör çözeltileri tablo 2.1’de verilen molekül ağırlıklarından faydalanılarak,  $2 \times 10^{-2}$ ,  $1,5 \times 10^{-2}$ ,  $6,67 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $1,66 \times 10^{-3}$ ,  $6,67 \times 10^{-4}$  M konsantrasyonlarında saf DMSO içinde çözülerek hazırlandı.

### 2.1.3.14 SDS-PAGE’de kullanılan numune tamponu:

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	2,5 mL
%10’luk SDS	4,0 mL
Gliserol	2,0 mL
$\beta$ -merkaptoetanol	1,0 mL
Bromofenol mavisi	0,01 g
Distile su	0,5 mL

### 2.1.3.15 SDS-PAGE’de kullanılan yürütme tamponu:

Tris-baz	3,0 g
Glisin	14,4 g
SDS	1,0 g

Son hacim distilesu ile 1 L’ye tamamlandı.

### 2.1.3.16 SDS-PAGE’de kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı:

SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve bir mini jel için kullanılan miktarları tablo 2.3’de verilmektedir.

### 2.1.3.17 SDS-PAGE’de kullanılan renklendirme çözeltisi:

0,66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 mL metanolde çözüldü. Üzerine 24 mL saf asetik asit ve 120 mL distile su eklendi.

### 2.1.3.18 SDS-PAGE’de kullanılan renk açma çözeltisi:

Hacimce %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 distile su içeren çözeltiyi hazırlamak için 75 mL asetik asit ve 5 mL metanol, 875 mL distile su ile karıştırıldı.

**Tablo 2.3:** SDS-PAGE’de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<b><u>Akril amid/Bis (%30)</u></b> Akril amid 15 g Bis 0,4 g Son hacim distile su ile 50 mL’ye tamamlanır.	3,33 mL	520 µL
<b><u>Distile Su</u></b>	4 mL	2,44 mL
<b><u>1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)</u></b> 11,82 g Tris-HCl alınarak 45 mL distilesuda çözülür ve pH 8.8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilir. Son hacim distile su ile 50 mL’ye tamamlanır.	2,5 mL	—
<b><u>0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)</u></b> 3,94 g Tris-HCl alınarak 45 mL distile suda çözülür ve pH 6.8 oluncaya kadar 0,1 M NaOH ilave edilir. Son hacim distile su ile 50 mL’ye tamamlanır.	—	1 mL
<b><u>%10’luk SDS</u></b> 1 g SDS alınarak son hacim 10 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.	100 µL	40 µL
<b><u>TEMED</u></b>	7 µL	4 µL
<b><u>%10’luk amonyum persülfat (APS)</u></b> 1 g Amonyum persülfat alınarak son hacim 10 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.	200 µL	80 µL



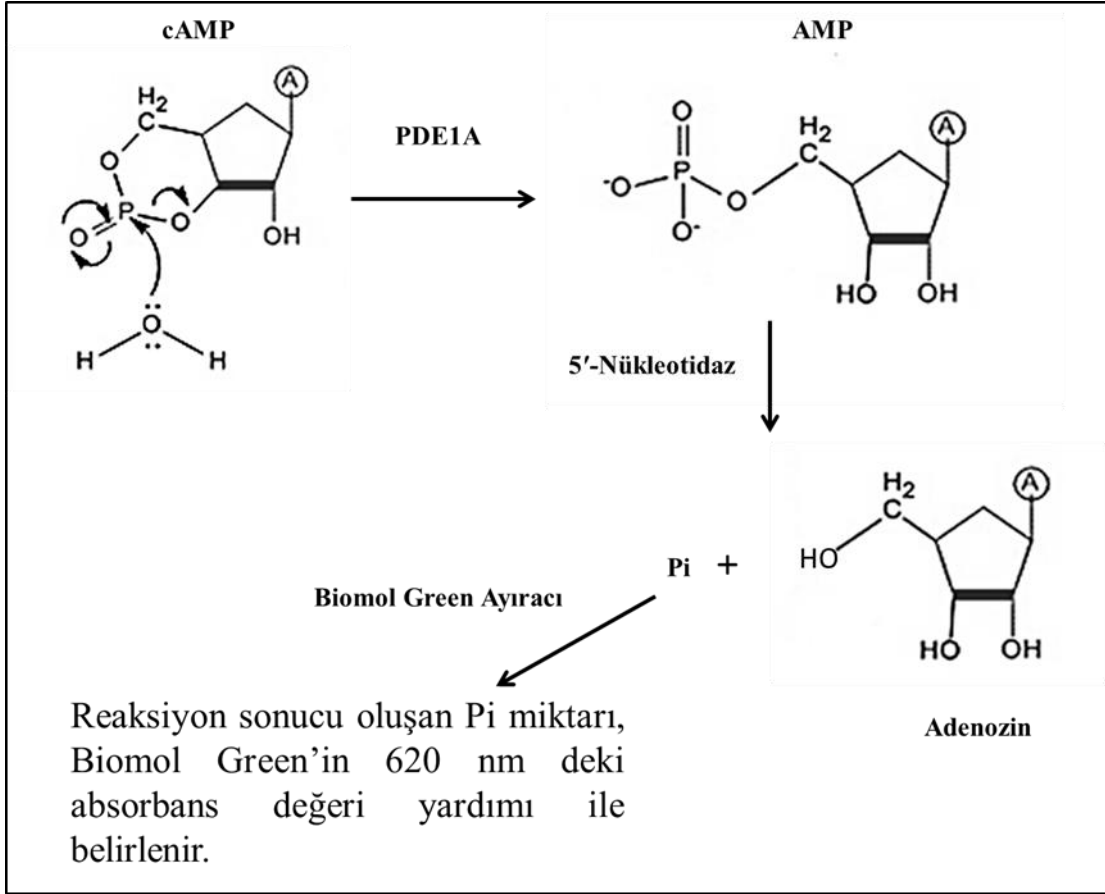
## 2.2 Yöntemler

### 2.2.1 Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz 1 İzoenzimi Aktivite Tayin Yöntemi

PDE1 enzim aktivite tayini için ticari olarak temin edilen siklik nükleotid fosfodiesteraz analiz kiti (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, BML-AK800) kullanılmıştır. Enzim aktivite tayini ve inhibisyon çalışmaları, söz konusu kit kullanılarak kolorimetrik olarak yapılmıştır.

Kitin temel prensibi, 3',5' siklik monofosfat'ın (cAMP veya cGMP) PDE1 enzimi tarafından 3'-siklik fosfat bağının hidrolizi esasına dayanmaktadır. 5'-nükleotidin serbest kalması, 5'-nükleotidaz enzimi tarafından 5'-nükleotidin nükleosit ve fosfata parçalanmasını takip eder. Enzimatik parçalanma sonucu serbest kalan fosfat miktarı, BIOMOL GREEN ayırıcı kullanılarak 620 nm'de absorbans ölçülmesi ile belirlenir. PDE1 enzim aktivitesi olarak 620 nm'de alınan absorbans değerleri kullanılmıştır (şekil 2.2).

Mikroplakanın kuyucuklarına sırasıyla, 10 µL, 0,5 mM'lık cAMP; 31 µL PDE analiz tampon; 5 µL, 5 kU/µL'lik 5'-nükleotidaz ve değişik konsantrasyonlarda 1,5 µL inhibitörün pipetlemesi gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamına PDE1A'nın eklenip hassas bir şekilde karıştırılması ile reaksiyon başlatıldı. Mikroplaka 30°C sıcaklıkta, 30 dakika boyunca spektrofotometre içinde inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için, herbir kuyucuğa 100 µL oda sıcaklığındaki BIOMOL GREEN ayırıcı eklendi. Hava kabarcığı oluşturmamaya özen gösterilerek karıştırıldı. Renkli kompleks oluşumunun gerçekleşmesi için mikroplaka 30°C sıcaklıkta, 30 dakika spektrofotometre içinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 620 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Tadalafil türevlerinin PDE1 izoenzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin saptanması, optimizasyon çalışmalarından sonra bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 2.2:** PDE1 analiz kitinin çalışma prensibinin şematik gösterimi.

### 2.2.1.1 5'- AMP Standart Eğrisinin Hazırlanması

5'- AMP standart eğrisinin hazırlanmasında standart madde olarak, PDE analiz tampon içinde bulunan 100  $\mu\text{M}$ 'lık 5'- AMP'den 200  $\mu\text{L}$ 'lik 75 ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık iki stok çözelti hazırlandı. 75 ve 50  $\mu\text{M}$ 'lık 5'-AMP stokları ve PDE analiz tamponu kullanılarak mikropłakanın kuyucuklarında A'dan H'ye doğru seri seyreltme işlemi yapılarak 75; 50; 37,5; 25; 18,75; 12,75; 6,25; 0  $\mu\text{M}$  5'-AMP elde edildi. Her bir kuyucuğa, 5  $\mu\text{L}$  5'-Nükleotidaz enzimi eklendi ve karıştırılarak reaksiyon başlatıldı. Spektrofotometre içinde 30°C sıcaklıkta, 30 dakika spektrofotometre içinde inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa 100  $\mu\text{L}$  BIOMOL GREEN ayracı eklenip karıştırıldı ve 30°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, mikropłaka içindeki örneklerin absorbansı 620 nm'ye ayarlanmış okuyucuda okundu.

5'- AMP standart eğrisini hazırlamak için kuyucuklar içindeki 5'- AMP nmol'üne karşı OD620 grafiği çizildi.

### **2.2.1.2 DMSO'nun PDE1A Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Kontrolü**

İnhibitörlerin %100 DMSO içinde çözülmesinden dolayı enzim aktivitesinde olabilecek değişikliklerin giderilmesi için inhibitörsüz hazırlanan çözeltiliye DMSO eklenerek denemeler yapıldı. Enzim dışındaki deney bileşenleri mikroplakaya yerleştirildi ve seri bir şekilde her bir kuyucuğa 2,5 µL, 20 U/mL PDE1A enzimi eklenerek reaksiyonlar başlatıldı. Spektrofotometre içinde, 30°C sıcaklıkta, 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için, her bir kuyucuğa oda sıcaklığındaki 100 µL BIOMOL GREEN ayırıcı eklenip karıştırıldı ve 30°C'de 30 dakika inkübe edildi. 620 nm'deki absorbans değerleri okundu.

### **2.2.1.3 PDE1 İzoenzim Aktivitesinin Tayini**

PDE1 aktivitesine inhibitörlerin etkisini araştırırken kullanılan miktarlar ve enzim konsantrasyonu tablo 2.4'de gösterilmiştir. Enzim dışındaki reaksiyon bileşenleri mikroplakaya yerleştirildikten sonra enzimin eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı. Bölüm 2.2.1'de belirtildiği gibi inkübasyon ve reaksiyonu sonlandırma işlemleri gerçekleştirildi. Reaksiyon sonunda inhibisyon etkileri incelenen bileşiklerin 620 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri ve 5'-AMP standart eğri grafiğinin denklemleri kullanılarak enzim aktivitesi, U, nmol 5'-AMP/dk cinsinden hesaplandı ve % aktivite bulundu.

**Tablo 2.4:** PDE1 aktivite ölçümlerinde kullanılan bileşiklerin konsantrasyonları ve hacimleri.

Örnekler	cAMP (0,5 mM)	PDE1A Analiz tamponu	5'Nükleotidaz (5kU/ $\mu$ L)	İnhibitör	PDE1A (20 U/ml)	Reaksiyon hacmi	Reaksiyon ortamındaki [inhibitör]
	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)	$\mu$ M
<b>Kontrol</b>	10	31	5	1,5 $\mu$ L (DMSO)	2,5	50	0
<b>Test Edilen Bileşikler</b>	10	31	5	1,5	2,5	50	20
	10	31	5	1,5	2,5	50	50
	10	31	5	1,5	2,5	50	150
	10	31	5	1,5	2,5	50	200
	10	31	5	1,5	2,5	50	450
	10	31	5	1,5	2,5	50	600

## **2.2.2 İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA-I ve hCA-II) Saflaştırılması ve Aktivite Tayini**

### **2.2.2.1 Kan Numunelerinin Alınması ve Hemozilatın Hazırlanması**

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflaştırılması için antikoagülanlı tüplere yaklaşık 30 mL sağlıklı insan kanı alındı ve bekletilmeden çalışıldı. Eritrositleri ayırmak için kan, teflon santrifüj tüplerine konuldu ve 4°C'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin üst kısmında kalan serum, altta kalan eritrosit tabakasından dikkatlice ayrıldı. Eritrositler, %0,9'luk NaCl çözeltisi ile çok fazla sarsmamaya çalışarak yıkandı ve santrifüj edildi. NaCl çözeltisi ile yıkama işlemi iki defa yapıldı ve her seferinde üstte kalan kısımlar atıldı. Elde edilen eritrositler, hacimlerinin 2 katı kadar, 4°C'de soğutulmuş distile su ile hemoliz edildi. Bu işlemler sonucu elde edilen hemolizat, hücre zarlarının ayrılması için 4°C'de 15000 rpm'de 1 saat santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant dibe çökmüş olan hücre zarlarını almamaya özen göstererek buz içine oturtulan behere alındı. Hemolizatın pH'sı Tris-baz eklenerek 8,7'ye ayarlandı [65,68].

### **2.2.2.2 Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve CA İzoenzimlerinin Elüsyonu**

hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflaştırılması için Sepharose-4B-etilen diamin-4-tiyoüre-dibenzensülfonamit afinite jeli [76] kullanıldı. Afinite jeli kolona paketlendikten sonra 25 mM Tris-baz, 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,7) ile dengelendi. pH'sı ayarlanmış olan hemolizatın kolona yavaşça eklenmesinden sonra, kolon 25 mM Tris-baz, 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tamponu (pH 8,7) ile yıkandı. Bu sayede hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin büyük bir kısmı kolona tutunmuş ve istenmeyen safsızlıklar kolondan uzaklaştırılmıştır [65,68].

Kolona tutunmuş olan hCA-I izoenziminin elüsyonu için 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 1 M NaCl (pH 6,3) tamponu, hCA-II izoenziminin elüsyonu için ise 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/ 0,5M NaClO<sub>4</sub> (pH 5,6) tamponu kullanılarak saf haldeki enzim 2'şer mL'lik fraksiyonlarda ependorf tüplere toplandı. İlk önce hCA-I elüsyonu

gerçekleştirilmiştir ve her bir eluatın 280 nm’de kalitatif protein tayini yapılmıştır. hCA-I elüsyon işlemi, eluatlar 280 nm’de absorbans vermeyinceye kadar devam ettirilmiş sonra hCA-II elüsyonuna geçilmiştir. hCA-II için toplanan eluatların da 280 nm’de absorbansına bakılarak elüsyon işlemi sonlandırılıp kolon dengeleme tamponu ile temizlendi [77].

### 2.2.2.3 hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Diyalizi

Saflaştırılan enzim çözeltileri esteraz aktivitelere bakılmadan önce istenmeyen iyonların ortamdaki uzaklaştırılması için diyaliz işlemi yapıldı [62]. Bunun için hCA-I ve hCA-II için 280 nm’de yüksek absorbans gösteren elüatlar biraraya getirilerek diyaliz torbalarına koyuldu. Diyaliz işlemi distile suya karşı önce 1 saat, suyu değiştirildikten sonra ise 2 saat yapıldı. Diyaliz işlemine 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu ile gece boyu yaklaşık 16 saat devam edildi [68]. İşlem sonunda elde edilen CA çözeltileri esteraz aktiviteleri ölçülene kadar 4°C’de tutuldu.

### 2.2.2.4 Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Esteraz Aktivitesi Tayini

Bu çalışmada hCA izoenzimlerinin aktivite tayini için Armstrong ve arkadaşları tarafından geliştirilen CA esteraz aktivitesi yöntemi kullanıldı [62]. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanarak yapılan spektroskopik bir yöntemdir. Bu yöntemde karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan *p*-nitro fenil asetatı, 348 nm’de absorbans veren *p*-nitro fenole hidroliz etmektedir.



Esteraz aktivitesi ölçümü yapılan 348 nm, *p*-nitro fenol ve *p*-nitro fenolat’ın her ikisinin de aynı absorbansı verdiği bölge, yani izosbestlik dalga boyudur. Bu nedenden dolayı fenol grubundaki H<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir. *p*-nitro fenol’ün ekstriksiyon katsayısı  $\epsilon_{348}=5,4 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  dir. Bu dalga boyunda *p*-nitrofenil asetat’ın çok az absorbansı vardır ve molar ekstriksiyon katsayısı  $\epsilon_{348}=0,4 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  dir [62, 78].

Tayin işlemlerinde 1 cm'lik kuvarz küvetlere, toplam hacim 1050 µL olacak şekilde; 400 µL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu, 300 µL distile su, 300 µL substrat, ve 50 µL enzim konularak oda sıcaklığında karıştırıldı ve hemen 25 °C'de 348 nm'de ilk absorbansı ölçüldü ve 3 dakika sonra ikinci ölçüm alındı. Başlangıçta ve 3 dakikalık inkübasyon sonunda okunan absorbanslar arasındaki fark hesaplandı. Ayrıca enzimsiz bir karışım (400 µL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu, 350 µL distile su, 300 µL substrat) hazırlandı ve onun da 3 dakika sonundaki absorbans farkı hesaplandı. Enzimli karışım için hesaplanan değerden, enzimsiz karışım (kör) için hesaplanan absorbans değerinin çıkarılmasıyla 3 dakika içerisinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitrofenil asetatın mevcut olan çok az absorpsiyonu için düzeltme yapılmış oldu. Tadalafil ve orjinal türevlerinin DMSO içinde çözülmesinden kaynaklanan ölçüm hataları da hesaplamalarda gözününe alınmıştır. Ayrıca test maddelerinin substrata yaptıkları etkilere de bakılarak son absorbans hesaplamaları yapıldı. Elde edilen absorbans değeri ve aşağıda verilen denklem kullanılarak p-nitrofenilasetat miktarı hesaplandı ve bu değer enzimin esteraz aktivitesi olarak alındı [69].

Oluşan p-nitrofenilasetat konsatrasyonu mM/dk olarak;

$$[p - \text{nitrofenilasetat}] = \frac{A(O.D.) mM}{5}$$

1 dakikada ve 1 mL reaksiyon hacminde oluşan p-nitrofenilasetat miktarı;

$$p - \text{nitrofenilasetat} = \frac{A(O.D.)/5}{3} \times 1,050 \mu\text{mol} \times dk^{-1}$$

$$EU/mL: = \{(A(O.D.)-Kör) \pm DMSO \pm Madde etkisi\} \times 0,07 \mu\text{mol} \times dk^{-1}$$

Bu deneyde kullanılan 3 mM'lık stok p-nitrofenil asetat substrat çözeltisini hazırlamak için 27,2 mg p-nitrofenil asetat 1 mL asetonda çözüldükten sonra balon jodede hızlıca karışan 49 mL distile suya yavaş yavaş eklendi. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi tayininde kullanılan çözelti çalışma günü taze olarak hazırlandı. Esterin sınırlı çözünürlüğünden dolayı daha konsantre bir stok hazırlanamamıştır. Asetonun, diğer organik çözücülere göre hidroliz reaksiyonunu daha az inhibe etmesinden dolayı çözücü olarak aseton kullanılmıştır [62].

## 2.2.3 İnsan PON1 İzoenziminin Saflaştırılması ve Aktivite Tayini

### 2.2.3.1 Kan Serumunun Ayrılması

Yaklaşık 30 mL sağlıklı insan kanı, kuru teflon santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm'de, 4 °C'de, 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant yani serum kısmı ayrıldı, çöken kısım atıldı. Ayrılan serum bir mezura alınarak hacmi ölçüldü. Enzimin kararlılığını koruması için serumun içine konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde CaCl<sub>2</sub> eklendi ve aynı gün içinde deneysel çalışmalarda kullanıldı [21].

### 2.2.3.2 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

İki değerlikli, ucuz ve çözünürlüğü yüksek bir tuz olan amonyum sülfat, belirli doygunluk derecelerine göre belirli proteinlerin çöktürülmesini sağladığı için ön saflaştırma işleminde kullanılmaktadır. Bu amaçla, literatüre bakılarak %60-80 amonyum sülfat çöktürmesi için kullanılacak uygun amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formülle belirlendi [79, 80]:

$$g (NH_4)_2 SO_4 = \frac{1,77 \times V_x (S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V: Serum hacmi, mL

S<sub>1</sub>: l'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>: l'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Paraoksonaz enzimin amonyum sülfat ile saflaştırılmasında ilk önce %60 doygunluk için 15,5 mL olan serum için tuz miktarı 5,6 g olarak hesaplandı. Belirlenen tuz miktarı havanda ince toz haline getirildi. Hazırlanan tuz, karıştırıcı üzerine yerleştirilen buz banyosundaki seruma yavaş yavaş eklenerek karıştırıldı. Daha sonra 4 °C'de, 15000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak ölçülen serum (14 mL) için, %80 doygunlukta ikinci amonyum sülfat çöktürmesini yapmak için gerekli tuz miktarı 1,81 g olarak hesaplandı. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası yine serum çözeltisi 4 °C'de, 15000 rpm'de 30 dakika



santrifüj edildikten sonra çöken kısım alınıp süpernatant kısmı atıldı. Çöken kısım yaklaşık 6 mL minimum hacimde 0,1 M Tris-baz (pH 8,0) çökelek tamponu içinde çözüldü ve sonraki aşama olan hidrofobik etkileşim kromatografisinde kullanıldı [72,80].

### **2.2.3.3 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Enzimin Saflaştırılması**

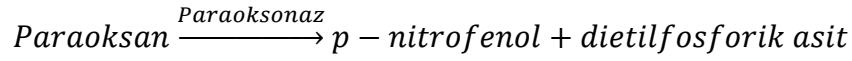
N-terminalinde hidrofobik uç bulunan PON1 enziminin saflaştırılmasında, hidrofobik karaktere sahip olan peptitlerin, proteinlerin ve bazı biyolojik moleküllerin ayrıştırılmasını mümkün kılan hidrofobik etkileşim kromatografisi (HEK) yöntemi kullanıldı [79]. Bu deneyde Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin HEK jeli kullanıldı [80].

HEK jeli kolona paketlenmiş ve kolon 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  / 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tamponu ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi tamamlandı, jel üzerindeki tampon çözelti seviyesi jel seviyesine getirildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sonunda 6 mL 0,1 M Tris-baz (pH 8,0) çökelek tamponu içine alınan serum çözeltisi kolona yavaşça tatbik edildi Paraoksonaz enziminin elüsyonu için kolona 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tamponu ve tuz içermeyen 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru tuz gradienti uygulandı. Enzim çözeltisi 1.5mL'lik eluatlar halinde toplandı. Elüsyon işlemi alttan gelen çözeltinin 280 nm'de absorbansı yaklaşık sıfır olunca durduruldu (yaklaşık 35 tüp toplandıktan sonra) ve kolon dengeleme tamponu ile yıkandı. Toplanan herbir eluat için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı ve bu ölçümlerde kör olarak 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,0) tamponu kullanıldı [21, 81].

### **2.2.3.4 Paraoksonaz Enzim Aktivite Tayini**

Paraoksonaz enziminin aktivitesi Gan ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik bir yöntem ile tayin edildi [82]. Bu yöntem, paraoksonazın toksik olan substratı paraoksani, toksik olmayan *p*-nitrofenol ve dietilfosforik asit'e hidrolizi

sonucu oluşan *p*-nitrofenol'ün 412 nm'de absorbans değişiminin ölçülmesi temeline dayanır.



Enzim aktivite ölçümü için kuvarz küvete sırasıyla 950 µL bazal aktivite tamponu (2 mM CaCl<sub>2</sub> içeren 100 mM Tris-HCl tamponu ,pH 8,0), 50 µL substrat (2 mM paraoksan çözeltisi) ve 50 µL enzim eklenip karıştırılarak bekletilmeden 37 °C'de, 412 nm'de 1 dakika içinde absorbansda meydana gelen değişim okundu. Bu sayede paraoksanın *p*-nitrofenole enzimatik dönüşüm hızı belirlendi. Aynı işlem enzim olmadan hazırlanan (1000 µL bazal aktivite tamponu + 50 µL substrat) çözelti (kör) için de yapıldı. Bulunan bu değer, enzimli çözelti için bulunan değerden çıkarıldı. Ayrıca tadalafil ve orjinal türevlerinin DMSO içinde çözülmesinden kaynaklanan ölçüm hataları ve test maddelerinin substrata yaptıkları etkilere de bakılarak son absorbans hesaplamaları yapılarak enzim aktivitesi hesaplandı. 1 ünite, paraoksonazın dakikada meydana getirdiği *p*-nitrofenol'ün µmol'ü olarak belirlendi. Aşağıdaki formül kullanılarak enzim ünitesi (µmol/dak) hesaplandı [79]:

$$E\ddot{U} = \frac{\text{Reaksiyon hacmi (mL)} \times \frac{dA}{dT} \times 1000}{\epsilon_{412} \times \text{Enzim hacmi (mL)} \times d (cm)}$$

d: 1 cm, ışık yolu

$\epsilon_{412}$ : 17100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (*p*-nitrofenol'ün pH 8,0 'de 412 nm'deki ekstrikasyon katsayısı).

#### 2.2.4 SDS-PAGE ile Enzim Saflığının Kontrolü

hCA izoenzimleri afinite kromatografisi ile ve hPON1 enzimi hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırıldıktan sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli %3 ve ayırma jeli %10 olacak şekilde hazırlanan kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimlerin saflık dereceleri kontrol edildi [65,68,83].

Bu amaçla elektroforez ön ve arka cam plakaları önce saf su, sonra etil alkol ile iyice temizlendikten sonra plakalar birbiri üzerine konuldu ve elektroforezin jel dökme aparatına kısıkaçları ile sabitlenerek yerleştirildi. Tablo 2.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar pipetle döküldü. Bu işlem jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek yapıldı. Jel yüzeyinin düzgün olması için jelin üst kısmı n-bütanol ile dolduruldu. Yaklaşık 1 saat sonra polimerize olan ayırma jelinin üstündeki n-bütanol boşaltıldı. Hazırlanan yığılma jeli üst yüzeye kadar ilave edilerek tarak dikkatlice yerleştirildi ve yaklaşık 30 dakika yığılma jelinin polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve oluşan kuyucuklar işaretlenerek jel kaseti elektroforez tankına oturtuldu. Elektroforez tankının üst ve alt kısmına yürütme tamponu dolduruldu.

hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinden diyaliz sonrası örnek kullanılırken, PON1 enzimi için hidrofobik etkileşim kromatografisi sonucu yüksek aktivite gösteren ependorf tüplerinin birleştirilmesi ile elde edilen enzim çözeltisinden örnek alındı. Örnekler hazırlanırken toplam hacim 50 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponu ile karıştırıldı. Jele yüklemeye önce numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi ve sonra soğutulmuş mikropipetle 20’şer µL kuyucuklara yüklendi. Saflaştırılan enzimlerin yaklaşık molekül ağırlıklarını kontrol etmek için, 10-180 kDA molekül ağırlığına sahip proteinleri içeren marker kullanıldı. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 150 Volt’a ayarlanarak yürütme işlemi başlatıldı. Proteinler jelin alt kısmından yaklaşık 1 cm yukarıda kalınca (yaklaşık 90 dakika sonra) yürütme işlemi sonlandırıldı. Cam plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jeli renklendirme çözeltisine konularak çalkalayıcı üzerinde 1,5-2 saat bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılan jel renk açma çözeltisi içine alındı. Jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözeltide bekletildi. Jel açma çözeltisinden çıkarılan jel görüntülendi.

### **2.2.5 Tadalafil ve Türevlerinin İzoenzimler Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin Belirlenmesi**

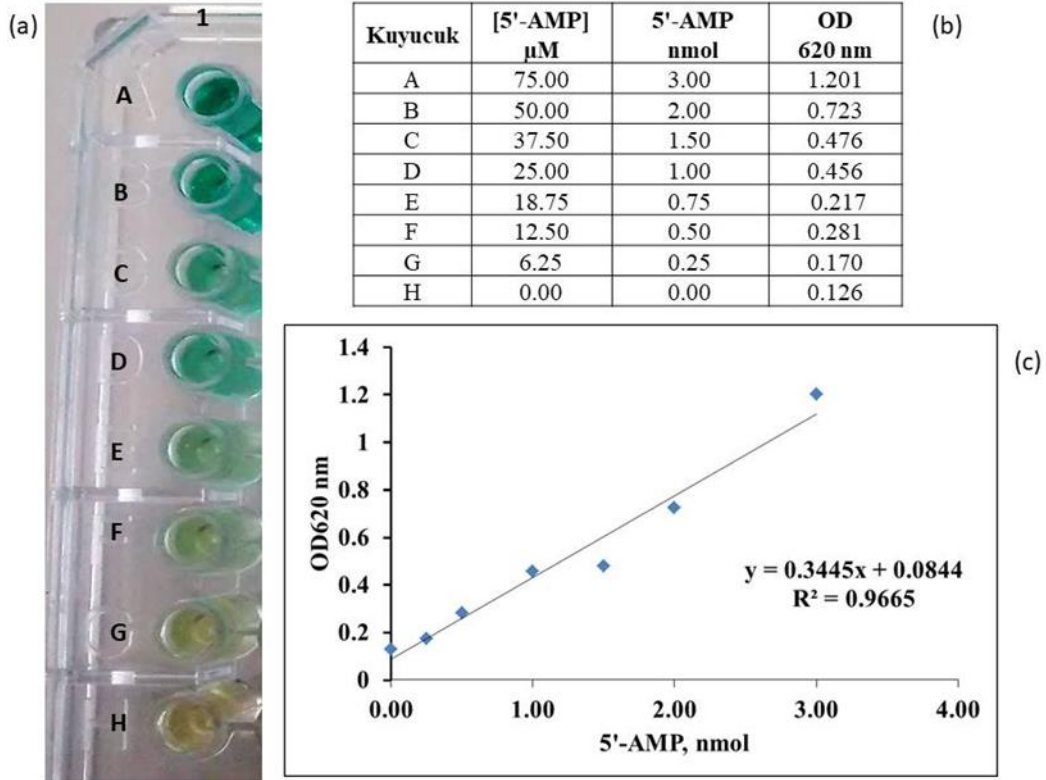
Tadalafil ve türevlerinin PDE1, hCA-I, hCA-II ve hPON1 izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkilerini belirlemek için optimum şartlarda her bir izoenzim

için sabit substrat konsantrasyonunda çalışarak  $IC_{50}$ - $IC_{80}$  değerleri hesaplandı. Önce inhibitörsüz enzim aktivitesi hesaplandı ve bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda tadalafil ve türevleri kullanılarak izoenzimlerin aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı. % Aktivite-[I]  $\mu$ M grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak her bir tadalafil türevinin söz konusu izoenzimler üzerindeki inhibisyon etkileri için  $IC_{50}$ - $IC_{80}$  değerleri hesaplanmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 PDE1 Analizleri İçin 5'- AMP Standart Eğrisinin Hazırlanması

5'- AMP standart eğrisini oluşturmak için bölüm 2.2.1.1'deki protokol takip edildi. Şekil 3.1(a)'da görüldüğü gibi A'dan H'ye doğru azalan 5'- AMP konsantrasyonu ve buna bağlı olarak Biomol Green ile bağlanan fosfat miktarının düşmesini açılan renk ile görebilmekteyiz. 620 nm'de ölçülen absorbans değerlerinin 5'- AMP'nin nmol miktarına karşı çizilen grafiği, uygun lineer regresyon programı seçilerek çizildi. Grafiğin denkleminde faydalanarak gerektiğinde enzimin oluşturduğu 5'- AMP miktarı nmol olarak hesaplanabilir.



**Şekil 3.1:** 5'- AMP standart eğrisinin hazırlanması. (a) Deneyde kullanılan mikropolanın reaksiyon sonundaki görüntüsü. (b) Reaksiyonda kullanılan maddeler ve 620nm'de yapılan ölçüm sonuçları. (c) 5'- AMP standart eğrisi.

### 3.2 DMSO'nun PDE1A Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

İnhibisyon etkileri araştırılan bileşiklerin %100 DMSO içinde çözülmesinden dolayı oluşabilecek ölçüm hatalarını en aza indirebilmek için reaksiyon ortamına DMSO da eklenerek ölçümler yapıldı. DMSO içermeyen kontrol çözeltisi için ölçülen absorbans değeri, 1,5 µL ve 5 µL DMSO'nun eklendiği kontrollerle karşılaştırıldı. İnhibitör hacimleri de 1,5 ve 5 µL olacak şekilde de denemeler yapıldı (Tablo 3.1). Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak inhibitör hacimleri değişik konsantrasyonlarda 1,5 µL olarak alındı.

**Tablo 3.1:** Farklı DMSO miktarlarının PDE1A izoenzimi aktivitesi üzerine etkileri.

Örnekler	cAMP (0,5 mM)	PDE1A Analiz tamponu	5'Nükleotidaz (5 kU/µL)	DMSO	İnhibitör	PDE1A (20 U/ml)	stok [inhibitör]	Reaksiyon ortamındaki [inhibitör]	Reaksiyon hacmi	O.D.
	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	(µL)	µM	µM	(µL)	A <sub>620</sub> nm
<b>Kontrol 1</b>	10	32,5	5	—	—	2,5	—	—	50	0,669
<b>Kontrol 2</b>	10	27,5	5	<b>5</b>	—	2,5	—	—	50	<b>0,335</b>
<b>Kontrol 3</b>	10	31	5	<b>1,5</b>	—	2,5	—	—	50	<b>0,501</b>
<b>Tadalafil</b>	10	27,5	5	—	<b>5</b>	2,5	3000	300	50	<b>0,222</b>
<b>Tadalafil</b>	10	31	5	—	<b>1.5</b>	2,5	10000	300	50	<b>0,231</b>

### 3.3 Tadalafil ve Yeni Sentezlenen Türevlerinin PDE1A İzoenzimi Üzerine Etkileri

Tadalafil ve yeni sentezlenen tadalafil türevlerinin PDE1A enzim aktivitesini nasıl etkilediğini incelemek için 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan bileşikler tablo 2.4'deki gibi hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamındaki bileşenlerin etkileşmesi için

verilen zamanın eşit olmasına özen gösterilmiştir. Tablo 3.2’de inhibisyon etkileri incelenen bileşikler için 620 nm’de ölçülen absorbans değerleri verilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ve 5'- AMP standart eğri grafiği kullanılarak enzim aktivitesi, U, nmol 5'- AMP/dk cinsinden hesaplandı (tablo 3.3). Her bir bileşik için % aktivite- [İnhibitör]  $\mu$ M grafikleri çizildi (şekil 3.2-3.7). Grafiklerden yararlanılarak bileşiklerden bazıları için IC<sub>50</sub> ve IC<sub>60</sub> değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo 3.4 de verilmiştir.

**Tablo 3.2:** PDE1A izoenzimi aktivitesine etkisi incelenen bileşiklerin 620 nm’de okunan absorbans değerleri.

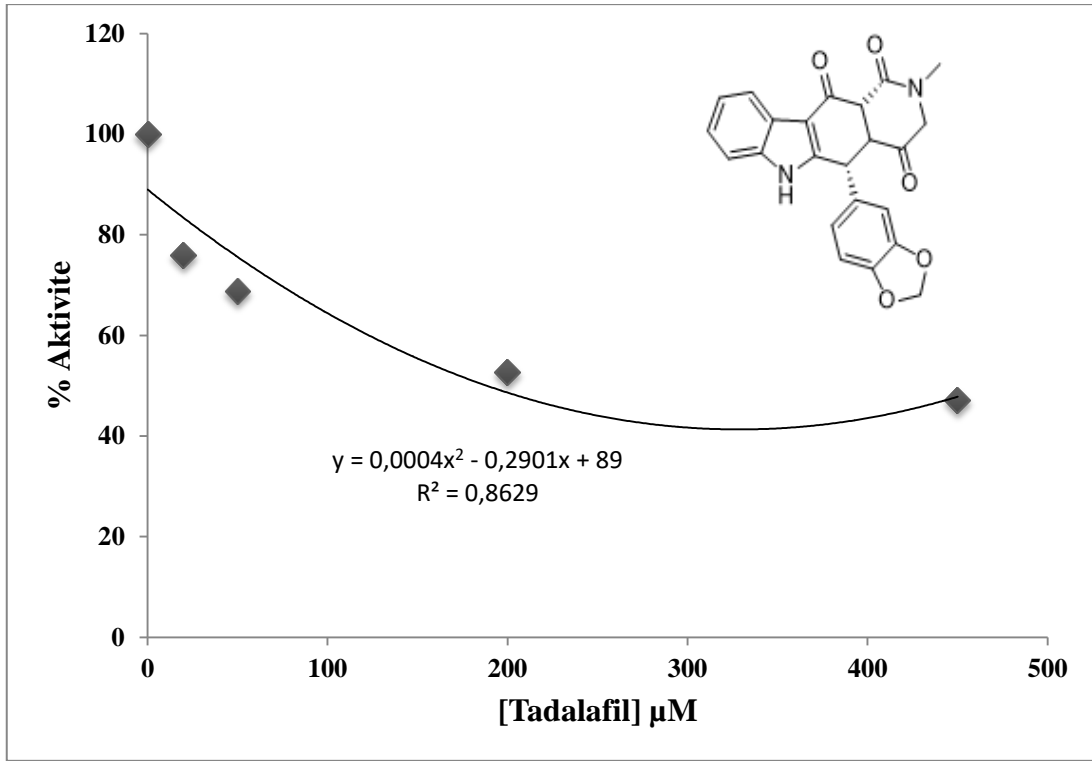
Reaksiyon ortamındaki [inhibitör] $\mu\text{M}$	Tadalafil	Alliltadalafil	Furfuriltadalafil	Morfolintadalafil	Sikloheksiltadalafil	Piperoniltadalafil
0	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644	0,644
20	0,509	0,524	0,538	0,578	*	*
50	0,469	0,484	0,498	0,580	0,573	0,634
150	*	0,420	0,406	*	*	0,666
200	0,379	0,370	0,429	0,445	0,562	*
450	0,348	*	*	0,318	0,786	0,723
600	*	*	*	0,307	0,883	0,794

\* Çalışılmayan konsantrasyonlar

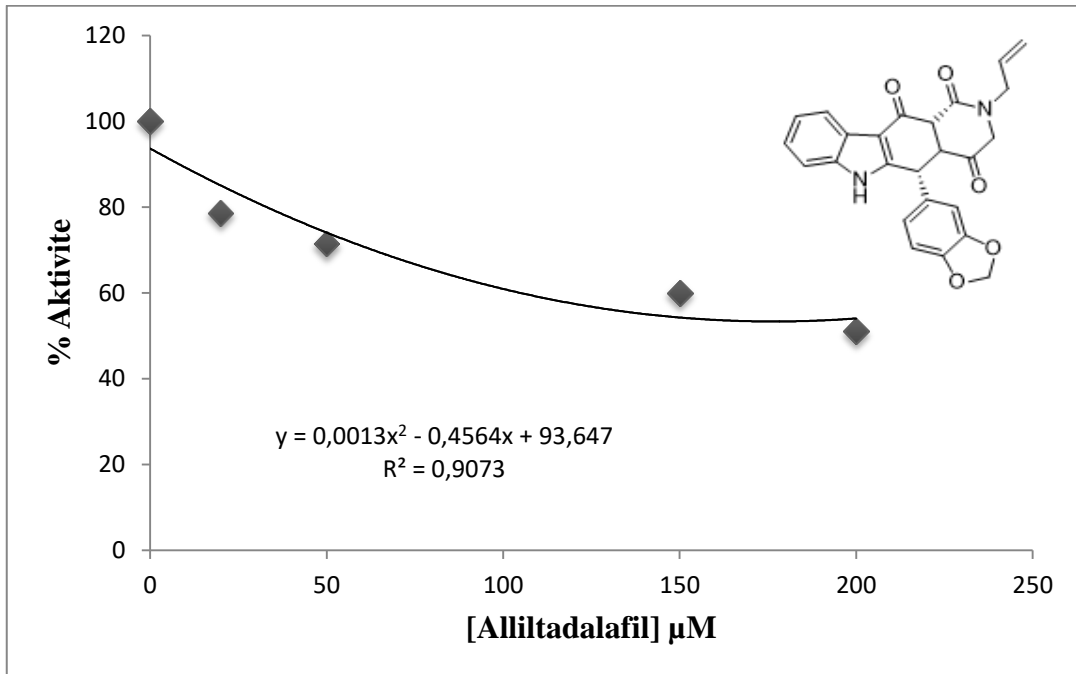
**Tablo 3.3:** Tadalafil ve türevlerinin PDE1 izoenzimi aktivitesi üzerine etkileri.

Reaksiyon ortamındaki [inhibitör] $\mu\text{M}$	Tadalafil		Alliltadalafil		Furfuriltadalafil		Morfolintadalafil		Sikloheksiltadalafil		Piperoniltadalafil	
	U (nmol 5'-AMP/dk)	%Aktivite	U (nmol 5'-AMP/dk)	%Aktivite	U (nmol 5'-AMP/dk)	%Aktivite	U (nmol 5'-AMP/dk)	%Aktivite	U (nmol 5'-AMP/dk)	%Aktivite	U (nmol 5'-AMP/dk)	%Aktivite
0	1,675	100	1,675	100	1,675	100	1,675	100	1,675	100	1,675	100
20	1,271	76	1,316	79	1,358	81	1,478	88	*	*	*	*
50	1,151	69	1,196	71	1,238	74	1,484	89	1,463	87	1,646	98
150	*	*	1,005	60	0,963	57	*	*	*	*	1,741	104
200	0,882	53	0,855	51	1,032	62	1,080	64	1,430	85	*	*
450	0,789	47	*	*	*	*	0,699	42	2,101	125	1,912	114
600	*	*	*	*	*	*	0,666	40	2,391	143	2,125	127

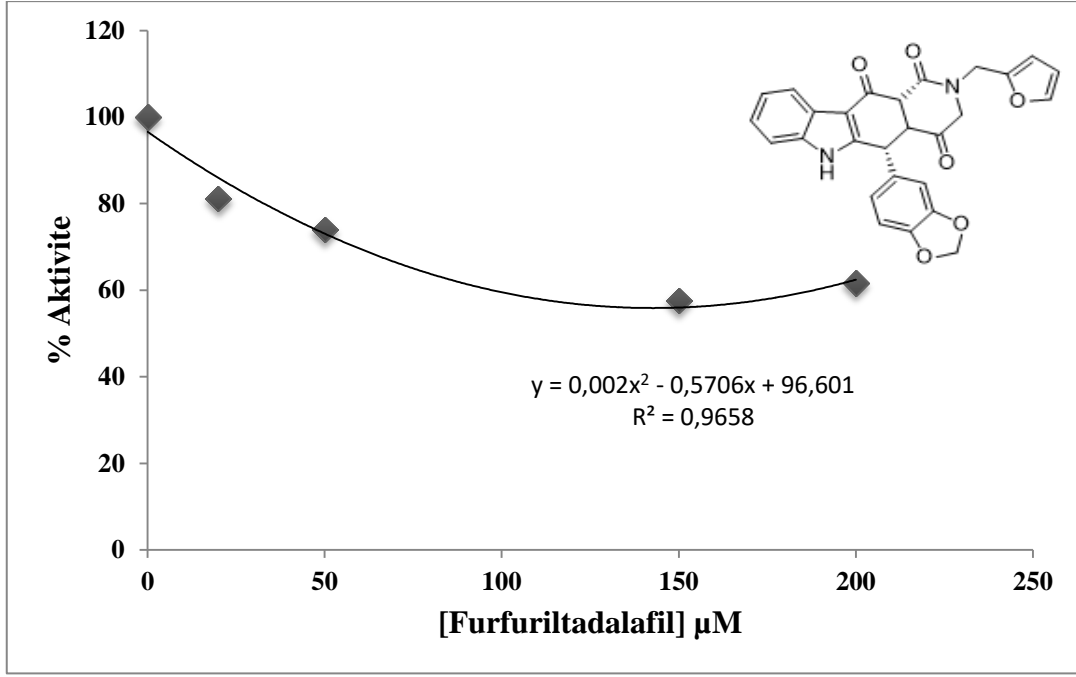




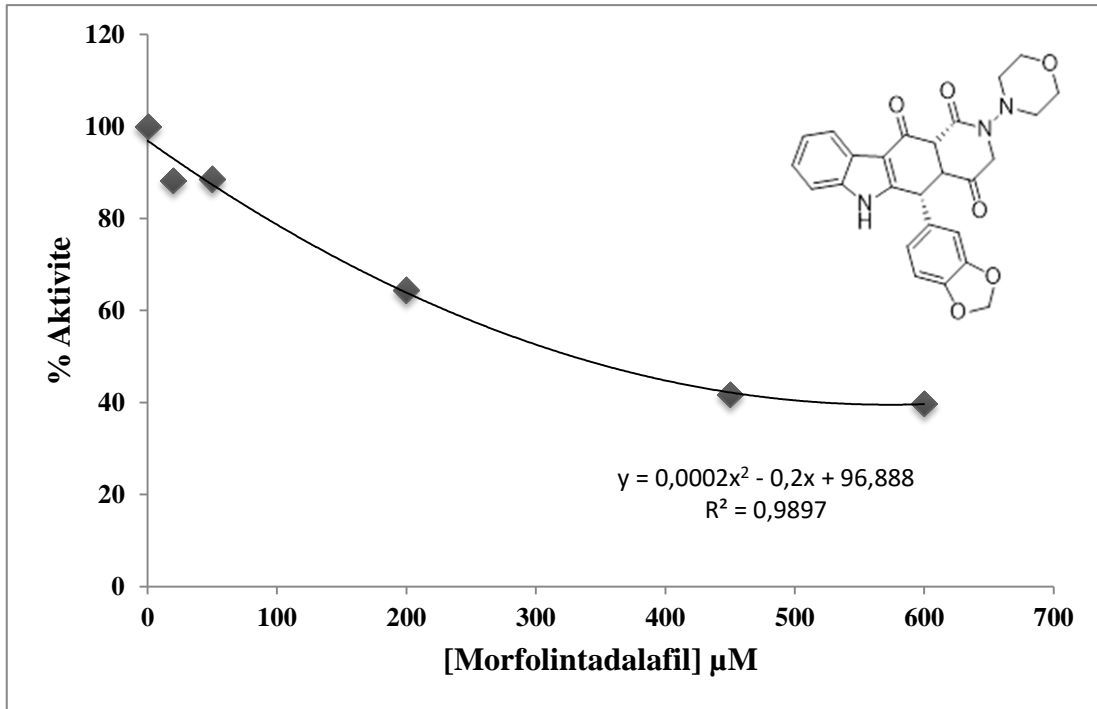
**Şekil 3.2:** Tadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği.



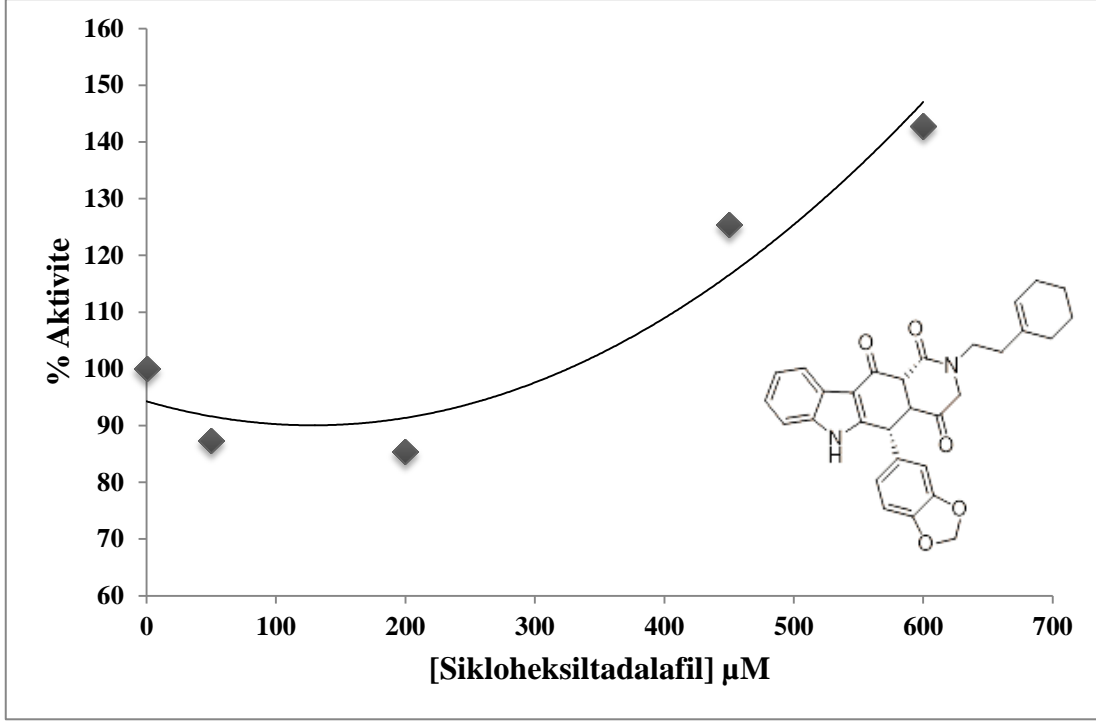
**Şekil 3.3:** Alliltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği.



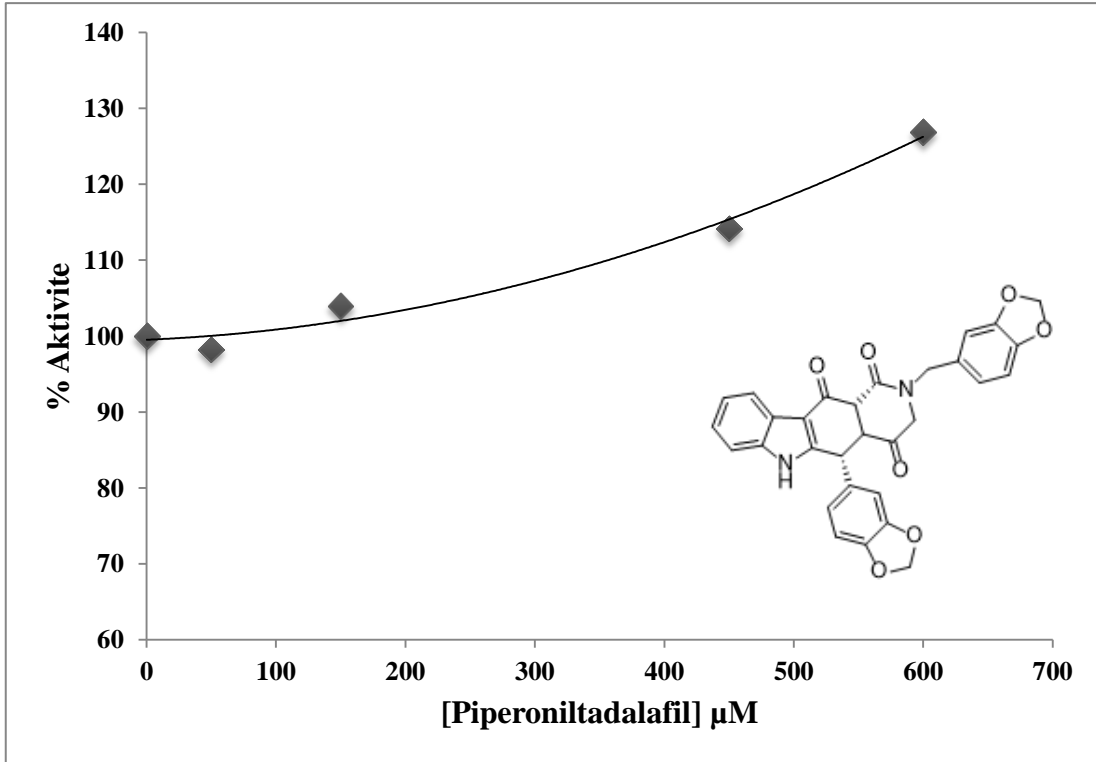
Şekil 3.4: Furfuriltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği.



Şekil 3.5: Morfolintadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği.



Şekil 3.6: Sikloheksiltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği.



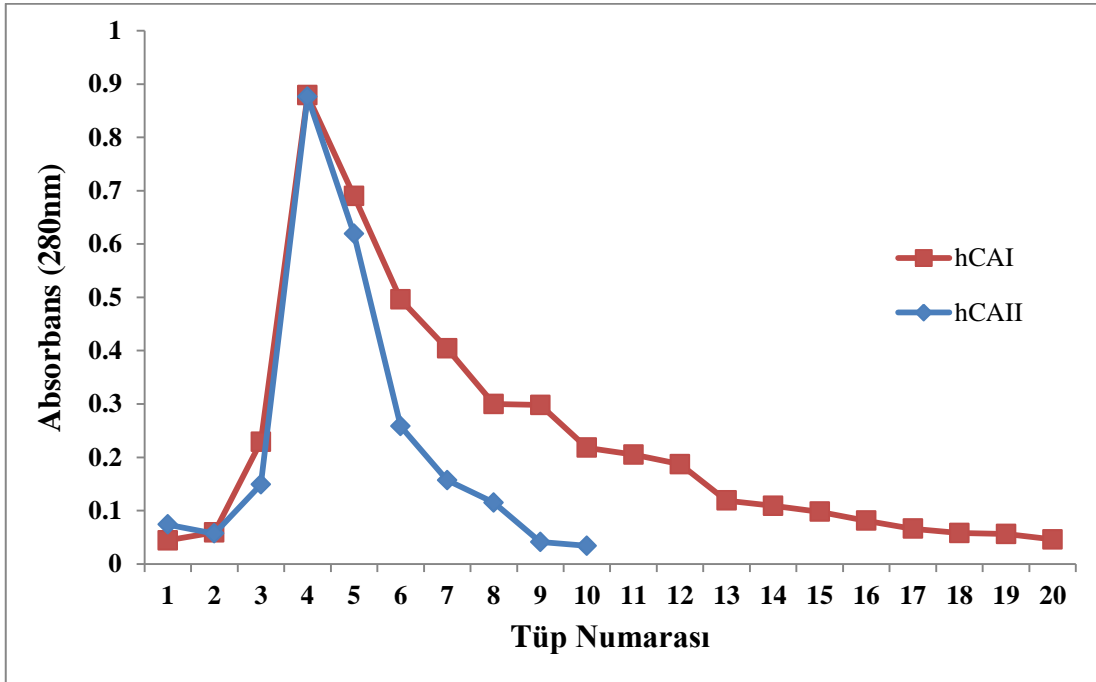
Şekil 3.7: Piperoniltadalafilin PDE1A enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite- [I] grafiği.

**Tablo 3.4:** Tadalafil ve türevlerinin PDE1A izoenzimi için 0,1 mM cAMP substrat konsantrasyonunda, %Aktivite-[I] grafiklerinden bulunan IC<sub>50</sub> veya IC<sub>60</sub> değerleri.

<b>Bileşik Adı</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>IC<sub>60</sub> (µM)</b>
<b>Tadalafil</b>	178	—
<b>Alliltadalafil</b>	—	105
<b>Furfuriltadalafil</b>	—	97
<b>Morfolintadalafil</b>	375	—

### 3.4 İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

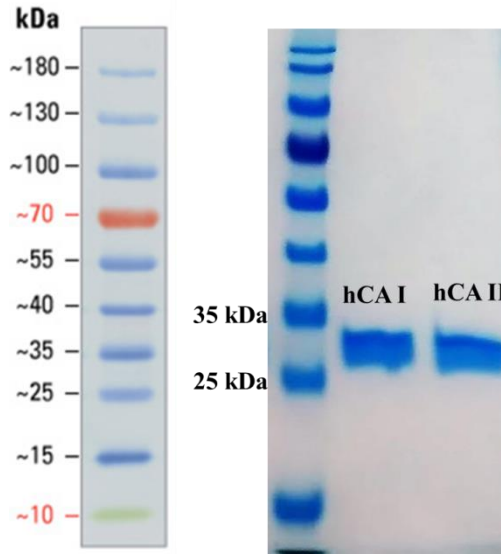
hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin saflaştırılması bölüm 2.2.2.2’de belirtildiği gibi Sepharose-4B-etilendiamin-4-tiyüre-dibenzensülfonamit afinite jeli kullanılarak yapıldı. hCA-I izoenziminin elüsyonu için 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 1 M NaCl (pH 6,3) tamponu, hCA-II izoenziminin elüsyonu için ise 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/ 0,5M NaClO<sub>4</sub> (pH 5,6) tamponu kullanılarak eluatlar 2’şer mL’lik fraksiyonlarda ependorf tüplere toplandı. Her bir eluatın 280 nm’de kalitatif protein tayini yapıldı. Elde edilen absorbans değerlerine karşı tüp numarası grafiği şekil 3.8’de gösterildi. Absorbans değerleri yüksek olan elüatlar birleştirilerek 0,05M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu ile diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz sonunda elde edilen hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin 280 nm’de absorbansları 0,05M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu kör olarak kullanılarak ölçüldü. Diyaliz sonrası hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin 280 nm’deki absorbansları sırasıyla 0,495 ve 0,462 olarak ölçüldü.



Şekil 3.8: hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin afinite kolonundan elüsyon grafiği.

### 3.5 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek için diyaliz sonrası SDS-PAGE uygulandı. Bölüm 2.2.4’de anlatıldığı gibi hazırlanan SDS poliakrilamid elektroforez jeline hCA-I ve hCA-II enzim numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin fotoğrafı çekildi (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9:** Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin SDS-PAGE görüntüleri.

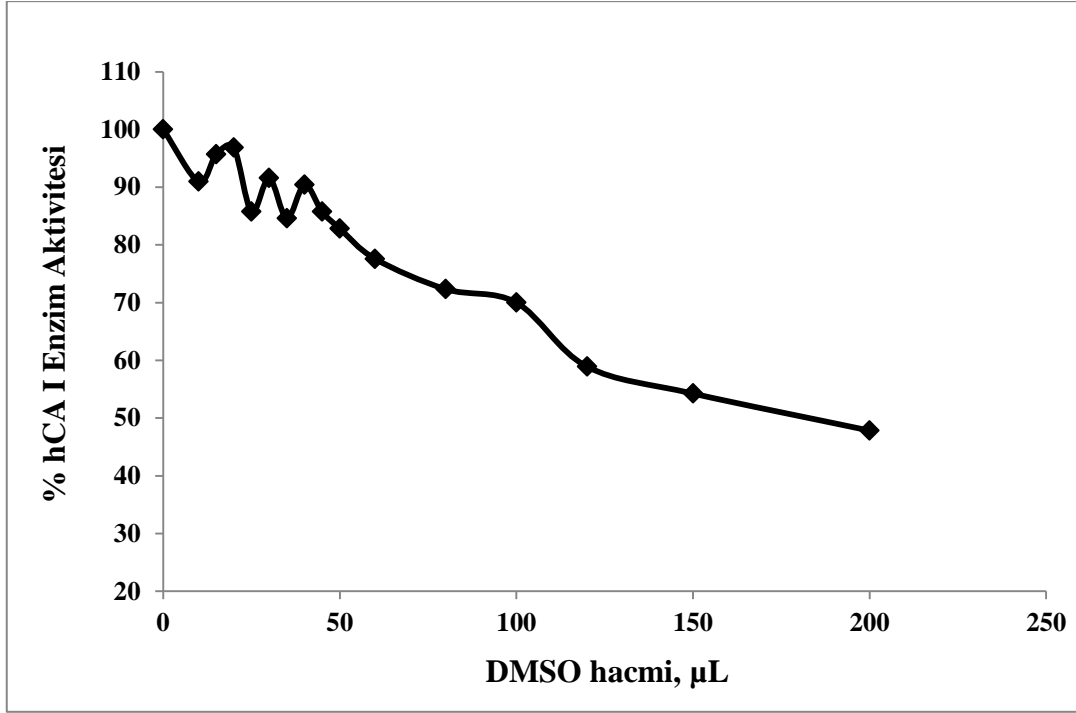
### 3.6 DMSO’nun hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkisi

DMSO’nun hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisini incelemek için, CA enzim aktivite tayin yönteminde belirtilen koşullarda 400  $\mu$ L 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu, 300  $\mu$ L p-nitrofenil asetat substratı, 50  $\mu$ L enzim ve reaksiyon hacmi 1050  $\mu$ L olacak şekilde değişen miktarlarda distile su ve saf DMSO kullanıldı. Reaksiyon, hCA-I veya hCA-II izoenzimlerinin eklenmesi ile başlatıldı. 25 °C’de 348 nm’de ilk absorbansı ölçüldü ve 3 dakika sonra ikinci ölçüm alındı. Absorbans farkı enzimin aktivite hesaplamasında kullanıldı. Tablo 3.5-3.6 sırası ile, DMSO’nun hCA-I ve hCA-II izoenzimlerine etkisi için kullanılan

miktarları ve aktivitelerini göstermektedir. Ölçüm sonuçlarına ait % aktivite-DMSO hacmi grafikleri şekil 3.10-3.11’de sırası ile hCA-I ve hCA-II için verilmiştir.

**Tablo 3.5:** DMSO’nun hCA-I izoenzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distilesu (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (DMSO) (μL)	Enzim (hCA-I) (μL)	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	%Aktivite
400	350	300	0	0	0,014	0	0
	300		0	50	0,185	0,0120	100
	290		10		0,170	0,0109	91
	285		15		0,178	0,0115	96
	280		20		0,180	0,0116	97
	275		25		0,161	0,0103	86
	270		30		0,171	0,0110	92
	265		35		0,159	0,0102	85
	260		40		0,169	0,0109	90
	255		45		0,161	0,0103	86
	250		50		0,156	0,0099	83
	240		60		0,147	0,0093	78
	220		80		0,138	0,0087	72
	200		100		0,134	0,0084	70
	180		120		0,115	0,0071	59
	150		150		0,107	0,0065	54
100	200	0,096	0,0057	48			

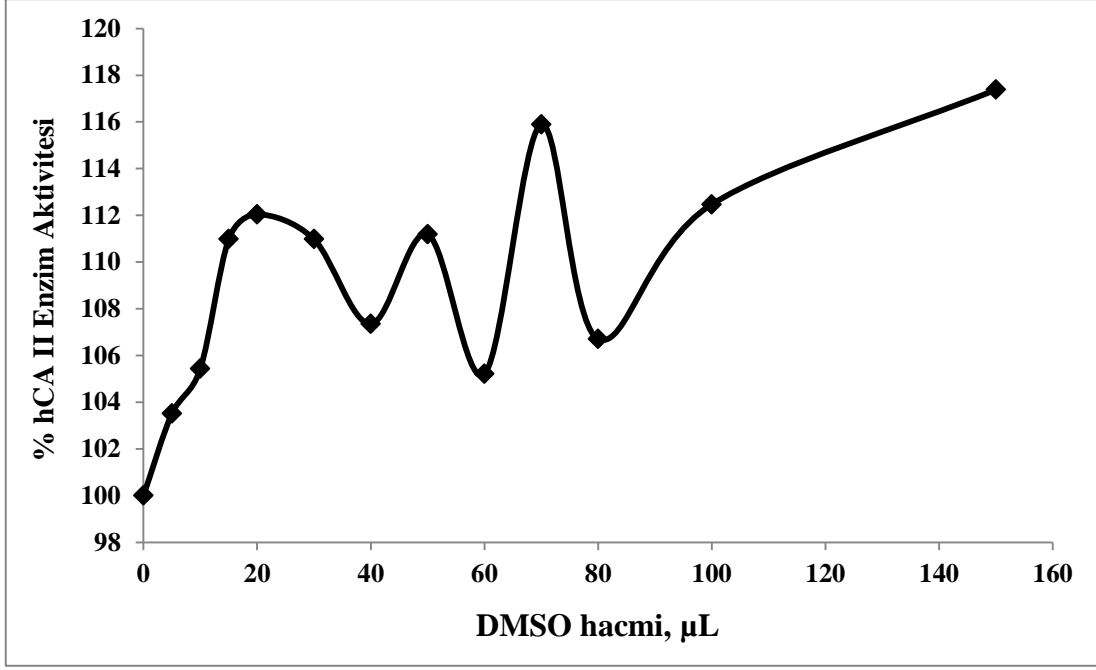


**Şekil 3.10:** DMSO'nun hCA-I izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini gösteren % aktivite-DMSO hacmi grafiği.

**Tablo 3.6:** DMSO'nun hCA-II izoenzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (µL)	Distilesu (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (DMSO) (µL)	Enzim (hCA-II) (µL)	$\Delta A_{348 \text{ nm}} (t_3-t_0, \text{dk})$	Aktivite (EÜ/mL)	%Aktivite
400	350	300	0	0	0,006	0	0
	300		0	50	0,475	0,0328	100
	295		5		0,491	0,0340	104
	290		10		0,500	0,0346	105
	285		15		0,526	0,0364	111
	280		20		0,531	0,0368	112
	270		30		0,526	0,0364	111
	260		40		0,509	0,0352	107
	250		50		0,527	0,0365	111
	240		60		0,499	0,0345	105
	230		70		0,549	0,0380	116
	220		80		0,506	0,0350	107
	200		100		0,533	0,0369	112
	150		150		0,556	0,0385	117





**Şekil 3.11:** DMSO'nun hCA-II izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini gösteren % aktivite-DMSO hacmi grafiği.

### 3.7 Tadalafil ve Türevlerinin CA Substratına Etkisinin İncelenmesi

Tadalafil ve orjinal türevlerinin CA substratı, p-nitrofenil asetata (p-NFA) etkisinin incelenmesi için deneyler, inhibisyon çalışmalarında kullanılan madde konsantrasyonları ile enzimsiz ortamda gerçekleştirildi. 400 µL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH 7,4) tamponu, 300 µL p-NFA substratı ve reaksiyon hacmi 1050 µL olacak şekilde değişen miktarlarda distile su ve test maddesi kullandı. Reaksiyon, enzimsiz ortamda olduğundan küvete test maddesinin eklenmesi ile 25 °C'de 348 nm'de ilk absorbansı ölçüldü ve 3 dakika sonra ikinci ölçüm alındı. Deneyde kullanılan miktarlar ve 348 nm'deki absorbans değerleri tablo 3.7-3.12'de verilmiştir.

**Tablo 3.7:** Tadalafilin p-NFA substratına etkisi.

Tadalafil					
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distile su (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	[I] μM	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)
400	350	300	0	0,00	0,005
	340		10	9,52	0,004
	330		20	19,05	0,005
	310		40	38,10	0,005
	270		80	76,19	0,004
	230		120	114,29	0,002

**Tablo 3.8:** Alliltadalafilin p-NFA substratına etkisi.

Alliltadalafil					
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distile su (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	[I] μM	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)
400	350	300	0	0,00	0,005
	340		10	9,52	0,003
	330		20	19,05	0,006
	270		80	76,19	0,008
	250		100	95,24	0,005
	200		150	142,86	0,001

**Tablo 3.9:** Furfuriltadalafilin p-NFA substratına etkisi.

Furfuriltadalafil					
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distile su (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	[I] μM	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)
400	350	300	0	0,00	0,005
	330		20	19,05	0,009
	310		40	38,10	0,004
	290		60	57,14	0,001
	230		120	114,29	0,003
	200		150	142,86	0,007

**Tablo 3.10:** Morfolintadalafilin p-NFA substratına etkisi.

<b>Morfolintadalafil</b>					
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distile su (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	[I] μM	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)
400	350	300	0	0,00	0,005
	340		10	95,24	0,005
	320		30	285,71	0,009
	310		40	380,95	0,012
	270		80	761,90	0,183
	250		100	952,38	0,288
	200		150	1428,57	0,163

**Tablo 3.11:** Sikloheksiltadalafilin p-NFA substratına etkisi.

<b>Sikloheksiltadalafil</b>					
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distile su (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	[I] μM	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)
400	350	300	0	0,00	0,005
	340		10	9,52	0,005
	330		20	19,05	0,020
	310		40	38,10	0,031
	290		60	57,14	0,042
	250		100	95,24	0,075

**Tablo 3.12:** Piperoniltadalafilin p-NFA substratına etkisi.

<b>Piperoniltadalafil</b>					
Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distile su (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	[I] μM	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)
400	350	300	0	0,00	0,005
	330		20	19,05	0,015
	320		30	28,57	0,043
	300		50	47,62	0,041
	280		70	66,67	0,053
	270		80	76,19	0,059
	250		100	95,24	0,135

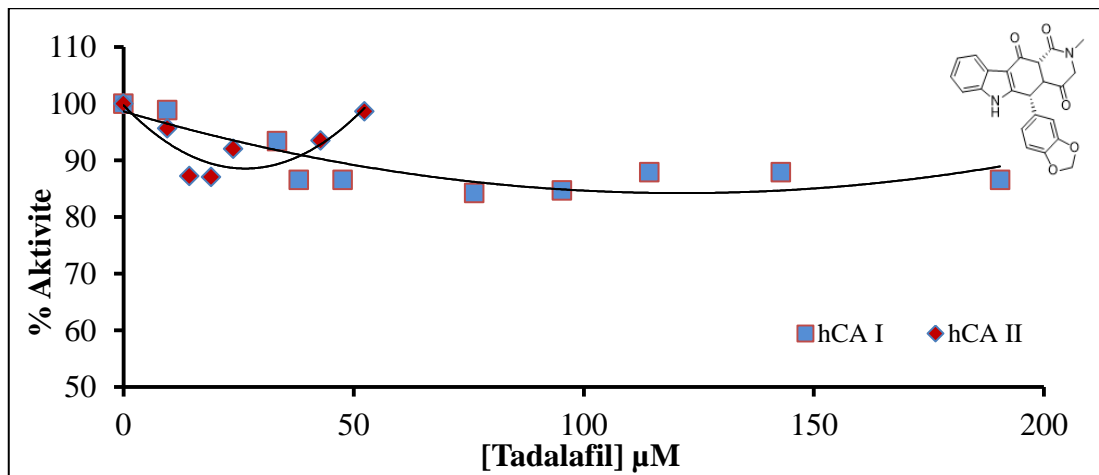
### **3.8 Tadalafil ve Türevlerinin hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi**

Tadalafil ve yeni sentezlenen türevlerinin karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerini incelemek için farklı inhibitör konsantrasyonlarında esteraz aktivite ölçümleri yapılmıştır. İnhibisyon çalışmalarında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar tablo 3.13-3.18'de verilmiştir. Her bir bileşik için % aktivite-[I] grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.12-3.17). Grafiklerden yararlanılarak bileşiklerden bazıları için  $IC_{50}$  ve  $IC_{80}$  değerleri hesaplandı. Sonuçlar tablo 3.19'da verilmiştir.

**Tablo 3.13:** hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine tadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (µL)	Distile su (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µ M	hCA-I			hCA-II		
						ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite
400	350	300	0	50	0	0,013	0	0	0,006	0	0
	300		0		0	0,219	0,0153	100	0,525	0,0368	100
	290		10		9,52	0,217	0,0152	99	0,502	0,0351	96
	285		15		14,29	*	*	*	0,458	0,0321	87
	280		20		19,05	*	*	*	0,457	0,0320	87
	275		25		23,81	*	*	*	0,483	0,0338	92
	265		35		33,33	0,205	0,0143	93	*	*	*
	260		40		38,10	0,190	0,0133	87	*	*	*
	255		45		42,86	*	*	*	0,491	0,0344	94
	250		50		47,62	0,190	0,0133	87	*	*	*
	245		55		52,38	*	*	*	0,518	0,0363	99
	220		80		76,19	0,185	0,0129	84	*	*	*
	200		100		95,24	0,186	0,0130	85	*	*	*
	180		120		114,29	0,193	0,0135	88	*	*	*
	150		150		142,86	0,193	0,0135	88	*	*	*
	100		200		190,48	0,190	0,0133	87	*	*	*

\*Çalışılmayan konsantrasyonlar

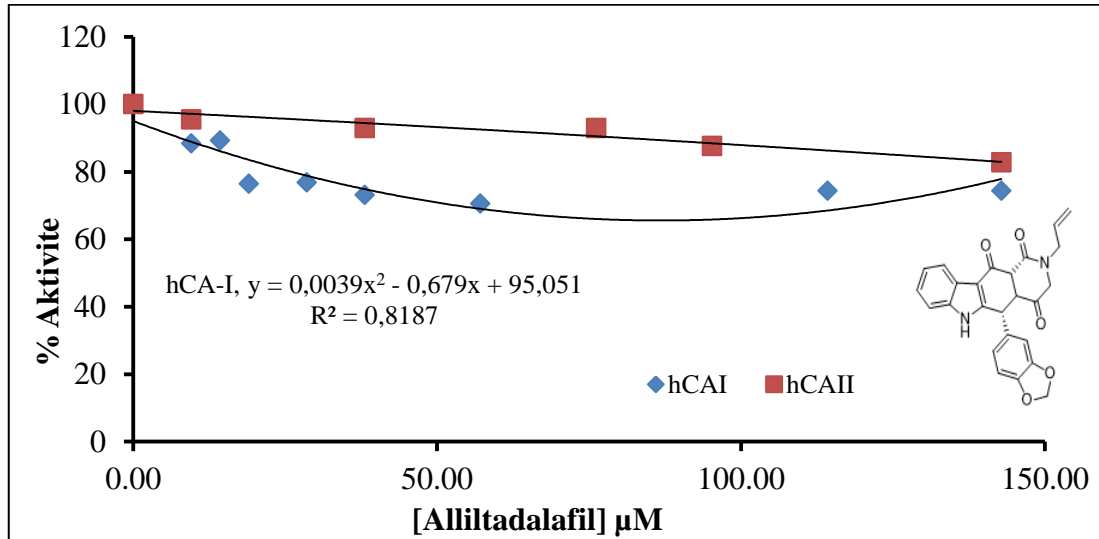


**Şekil 3.12:** Tadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.14:** hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine alliltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Tris-SO4 tamponu (µL)	Distile su (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µ M	hCA-I			hCA-II		
						ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite
400	350	300	0	0	0,00	0,013	0,0000	0	0,007	0,0000	0
			0	0,00	0,241	0,0169	100	0,561	0,0392	100	
			10	9,52	0,213	0,0149	88	0,535	0,0375	95	
			15	14,29	0,215	0,0151	89	*	*	*	
			20	19,05	0,184	0,0129	76	*	*	*	
			30	28,57	0,185	0,0130	77	*	*	*	
			40	38,10	0,176	0,0123	73	0,521	0,0365	93	
			60	57,14	0,170	0,0119	71	*	*	*	
			80	76,19	*	*	*	0,521	0,0365	93	
			100	95,24	*	*	*	0,491	0,0344	88	
			120	114,29	0,179	0,0125	74	*	*	*	
			150	142,86	0,179	0,0125	74	0,464	0,0325	83	

\*Çalışılmayan konsantrasyonlar

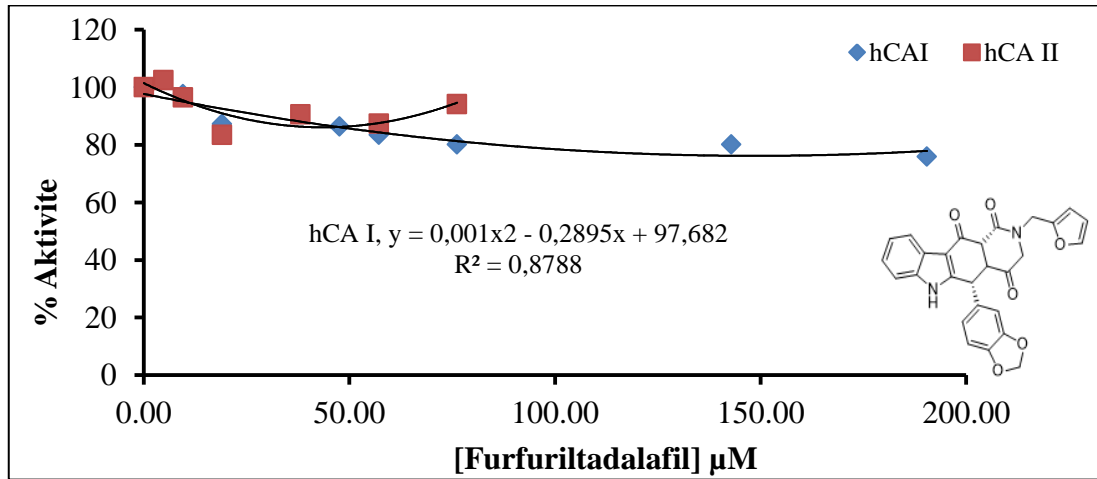


**Şekil 3.13:** Alliltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivite üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.15:** hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine furfuriltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (µL)	Distile su (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µ M	hCA-I			hCA-II		
						ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite
400	350	300	0	0	0,00	0,014	0,0000	0	0,006	0,000	0
	300		0	0,00	0,212	0,0148	100	0,509	0,0356	100	
	295		5	4,76	*	*	*	0,522	0,0365	103	
	290		10	9,52	0,207	0,0145	98	0,491	0,0344	96	
	280		20	19,05	0,185	0,0130	87	0,425	0,0298	83	
	260		40	38,10	*	*	*	0,461	0,0323	91	
	250		50	47,62	0,183	0,0128	86	*	*	*	
	240		60	57,14	0,177	0,0124	83	0,445	0,0312	87	
	220		80	76,19	0,170	0,0119	80	0,479	0,0335	94	
	150		150	142,86	0,170	0,0119	80	*	*	*	
	100		200	190,48	0,161	0,0113	76	*	*	*	

\*Çalışılmayan konsantrasyonlar

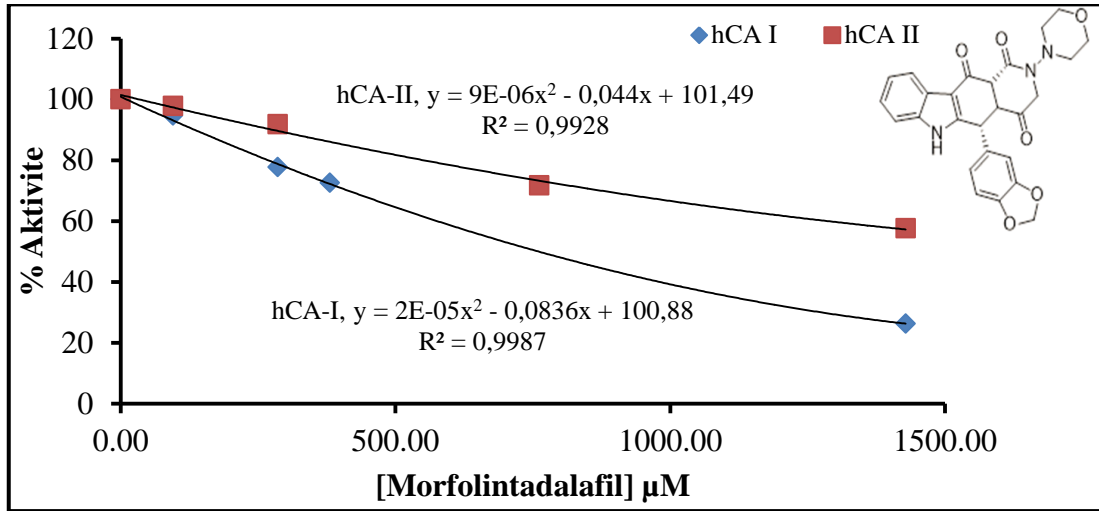


**Şekil 3.14:** Furfuriltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivite üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.16:** hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine morfolintadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distilesu (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	Enzim (μL)	[I] μ M	hCA-I			hCA-II		
						ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite
400	350	300	0	50	0,00	0,010	0,0000	0	0,004	0,0000	0
	300		0		0,00	0,236	0,0165	100	0,517	0,0362	100
	290		10		95,24	0,223	0,0156	95	0,506	0,0352	98
	270		30		285,71	0,183	0,0128	78	0,475	0,0333	92
	260		40		380,95	0,171	0,0120	73	*	*	*
	220		80		761,90	*	*	*	0,371	0,0260	72
	150		150		1428,57	0,062	0,0043	26	0,298	0,0209	58

\*Çalışılmayan konsantrasyonlar

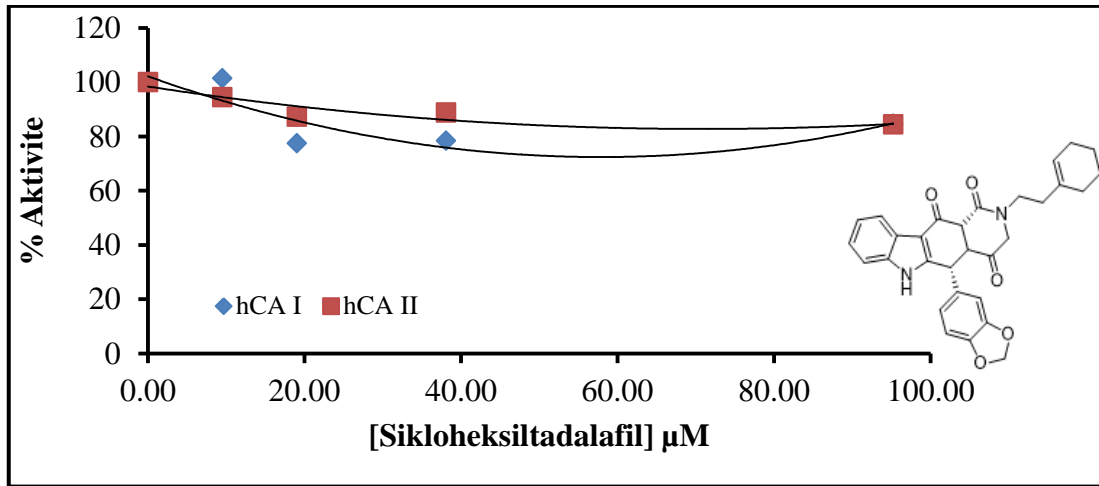


**Şekil 3.15:** Morfolintadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esteraz aktivite üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.



**Tablo 3.17:** hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine sikloheksiltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (μL)	Distilesu (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	Enzim (μL)	[I] μ M	hCA-I			hCA-II		
						ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite
400	350	300	0	0	0,00	0,010	0,0000	0	0,010	0,0000	0
	300		0	50	0,00	0,222	0,0155	100	0,524	0,0367	100
	290		10	50	9,52	0,225	0,0158	101	0,495	0,0347	94
	280		20	50	19,05	0,172	0,0120	77	0,457	0,0320	87
	260		40	50	38,10	0,174	0,0122	78	0,465	0,0326	89
	200		100	50	95,24	0,188	0,0132	85	0,442	0,0309	84

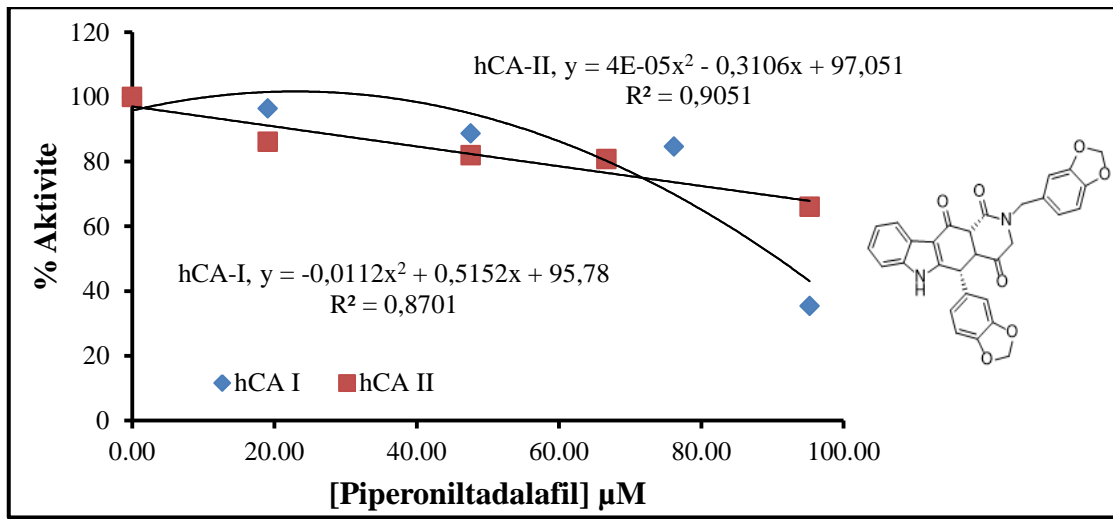


**Şekil 3.16:** Sikloheksiltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esterez aktivite üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.18:** hCA-I ve hCA-II izoenzimleri aktivitesi üzerine piperoniltadalafilin inhibisyon etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

Tris-SO <sub>4</sub> tamponu (µL)	Distile su (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µ M	hCA-I			hCA-II		
						ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite	ΔA <sub>348 nm</sub> (t <sub>3</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (EÜ/mL)	% Aktivite
400	350	300	0	0	0,00	0,004	0,0000	0	0,008	0,0000	0
400	300	300	0	50	0,00	0,195	0,0137	100	0,589	0,0412	100
400	280	300	20	50	19,05	0,188	0,0132	96	0,507	0,0355	86
400	250	300	50	50	47,62	0,173	0,0121	89	0,483	0,0338	82
400	230	300	70	50	66,67	*	*	*	0,476	0,0333	81
400	220	300	80	50	76,19	0,165	0,0116	85	*	*	*
400	200	300	100	50	95,24	0,069	0,0048	35	0,389	0,0272	66

\*Çalışılmayan konsantrasyonlar



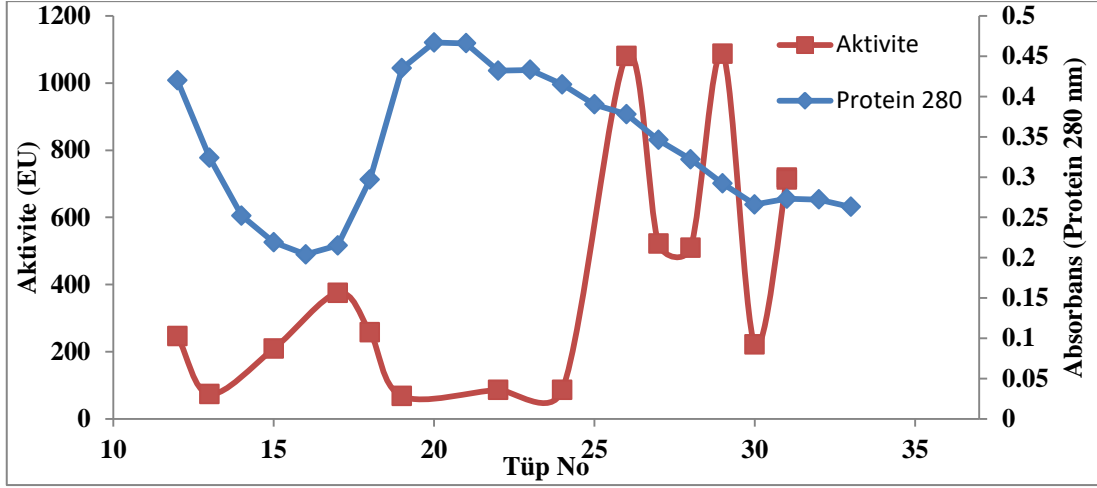
**Şekil 3.17:** Piperoniltadalafilin hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin esterase aktivite üzerine etkisini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.19:** Tadalafil ve türevlerinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için % aktivite-[I] grafiklerinden bulunan IC<sub>50-80</sub> değerleri.

Bileşik Adı	hCA-I	hCA-II
Alliltadalafil	IC <sub>80</sub> : 26 µM	—
Furfuriltadalafil	IC <sub>80</sub> : 87 µM	—
Morfolintadalafil	IC <sub>80</sub> : 266 µM	IC <sub>80</sub> : 548 µM
Piperoniltadalafil	IC <sub>50</sub> : 90,9 µM	IC <sub>80</sub> : 55 µM

### 3.9 İnsan PON 1 İzoenziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile Saflaştırılması

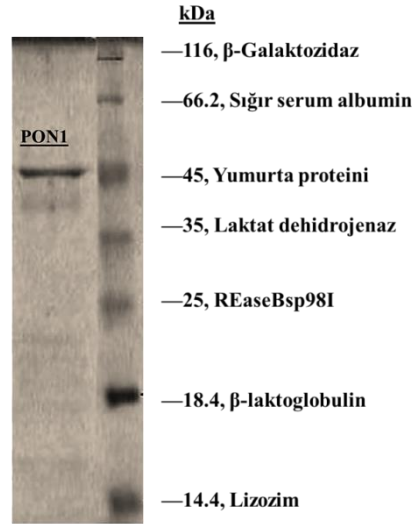
Yöntemler bölümünde belirtildiği gibi amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen çökelek 6 mL 0,1 M Tris-baz (pH 8,0) çökelek tamponu içinde çözüldü. Elde edilen çözelti hazırlanan Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin hidrofobik etkileşim kolonuna tatbik edildi. Paraoksonaz enziminin elüsyonu için kolona 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8,0) tamponu ve 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8,0) tamponu ile oluşturulan yüksek tuz konsantrasyonundan düşük tuz konsantrasyonuna doğru bir tuz gradienti uygulandı. Yıkama ve elüsyon çözeltileri 1,5 mL'lik eluatlar halinde ependorf tüplere toplandı. Daha sonra her bir tüp için 280 nm'de kalitatif protein tayini ve bölüm 2.2.3.4'de belirtildiği gibi 412 nm'de aktivite tayini yapıldı. Enzim aktivitesi enzim ünitesi (µmol/dakika) cinsinden hesaplanarak elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı aktivite ve protein miktarı grafiği çizildi (Şekil 3.18). Yapılan protein ve aktivite ölçümlerinin sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirilerek inhibisyon çalışmalarında kullanıldı.



Şekil 3.18: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan PON1 enziminin elüsyon grafiği.

### 3.10 İnsan serum PON1 İzoenziminin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Hidrofobik etkileşim kolonu ile saflaştırılan serum paraoksonaz enziminin saflığını kontrol etmek için bölüm 2.2.4'de anlatıldığı şekilde SDS poliakrilamid elektroforezi uygulandı. Protein bantları içeren jellerin fotoğrafı çekildi (Şekil 3.19).



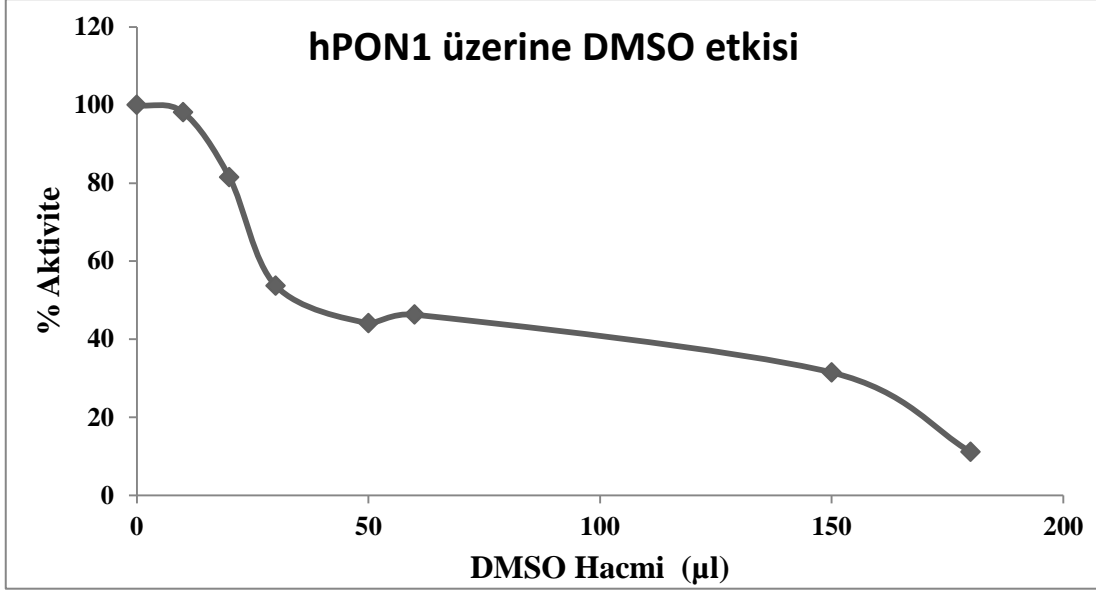
Şekil 3.19: Hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan insan serum PON1 izoenziminin SDS-PAGE görüntüsü.

### 3.11 DMSO'nun hPON1 İzoenzimi Üzerine Etkisi

DMSO'nun hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için, bölüm 2.2.3.4 hPON1 enzim aktivite tayin yönteminde belirtildiği gibi 37 °C'de, 412 nm'de 1 dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. Tablo 3.20, DMSO'nun hPON1 izoenzime etkisi için kullanılan miktarları ve hPON1 aktivitelerini göstermektedir. Ölçüm sonuçlarına ait % aktivite-DMSO hacmi grafikleri şekil 3.20'da verilmiştir.

**Tablo 3.20:** DMSO'nun hPON1 izoenzimi aktivitesi üzerine etkisi.

Bazal Aktivite Tamponu (µL)	Substrat (µL)	DMSO (µL)	Enzim µL	$\Delta A_{412 \text{ nm}}$ ( $t_1-t_0$ , dk)	Aktivite (µmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0,009	0	0
950		0	50	0,063	0,06631	100
940		10	50	0,062	0,06508	98
930		20	50	0,053	0,05403	81
920		30	50	0,038	0,03561	54
900		50	50	0,033	0,02924	39
890		60	50	0,034	0,03070	46
800		150	50	0,026	0,02088	31
770		180	50	0,015	0,00737	11



**Şekil 3.20:** DMSO'nun hPON1 enzim aktivitesine etkisini gösteren % aktivite-DMSO hacim grafiği.

### 3.12 Tadalafil ve Türevlerinin hPON1 Substratına Etkisinin İncelenmesi

Tadalafil ve orjinal türevlerinin hPON1 substratı, paraoksana etkisinin incelenmesi için, deneyler inhibisyon çalışmalarında kullanılan madde konsantrasyonları ile enzimsiz ortamda gerçekleştirildi. Reaksiyon, enzimsiz ortamda olduğundan küvete test maddesinin eklenmesi ile 37 °C'de, 412 nm'de 1 dakika içinde absorbansda meydana gelen değişim okundu. Deneyde kullanılan miktarlar ve 412 nm'deki absorbans değerleri tablo 3.21-3.26'da verilmiştir.

**Tablo 3.21:** Tadalafilin hPON1 substratına etkisi.

<b>Tadalafil</b>				
<b>Bazal Aktivite Tamponu, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Substrat (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>İnhibitör (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[I] <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\Delta A_{412 \text{ nm}}</math> (<math>t_1-t_0</math>, dk)</b>
1000	50	0	0,00	0,008
950	50	50	47,62	0,001
900	50	100	95,24	0,002
850	50	150	142,86	0,003
800	50	200	190,48	0,010

**Tablo 3.22:** Alliltadalafilin hPON1 substratına etkisi.

<b>Alliltadalafil</b>				
<b>Bazal Aktivite Tamponu, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Substrat (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>İnhibitör (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[I] <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\Delta A_{412 \text{ nm}}</math> (<math>t_1-t_0</math>, dk)</b>
1000	50	0	0,00	0,002
980	50	20	19,05	0,011
950	50	50	47,62	0,011
920	50	80	76,19	0,027
850	50	150	142,86	0,006
800	50	200	190,48	0,025

**Tablo 3.23:** Furfuriltadalafilin hPON1 substratına etkisi.

<b>Furfuriltadalafil</b>				
<b>Bazal Aktivite Tamponu, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Substrat (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>İnhibitör (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[I] <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\Delta A_{412 \text{ nm}}</math> (<math>t_1-t_0</math>, dk)</b>
1000	50	0	0,00	0
980	50	20	19,05	0,012
950	50	50	47,62	0,008
900	50	100	95,24	0,014
850	50	150	142,86	0,008
800	50	200	190,48	0,009

**Tablo 3.24:** Morfolintadalafilin hPON1 substratına etkisi.

<b>Morfolintadalafil</b>				
<b>Bazal Aktivite Tamponu, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Substrat (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>İnhibitör (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[I] <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\Delta A_{412 \text{ nm}}</math> (<math>t_1-t_0</math>, dk)</b>
1000	50	0	0,00	0,008
990	50	10	9,52	-0,001
950	50	50	47,62	0,005
900	50	100	95,24	-0,003
800	50	200	190,48	0,005
750	50	250	238,10	0,011

**Tablo 3.25:** Sikloheksiltadalafilin hPON1 substratına etkisi.

<b>Sikloheksiltadalafil</b>				
<b>Bazal Aktivite Tamponu, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Substrat (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>İnhibitör (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[I] <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\Delta A_{412 \text{ nm}}</math> (<math>t_1-t_0</math>, dk)</b>
1000	50	0	0,00	0,029
980	50	20	19,05	0,026
970	50	30	28,57	0,010
950	50	50	47,62	0,018
900	50	100	95,24	0,035
850	50	150	142,86	0,028

**Tablo 3.26:** Piperoniltadalafilin hPON1 substratına etkisi.

<b>Piperoniltadalafil</b>				
<b>Bazal Aktivite Tamponu, <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Substrat (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>İnhibitör (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>[I] <math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\Delta A_{412 \text{ nm}}</math> (<math>t_1-t_0</math>, dk)</b>
1000	50	0	0,00	0,002
980	50	20	19,05	0,012
950	50	50	47,62	0,030
900	50	100	95,24	-0,022
870	50	130	123,81	0,035
850	50	150	142,86	0,049

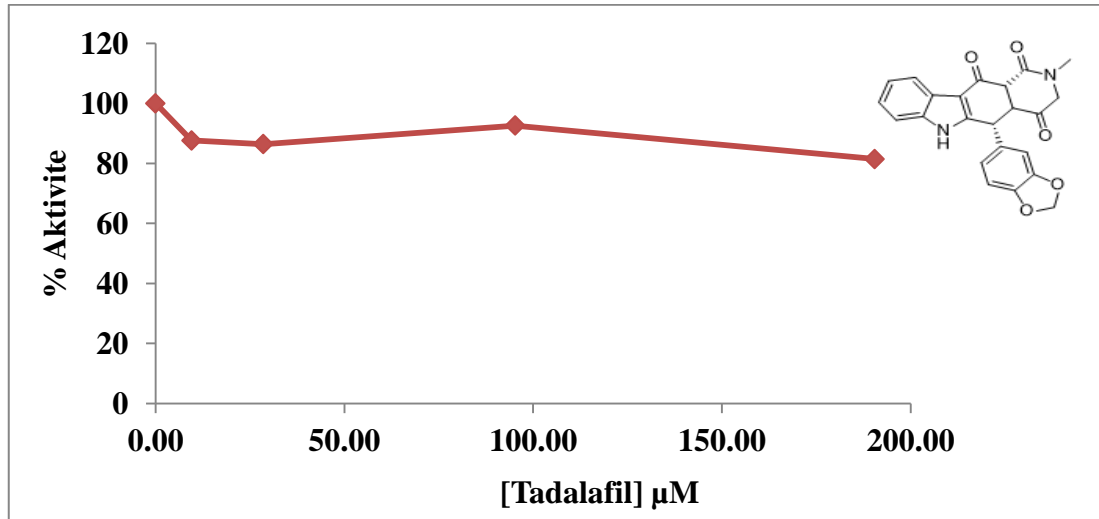


### 3.13 Tadalafil ve Türevlerinin hPON1 İzoenziminin Aktivitesi Üzerine Etkileri

Tadalafil ve türevlerinin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerindeki etkisini inceleyen sabit substrat ve farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapılmıştır. Kullanılan maddeler ve miktarları tablo 3.27- 3.32’de verilmektedir. %Aktivite-[I] grafikleri şekil 3.21-3.26’da gösterilmektedir. Söz konusu bileşiklerden sadece sikloheksiltadalafil için % aktivite-[I] grafiğinden faydalanarak IC<sub>50</sub> değeri (119,2 µM) hesaplanmıştır.

**Tablo 3.27:** Tadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.

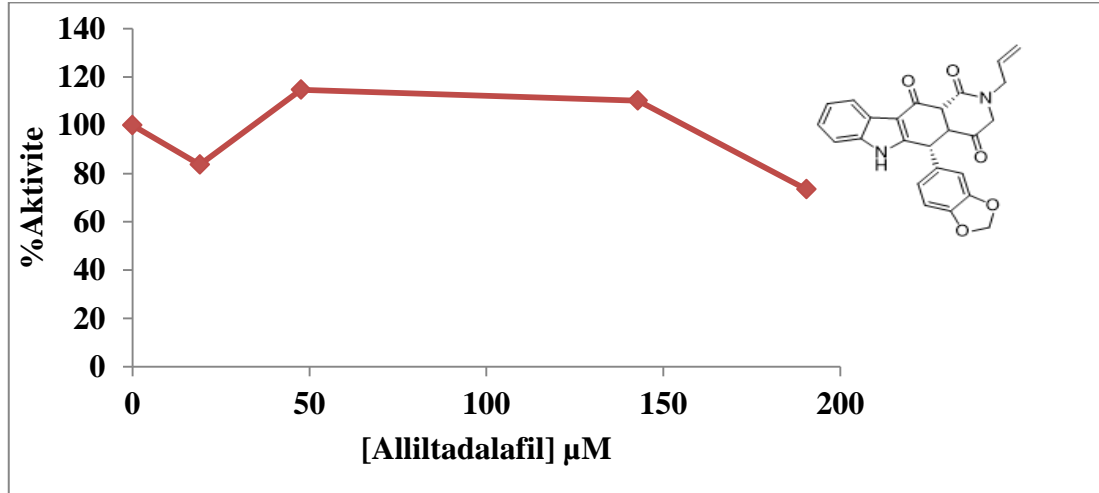
Bazal Aktivite Tamponu, (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör, (µL)	Enzim (µL)	[I] µM	ΔA <sub>412 nm</sub> (t <sub>1</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (µmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0	0,0080	0	0
950	50	0	50	0	0,0890	0,0995	100
940	50	10	50	9,52	0,0790	0,0872	88
920	50	30	50	28,57	0,0780	0,0860	86
850	50	100	50	95,24	0,0830	0,0921	93
750	50	200	50	190,48	0,0740	0,0810	81



**Şekil 3.21:** hPON1 izoenzim aktivitesinin tadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.28:** Alliltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.

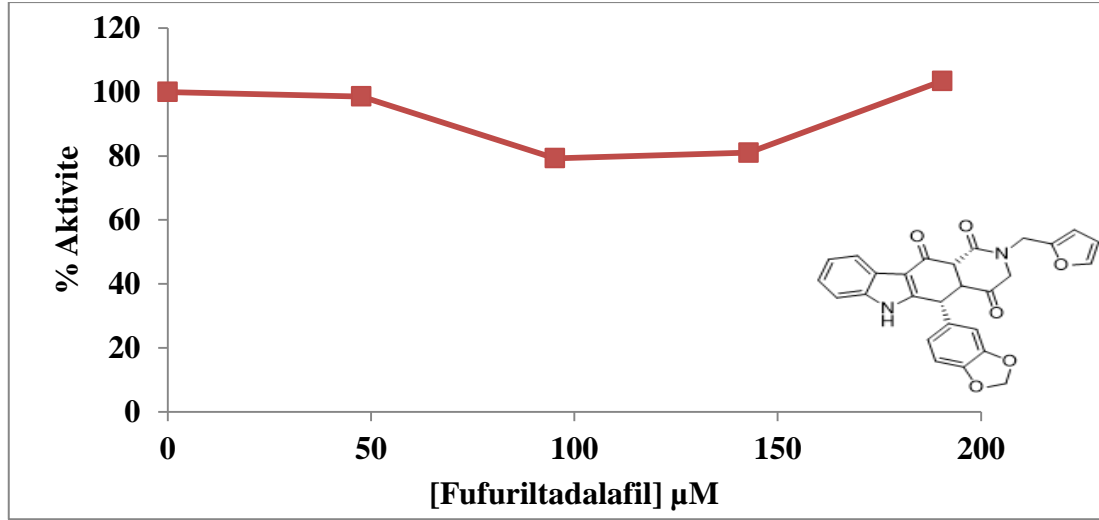
Bazal Aktivite Tamponu, (μL)	Substrat (μL)	İnhibitör (μL)	Enzim (μL)	[I] μM	$\Delta A_{412\text{ nm}}$ (t <sub>1</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (μmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0	0,0080	0	0
950	50	0	50	0	0,0570	0,0602	100
930	50	20	50	19,05	0,0490	0,0503	84
900	50	50	50	47,62	0,0642	0,0690	115
800	50	150	50	142,86	0,0620	0,0663	110
750	50	200	50	190,48	0,0440	0,0442	73



**Şekil 3.22:** hPON1 izoenzim aktivitesinin alliltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.29:** Furfuriltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.

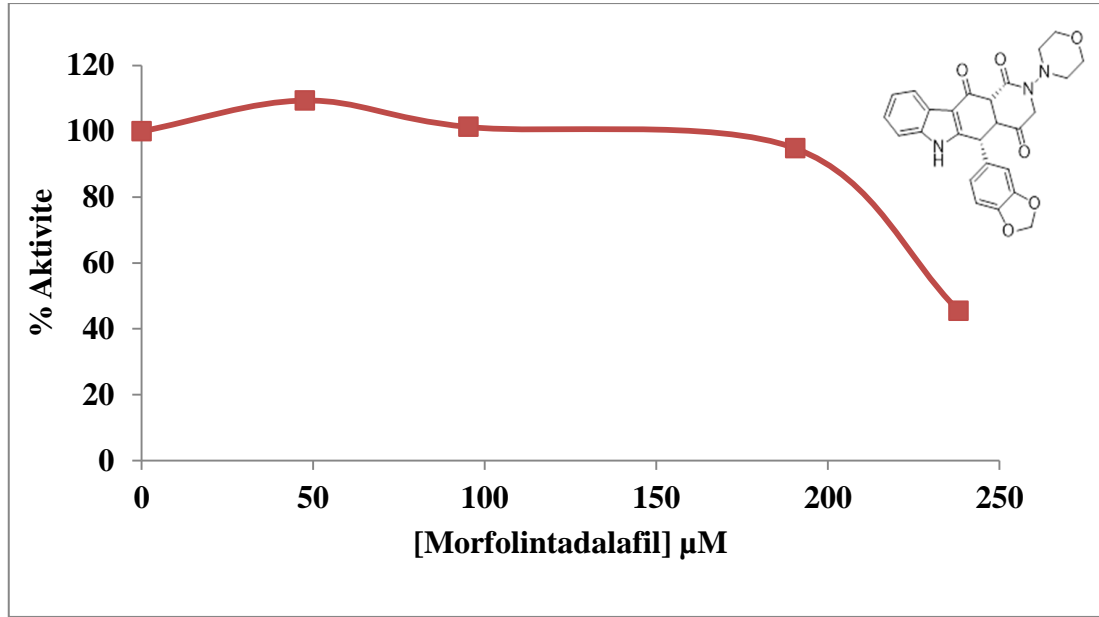
Bazal Aktivite Tamponu, (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör, (µL)	Enzim (µL)	[I] µM	$\Delta A_{412 \text{ nm}}$ ( $t_1-t_0$ , dk)	Aktivite (µmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0	0,0080	0	0
950	50	0	50	0	0,0660	0,0712	100
900	50	50	50	47,62	0,0652	0,0702	99
850	50	100	50	95,24	0,0540	0,0565	79
800	50	150	50	142,86	0,0550	0,0577	81
750	50	200	50	190,48	0,0680	0,0737	103



**Şekil 3.23:** hPON1 izoenzim aktivitesinin furfuriltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.30:** Morfolintadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.

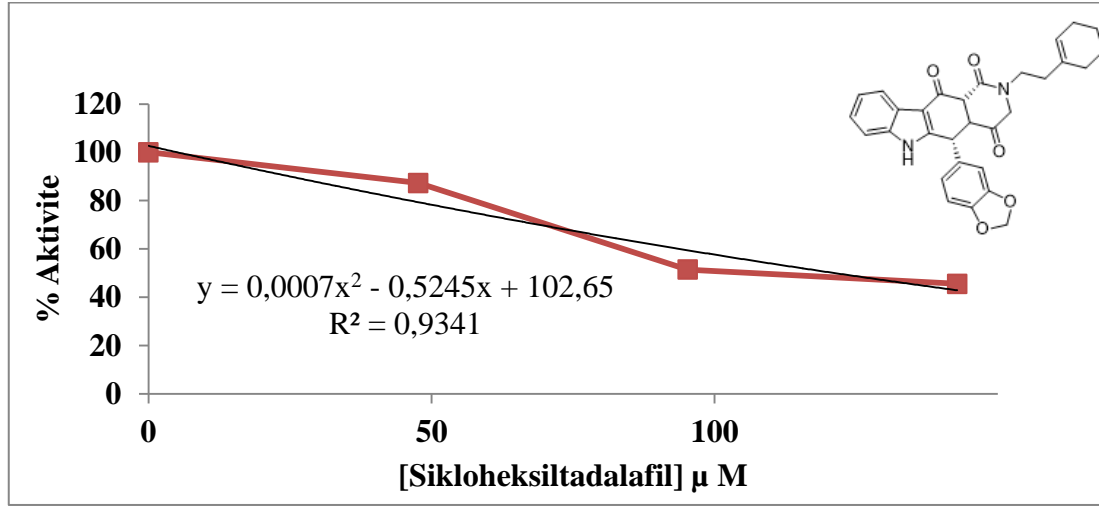
Bazal Aktivite Tamponu, (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µM	$\Delta A_{412\text{ nm}}$ (t <sub>1</sub> -t <sub>0</sub> , dk)	Aktivite (µmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0	0,0080	0	0
950	50	0	50	0	0,0850	0,0946	100
900	50	50	50	47,62	0,0922	0,1034	109
850	50	100	50	95,24	0,0860	0,0958	101
750	50	200	50	190,48	0,0810	0,0896	95
700	50	250	50	238,10	0,0430	0,0430	45



**Şekil 3.24:** hPON1 izoenzim aktivitesinin morfolintadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.31:** Sikloheksiltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.

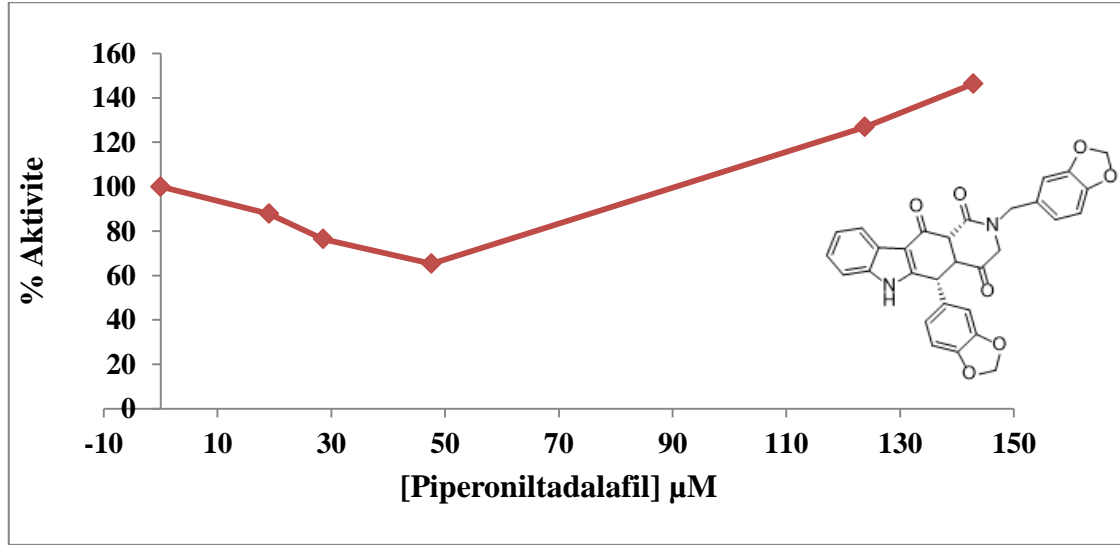
Bazal Aktivite Tamponu, (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µM	$\Delta A_{412\text{ nm}}$ ( $t_1-t_0$ , dk)	Aktivite (µmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0	0,0080	0	0
950	50	0	50	0	0,1010	0,1240	100
900	50	50	50	47,62	0,0882	0,1083	87
850	50	100	50	95,24	0,0520	0,0639	51
800	50	150	50	142,86	0,0460	0,0565	46



**Şekil 3.25:** hPON1 izoenzim aktivitesinin sikloheksiltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

**Tablo 3.32:** Piperoniltadalafilin hPON1 izoenziminin aktivitesi üzerine etkisini incelemek için kullanılan maddeler ve elde edilen sonuçlar.

Bazal Aktivite Tamponu, (µL)	Substrat (µL)	İnhibitör (µL)	Enzim (µL)	[I] µM	$\Delta A_{412\text{ nm}}$ ( $t_1-t_0$ , dk)	Aktivite (µmol/dk)	% Aktivite
1000	50	0	0	0	0,0080	0	0
950	50	0	50	0	0,0695	0,0755	100
930	50	20	50	19,05	0,0620	0,0663	88
920	50	30	50	28,57	0,0550	0,0577	76
900	50	50	50	47,62	0,0482	0,0494	65
820	50	130	50	123,81	0,0860	0,0958	127
800	50	150	50	142,86	0,0980	0,1105	146



**Şekil 3.26:** hPON1 izoenzim aktivitesinin piperoniltadalafil ile değişimini gösteren % aktivite-[I] grafiği.

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Giriş bölümünde de belirtildiği gibi, araştırmamız genel olarak iki ana bölümde değerlendirilmiştir. İlk bölümde, altı farklı tadalafil bileşiklerinin PDE1 izoenzimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. İkinci bölümde ise, yine aynı bileşiklerin hCA-I, hCA-II ve hPON1 izoenzimleri üzerindeki etkileri saptanmıştır. Bu amaçla, hCA-I ve hCA-II için Sepharose-4B-etilendiamin-4-tiyüre-dibenzensülfonamid kimyasal yapısına sahip afinite jeli kullanılarak saflaştırılmıştır. hPON1 izoenziminin saflaştırılması ise Sepharose-4B-L-tirozin-1-naftilamin jeli kullanılarak hidrofobik etkileşim tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her iki izoenzimin saflığı SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir.

Söz konusu tadalafil türevlerinin PDE1, hCA-I, hCA-II ve hPON1 izoenzimleri üzerindeki etkilerini araştırmak için bileşikler DMSO içinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu nedenle, araştırmamızda DMSO'nun izoenzimler üzerindeki etkisinin saptanması bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu amaçla 1,5-250 µL aralıklarında DMSO reaksiyon ortamına ilave edilerek enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Söz konusu çalışmanın diğer araştırmacılar için de önemli olduğu düşüncesindeyiz. Çünkü, DMSO oldukça yaygın kullanılan bir çözücüdür. Şekil 3.10, 3.11 ve 3.20'de görüldüğü gibi DMSO'nun izoenzimler üzerinde oldukça önemli etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkilerin gözardı edilerek elde edilen inhibisyon verilerinin sağlıklı olmayacağı açıkça görülmektedir. Araştırmamızda, bütün inhibisyon değerleri DMSO ile elde edilen veriler göz önüne alınarak düzenlenmiştir. Rammler, DMSO'nun bir çok enzim üzerindeki etkisini incelemiştir. Glutamat dehidrogenaz ve E.coli fosfomonoesteraz enzimlerinin aktiviteleri artan DMSO miktarı ile düşerken, alanin dehidrogenaz ve salyangoz fosfomonoesteraz enzimlerinin aktiviteleri artmıştır [84].

Tadalafil, Cialis<sup>TM</sup> ticari adıyla satılan, özellikle erektil disfonksiyonu tedavisinde kullanılan bir ilacın etken maddesidir. Tadalafil, pulmoner arteriyel hipertansiyonu ve iyi huylu prostat büyümesini tedavi etmek için de kullanılmaktadır. Vücutta yumuşak kas dokularının gevşemesini sağlayarak, damarlardaki kan akışının artmasına neden olan cGMP, önemli bir ikincil haberci

moleküldür [85,86]. Söz konusu bu molekülün regülasyonu fosfodiesterazlar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir [87]. Bir PDE5 inhibitörü olan tadalafil ile penisteki PDE5 enzimi bloke edilerek hücre içi cGMP düzeyinin yüksek kalması ve bu sayede vazodilatasyonun devam etmesi sağlanır [88]. cGMP ile kontrol edilen önemli diğer fizyolojik olaylardan bazıları; retinal rodların ışığa cevap vermesi, koku alınması, böbrek ve bağırsaklarda iyon transportu, streoidogenez, trombosit agregasyonu, kardiyak ve düz kasların kasılması şeklinde sıralanabilir [89]. ED tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılan tadalafilin, baş dönmesi, göğüs ağrısı, bulantı, sırt ağrısı, bayılma, görmede değişiklik ya da ani görme kaybı, kulakta çınlama veya ani duyma kaybı gibi çok güçlü yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bunların yanı sıra, çeşitli kalp rahatsızlıklarının tedavisi için kullanılan nitrat ilaçları ile beraber alındığında ani ölümlere de neden olabileceği bilinmektedir [90-93]. Tadalafil ve türevlerinin genel olarak PDE5 üzerinde güçlü inhibisyona sebep oldukları bilinmektedir. Bu konuda literatürde çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür [54,56,88,89,94-99]. Ancak, söz konusu bileşiklerin fosfodiesterazın diğer izoenzimlerini nasıl etkilediği konusundaki çalışmalar oldukça sınırlıdır. Özellikle PDE1 izoenzimi üzerindeki etkilerinin bilinmesinin, bu bileşiklerin kullanılmasında önemli bir kriter olacağı düşüncesindeyiz.

PDE1, başlıca, beyin, düz kaslar, kalp ve testislerde bulunan cAMP ve cGMP'yi hidroliz edebilen üç izoforma sahip bir enzimdir [8]. Bu izoenzimin en belirgin özelliği, cAMP ve cGMP'nin ikisini de substrat olarak kullanabilmesi ve aktivitesinin  $Ca^{+2}/CaM$  tarafından düzenlenmesidir [3]. PDE1'in hücre içi  $Ca^{+2}$  ve siklik nükleotid molekülleri arasında düzenleyici bir role sahip olduğu bilinmektedir [1,6]. Çeşitli doku ve organlarda bulunan PDE1 izoenzimleri sayesinde cAMP / cGMP bağımlı bir çok fizyolojik olay kontrol edilebilmektedir. Vasküler düz kasların kasılmalarının ve ilgili hücrelerin çoğalmasının, sperm fonksiyonlarının, merkezi sinir sistemi fonksiyonlarının (hafıza ve öğrenme fonksiyonları gibi), dopaminerjik sinyalizasyonun ve bağışıklık sistemindeki hücrelerin aktivasyonunun düzenlenmesi gibi bir çok önemli fizyolojik olaylar bunlardan bazılarıdır [1,3,8]. Genetiği değiştirilerek elde edilen PDE1B izoenzimini bulundurmamayan farelerde lokomotor aktivitelerde bir artış gözlenirken uzamsal öğrenmede eksiklik görülmüştür. PDE1'in diğer izoformaları ile ilgili buna benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır [8]. Daha önceki çalışmalarda cAMP'nin metabolizma ve sinir sistemi fonksiyonlarının



düzenlenmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, cAMP konsantrasyonunun Parkinson hastalarında düşük olması ile PDE1 inhibitörlerinin Parkinson ve Alzheimer gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için farmakolojik bir hedef haline getirmiştir [46]. PDE1'in üzerinde en fazla çalışma yapılan inhibitörü, bir alkaloid olan vinpocetindir. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi bir çok ülkede genel olarak beyin damar hastalıkları ve bilişsel bozukluk, kalp krizi, yaşlılığa bağlı bunama, hafıza karışıklığı gibi rahatsızlıkların tedavisi için kullanılmıştır [46,50-52]. Başlangıçta, PDE1 inhibitörlerinin iyi birer vasküler rahatlatıcı olduğu düşünülse de artık bunun doğru olmadığı bilinmektedir. Öyle ki, PDE1 inhibitörlerinin aynı zamanda PDE5'i de eşit oranda inhibe ettiği bilinmektedir [46]. PDE1'in organizmadaki fonksiyonunun daha iyi anlaşılabilmesi için, PDE1'e spesifik inhibitörlerin araştırılması bu bakımdan da oldukça önemlidir.

Araştırmamızda kullanılan tadalafil bileşikleri, Sakarya Üniversitesinden Doç. Dr. Mustafa ZENGİN ve araştırma ekibi tarafından materyal-yöntem bölümünde belirtildiği şekilde sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin PDE1 üzerindeki etkileri saptanmıştır. %Aktivite-[I] grafiklerinden faydalanarak bazı bileşikler için IC<sub>50</sub>-IC<sub>60</sub> değerleri belirlenmiştir. PDE1 üzerinde test edilen 6 farklı tadalafil türeviden sikloheksiltadalafil ve piperoniltadalafil hariç, diğerlerinin  $\mu$ M düzeyde enzimi inhibe ettiği saptanmıştır. İnhibisyon etkisi gösteren bileşiklerden tadalafil için 178  $\mu$ M ve morfolintadalafil için 375  $\mu$ M IC<sub>50</sub> değerleri olarak hesaplanmıştır. Alliltadalafil ve furfuriltadalafil için ise inhibisyon değerleri IC<sub>60</sub> şeklinde saptanmıştır. Bu değerler sırası ile 105 ve 97  $\mu$ M olarak hesaplanmıştır. Sikloheksiltadalafil ve piperoniltadalafil'in, çalışılan konsantrasyon aralıklarında (20-600  $\mu$ M) PDE1 üzerinde belirli oranlarda aktivatör özelliği gösterdiği saptanmıştır (şekil 3.6-3.7). Molekül yapılarının birbirine çok benzemesine rağmen, sikloheksiltadalafil ve piperoniltadalafilin aktivatör etkisi göstermesi oldukça dikkat çekicidir. Enzim-inhibitör etkileşmelerinin kompleks ve çok yönlü olmasından dolayı, inhibitördeki küçük farklılıkların enzimin aktivitesi üzerinde dramatik farklılıklara sebep olduğu görülmektedir. Litaratürde bu tür çalışmalara oldukça fazla rastlanmaktadır. Ferguson ve Carson'un 2013'deki çalışmalarında açıkça görülmektedir ki klinikte ED tedavisinde başarıyla kullanılan PDE5 inhibitörlerinden olan sildenafil ve vardenafilin molekül yapılarının oldukça benzer olmasına rağmen, diğer PDE izoformlarına karşı seçiciliklerinde, gösterdikleri yan etkilerde ve

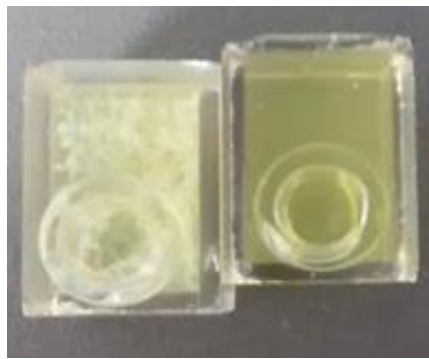
uygulama sonrası etki gösterme zamanında farklılıklar vardır [54,61]. Gokçe ve arkadaşlarının [81] yaptığı bir çalışmada da kumarin ve türevlerinin hPON1 üzerine yaptığı etkiler incelenmiştir. Bu çalışmada, kumarin ve türevleri arasında yapısal farklılıkların az olduğu durumda bile IC<sub>50</sub> değerleri 35-287 µM arasında bir değişiklik göstermiştir. Zengin Kurt ve arkadaşları [17] tarafından yapılan çalışmada da sülfonamid süstitüe kumariltiyazol türevlerinin, hCA-I, hCA-II izoenzimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, IC<sub>50</sub> değerleri çok farklı olan moleküller arasındaki benzerlik dikkat çekmektedir ( hCA-I için 5,63-22,63 µM ve hCA-II için 8,49-23,87 µM).

Araştırmamızın ikinci bölümünde, söz konusu tadalafil ve türevlerinin hCA-I, hCA-II ve hPON1 üzerindeki etkileri saptanmıştır.

Karbonik anhidraz, çinko iyonu içeren, doğada oldukça yaygın bulunan bir metaloenzimdir. Giriş bölümünde de belirtildiği gibi canlılarda başlıca, CO<sub>2</sub>'in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> a geri dönüşümlü hidrasyonunu katalizleyen bu enzim, CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transportunu sağlamanın yanı sıra bir çok doku ve organda HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> birikiminde, CO<sub>2</sub> ve pH dengesinin sağlanmasında, solunum olayında, elektrolit salgılanmasında, kemik erimesinde, kireçlenme ve tümör oluşumunda da rol almaktadır [67,100]. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin kendi spesifik bölgelerinde farklı fonksiyonlar göstermesinden dolayı, eksikliklerinde bir çok hastalıkla bağlantılı olabilirler. Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumunda hCA-II'nin kalıtsal eksikliği, CA II eksikliği sendromu olarak belirlenmiştir. Bu sendromun, kemiklerde kireçlenme, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir [67]. CA enzim aktivitesi çok önemli olduğu için; Anzataks, Metotreksat, Lastet, Kampto, Sisplatin, Gemzar, 5-Fluorourasil/EBEWE, 5-Fluorourasil/Biocyn, Elokstatin, Farmorubisin, Karboplatin gibi bazı kemoterapi ilaçlarının; Amoklavin, Genta, Cefamezine, Amplital, Klacid, Rifocine, Klindaver, Bactrim, Ciproxin, Keraflox, Kemicetine süksinat, Rosamisin, Avalox, Amoxicilina, Aksef gibi bazı antibiyotiklerin ve daha bir çok bileşiğin CA enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır [67].

Bu çalışmada, tadalafil ve türevlerinin hCA-I ve hCA-II üzerindeki etkileri araştırılarak % aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.12-3.17). İlgili inhibitörlerin inhibisyon etkisine göre IC<sub>50</sub>-IC<sub>80</sub> değerleri hesaplandı. Bu bileşiklerden tadalafilin hCA-I üzerine 0-190 µM aralığında kayda değer bir inhibisyon göstermediği ancak

0-60  $\mu\text{M}$  aralığında hCA-II'ye karşı belirli oranda aktivator özelliği gösterdiği saptanmıştır (şekil 3.12). Alliltadalafilin hCA-II enzimi üzerinde çalışılan konsantrasyon aralığında önemli etki göstermediği bulunmuştur. Ancak, hCA-I izoenzimi üzerinde belirli ölçüde inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır ( $\text{IC}_{80}=26 \mu\text{M}$ ). Alliltadalafile benzer şekilde, furfuriltadalafil de hCA-II üzerinde inhibisyon etkisi göstermezken, hCA-I izoenzimi üzerine inhibisyon etkisi göstermiş ve  $\text{IC}_{80}$  değeri, 87  $\mu\text{M}$  olarak tespit edilmiştir. CA üzerine etkisi incelenen diğer bir bileşik olan morfolintadalafilin 400  $\mu\text{M}$ 'dan yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında madde etkisinin arttığı ve ölçümleri olumsuz etkilediği saptanmıştır. Bundan dolayı yüksek konsantrasyonda ( $>1400 \mu\text{M}$ ) gözlenen yüksek inhibisyon etkisinin maddenin girişim yapmasına bağlanabileceğini düşünmekteyiz. Buna rağmen, morpholintadalafilin hCA-I için 266  $\mu\text{M}$ , hCA-II için ise 548  $\mu\text{M}$   $\text{IC}_{80}$  değerleri hesaplanmıştır. Piperoniltadalafil bileşiğinin ise, hCA-I ve hCA-II izoenzimeleri üzerinde belirli düzeyde inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır (sırası ile  $\text{IC}_{50}=90,9 \mu\text{M}$  ve  $\text{IC}_{80}=55 \mu\text{M}$ ). hCA-I ve hCA-II üzerine etkisine bakılan diğer bileşikler için, çalışılan konsantrasyonlarda düşük oranlarda inhibisyon etkisi gözlenmesine rağmen,  $\text{IC}_{50}$  veya  $\text{IC}_{80}$  değerleri hesaplanamamıştır. Bu bileşikler için de, yüksek inhibitör konsantrasyonlarında maddelerin girişim yaptığı ve ölçümleri olumsuz etkilediği gözlenmiştir (şekil 4.1).



**Şekil 4.1:** hCA-II aktivitesi üzerine Sikloheksiltadalafil bileşiğinin etkisi incelenirken yüksek inhibitör konsantrasyonunda (soldaki) küvetin bulanıklaşmasını ve ölçümü olumsuz etkilemesini gösteren fotoğraf.

Tadalafil ve türevlerinin inhibisyon etkilerini araştırdığımız diğer enzimimiz olan hPON1, giriş bölümünde de belirtildiği gibi antioksidan, detoksifikasyon ve antibakteriyel etkilere sahip önemli enzimlerden biridir. hPON1'in aktivitesi ve düzeyi, yüksek kolesterol, obezite, böbrek yetmezliği, kalp damar hastalıkları, romatizmal kireçlenme, yüksek tansiyon ve tip 2 şeker hastalığı gibi bir çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir [65,72,75]. Sinan (2005), gentamisin sülfat, sodyum ampisilin, sefazolin sodyum, siperofloksasin, klaritromisin, kloramfenikol, rifamisin SV, klindamisin fosfat gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin hPON1 enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemiştir. Söz konusu antibiyotiklerden rifamisin SV dışında diğerlerinin hPON1'i inhibe ettiğini saptamıştır [80].

Araştırmamızda kullanılan tadalafil ve türevlerinin hPON1 üzerindeki etkileri incelenerek % aktivite-[I] grafikleri (şekil 3.21-3.26) hazırlandı. hPON1 aktivitesi üzerine etkisi incelenen bileşiklerden sadece sikloheksiltadalafil için IC<sub>50</sub> değerı (119,2 µM) hesaplanmıştır. Tadalafil, çalışılan konsantrasyonlarda (0-190 µM), hPON1 aktivitesini µM düzeyde inhibe etmiştir ancak IC<sub>50</sub> değerı hesaplanamamıştır. Morpholinotadalfilin, ancak yüksek inhibitör konsantrasyonunda (238 µM) inhibe ettiği, onun dışında önemli bir etki göstermediği saptanmıştır. Piperoniltadalafil bileşiğinin hPON1 aktivitesine karşı düşük konsantrasyonlarda (20-50 µM) inhibe edici, yüksek konsantrasyonlarda (>50 µM) ise aktive edici bir etki gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan diğer tadalafil türevlerinin de hPON1 üzerine kayda değer bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Bender, A. T., and Beavo, J. A., “Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use”, *Pharmacological Reviews*, 58, 488-520, (2006).
- [2] Lin, Y. M., Liu, Y. P., and Cheung, W. Y., “Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase  $Ca^{++}$ - dependent formation of bovine brain enzyme-activator complex”, *FEBS Letters*, 49(3), 356-360, (1975).
- [3] Lee, D. I., and Kass, D. A., “Phosphodiesterases and cyclic GMP regulation in heart muscle”, *Physiology*, 27, 248-258, (2012).
- [4] Keravis, T. and Lugnier, C., “Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signaling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments”, *British Journal of Pharmacology*, 165, 1288-1305, (2012).
- [5] Goraya, T.A., Masada, N., Ciruela, A., Willoughby, D., Clynes, M.A., and Cooper, D.M.F., “Kinetic properties of  $Ca^{2+}$  / calmodulin-dependent phosphodiesterase isoforms dictate intracellular cAMP dynamics in response to elevation of cytosolic  $Ca^{2+}$ ”, *Cellular Signaling*, 20, 359-374, (2008).
- [6] Yan, C., Zhaos, A.Z., Bentley, J.K., and Beavo, J.A., “The Calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner”, *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (41), 25699-25706, (1996).
- [7] Goroya, T.A., and Cooper, D.M.F., “ $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent phosphodiesterase (PDE1): Current perspectives”, *Cellular Signaling*, 17, 789-797, (2005).
- [8] Omori, K., Kotera, J., “Overview of PDEs and their regulation”, *Circ Res.*, 100, 309-327, (2007).
- [9] Işık, S., “Maya Karbonik Anhidrazının Ekspresyonu, Saflaştırılması, Elektroforetik ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2008).
- [10] Alım, Z., Kılınç, N., İşgör, M.M., Şengül, B., and Beydemir, Ş., “Some anti-inflammatory agents inhibit esterase activities of human carbonic anhydrase isoforms I and II: An *in vitro* study”, *Chem Biol Drug Des*, 86, 857-863, (2015).
- [11] Uzun, A., “Otoimmün hastalıklarda Karbonik Anhidraz I ve Karbonik Anhidraz II otoantikörlerinin belirlenmesinde Karbonik Anhidraz miktarı etkisinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, (2007).

- [12] Cankaya, M., Aktas, M., Kuzucu, M., Gül, İ. & Coban, T.A., “Effects of some drugs on human cord blood erythrocyte carbonic anhydrase I and II: an in vitro study”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27(5), 641-645, (2012).
- [13] Menteşe, A., Güven, S., Sümer, A., Turan, İ., Demir, S., Karahan, S.C., and Alver, A., “Serum anti-carbonic anhydrase I and II antibodies and polycystic ovary syndrome”, *Turk J Biochem*, 38(1), 43-48, (2013).
- [14] Vural, S., “5-Amino-1,3,4-Tiyadiazol Türevlerinin karbonik Anhidraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Kütahya, (2007).
- [15] Aggarwal, M., Boone, C.D., Kondeti, B., and McKenna, R., “ Structural annotation of human carbonic anhydrases”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28(2), 267-277, (2013).
- [16] Sahin, H., Aliyazıcıoğlu, R., Yıldız, O., Kolaylı, S., Innocenti, A., and Supuran, C.T., “Honey, polen, and propolis extracts show potent inhibitory activity against the zinc metalloenzyme carbonic anhydrase”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 26(3), 440-444, (2011).
- [17] Zengin Kurt, B., Sönmez, F., Bilen, Ç., Ergun, A., Gençer, N., Arslan, O., and Kucukislamoglu, M., “Synthesis, antioxidant and carbonic anhydrase I and II inhibitory activities of novel sulphonamide-substituted coumarylthiazole derivatives”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6), 991-998, (2016).
- [18] Vullo D., Durante M., Di Leva F.S., Cosconati S., Masini E., Scozzafava A., Novellino E., Supuran C.T., and Carta F., “Monothiocarbamates strongly inhibit carbonic anhydrases in vitro and possess intraocular pressure lowering activity in an animal model of glaucoma”, *J. Med. Chem.*, 59, 5857-5867, (2016).
- [19] Yıldırım, A., Aslan, Ş., Ocak, T., Yıldırım, S., Kara, F., ve Şahin, Y.N., “Travmalı hastalarda serum paraoksonaz/arılesteraz aktiviteleri vemaalondialdehit düzeyleri”, *The Eurasian Journal of medicine*, 39, 85-88, (2007).
- [20] Uysal, S., Akyol, S., Haşgöl, R., Armutcu, F., Yiğitoğlu, R., “Çok yönlü bir enzim: Paraoksonaz”, *Yeni Tıp Dergisi*, 28(3), 136-141, (2011).
- [21] Gençer, N., “Paraoksonaz Q ve R İzoenzimlerinin Saflaştırılması ve Bazı Çevre Kirleticilere Karşı Afinitesinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2008).
- [22] Demir, Y., Beydemir, Ş., “Purification, refolding, and characterization of recombinant human paraoxonase-1”, *Turk J Chem*, 39, 764-776, (2015).

- [23] Koncsos, P., Seres, I., Harangi, M., Pall, D., Jozsa, L., Bajnok, L., Nagy, E.V., Paragh, G., “Favorable effect of short-term lifestyle intervention on human paraoxonase-1 activity and adipokine levels in childhood obesity”, *Journal of the American College of Nutrition*, 30(5), 333-339, (2011).
- [24] Golmanesh, L., Mehrani, H., Tabei, M., “Simple procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1”, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70, 1037-1042, (2008).
- [25] Rainwater, D.L., Rutherford, S., Dyer, T.D., Rainwater, E.D., Cole, S.A., VandeBerg, J.L., Almasy, L., Blangero, J., MacCluer, J.W., and Mahaney, M.C., “Determinants of variation in human serum paraoxonase activity”, *Heredity*, 102, 147-154, (2009).
- [26] Lee, J. H., Mandava, S., Baek, S. Y., Lee, Y- M., “Identification and structural elucidation of three new tadalafil analogues found in a dietary supplement”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123, 1-9, (2016).
- [27] Jeong, J. H., Lee, J. H., Kim, H. J., Park, H. J., Hwang, I. S., Han, K. M., Yoon, C. Y, Cho, S., and Kim, W. S., “LC-ESI-MS/MS analysis of phosphodiesterase-5 inhibitors and their analogues in foods and dietary supplements in Korea”, *Food Additives & Contaminants: Part B*, 9 (1), 1-8, (2016).
- [28] Sharma, S., Kumar, K., Deshmukh, R., and Sharma, P. L., “Phosphodiesterases: Regulators of cyclic nucleotide signals and novel molecular target for movement disorders”, *European Journal of Pharmacology*, 714, 486-497, (2013).
- [29] Tatlıcıoğlu, T., “KOAH’da selektif fosfodiesteraz-4 (PDE-4) inhibitörleri”, *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 56(4), 472-484, (2008).
- [30] Sezgi, C. ve Şenyiğit, A., “Fosfodiesteraz-4 inhibitörleri KOAH’ ta ne vadediyor?”, *Güncel Göğüs Hastalıkları serisi*, 1(1), 45-50,( 2013).
- [31] Tian, Y., Cui, W., Huang, M., Robinson, H., Wan, Y., Wang, Y., and Ke, H., “Dual specificity and novel structural folding of yeast phosphodiesterase-1 for hydrolysis of second messenger cyclic adenosine and guanosine 3',5'-monophosphate”, *Biochemistry*, 53, 4938-4945,( 2014).
- [32] Chen, X., Zhao, X., Xiong, Y., Liu, J., and Zhan, C.-G., “Fundamental reaction pathway and free energy profile for hydrolysis of intracellular second messenger adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) catalyzed by phosphodiesterase-4”, *J. Phys. Chem. B*, 115, 12208-12219, (2011).
- [33] Bland, N.D., Wang, C., Tallman, C., Gustafson, A.E., Wang, Z., Ashton, T.D., Ochiana, S.O., McAllister, G., Cotter, K., Fang, A.P., Gchijian, L., Garceau, N., Ortenberg, R., Ondrechen, M.J., Campbell, R.K., and pollastri, M.P., “Pharmacological validation of *Trypanosoma brucei*

- phosphodiesterases B1 and B2 as druggable targets for african sleeping sickness”, *J. Med. Chem.*, 54, 8188-8194, (2011).
- [34] Lugnier, C., “Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for development of specific therapeutic agents”, *Pharmacology & Therapeutics*, 109, 366-398, (2006).
- [35] Beavo, J.A., “Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms”, *Physiological Reviews*, 75 (4), 725-748, (1995).
- [36] Butcher, R.W., and Sutherland, E.W., “Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials”, *J. Biol. Chem.*, 237, 1244-1250, (1962).
- [37] Erdoğan, S., “Siklik nükleotid fosfodiesteraz (PDE) enzim ailesi”, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 13(3), 431-436, (1999).
- [38] Zhai, K., Hubert, F., Nicolas, V., Ji, G., Fischmeister, R., and Leblais, V., “ $\beta$ -Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells”, *PLoS ONE*, 7(10), e47826, (2012).
- [39] Rao, Y.J., Xi, L., “Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts”, *Acta Pharmacol Sin*, 30(1), 1-24, (2009).
- [40] Başar, M. ve Bal, F., “Eretil disfonksiyonun medikal tedavisinde fosfodiesteraz tip 5 inhibitörlerinin günümüzdeki yeri”, *Türk Urol Sem*, 1, 85-91, (2010).
- [41] Maurice, D.H., Palmer, D., Tilley, D.G., Dunkerley, H.A.; Netherton, S.J., Raymond, D.R., Elbatarny, H.S., and Jimmo, S.L., “Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system”, *Mol. Pharmacol*, 64(3), 533-546, (2003).
- [42] Dousa, T.P., “Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney”, *Kidney International*, 55, 29-62, (1999).
- [43] Essayan, D.M., “Cyclic nucleotide phosphodiesterases”, *J Allergy Clin Immunol*, 108, 671-80, (2001).
- [44] Mehats, C., Andersen, C.B., Filopanti, M., Jin, S-L.C., and Conti, M., “Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling”, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 13(1), 29-35, (2002).
- [45] Card, G.L., England, B.P., Suzuki, Y., Fong, D., Powell, B., Lee, B., Luu, C., Tabrizizad, M., Gillette, S., Ibrahim, P.N., Artis, D.R., Bollag, G., Milburn, M.V., Kim, S.-H., Schlessinger, J., and Zhang, K.Y.J., “Structural basis for the activity of drugs that inhibit phosphodiesterases”, *Structure*, 12, 2233-2247, (2004).
- [46] Jeon, Y.H., Heo, Y.-S., Kim, C.M., Hyun, Y.-L., Lee, T.G., Ro, S., and Cho, J.M., “Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential



- therapeutic applications and recent progress in drug development”, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 1198-1220, (2005).
- [47] Houslay, M.D., Schafer, P., and Zhang, K.Y.J., “Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target”, *Drug Discovery Today*, 10(22), 1503-1519, (2005).
- [48] Lugnier, C. “PDE ‘Inhibitors: a new approach to treat metabolic syndrome?’”, *Current Opinion in Pharmacology*, 11:698-706, (2011).
- [49] Huai, Q., Colicelli, J., and Ke, H., “The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis”, *Biochemistry*, 42, 13220-13226, (2003).
- [50] Wang, H., Zhang, K., Zhao, L., Tang, J., Gao, L., Wei, Z., “Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury”, *Neuroscience Letters*, 566, 247-251, (2014).
- [51] Chai, Y., Li, J.-D., Yan, C., “Vinpocetine attenuates lipid accumulation and atherosclerosis formation”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434, 439-443, (2013).
- [52] Ding, J., Li, J., Mao, S., “Development and evaluation of vinpocetine inclusion complex for brain targeting”, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10, 114-120, (2015).
- [53] Medina, A., “Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions”, *Frontiers in Neuroscience*, 5 (21), doi: 10.3389/fnins.2011.00021, (2011).
- [54] Ferguson, J.A., Carson, C.C., “Phosphodiesterase type 5 inhibitors as a treatment for erectile dysfunction: Current information and new horizons”, *Arab Journal of Urology*, 11, 222-229, (2013).
- [55] Rotella, D.P., “Phosphodiesterase type 5 inhibitors: discovery and therapeutic utility”, *Drugs of the Future*, 26(2), 153-162, (2001).
- [56] Smith, W.B., McCaslin, I.R., Gokce, A., Mandava, S.H., Trost, L., Hellstrom, W.J., “PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence”, *The International Journal of Clinical Practice*, 67(8), 768-780, (2013).
- [57] Daugan, A., Grondin, P., Rualt, C., Le Monnier de Gouville, A.-C., Coste, H., Linget, J.M., Kirilovsky, J., Hyafil, F., and Labaudiniere, R., “The discovery of tadalafil: A novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2:2,3,6,7,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6] pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione analogues”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4533-4542, (2003).
- [58] Bischoff, E., “Vardenaf1 preclinical trial data: potency, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and adverse events”, *International Journal of Importance Research*, 16,34-37, (2004).
- [59] Kim, Y.H., Choi, H., Lee, J., Hwang, I.-C., Moon, S.K., Kim, S.J., Lee, H.W., Im, D.S., Lee, S.S., Ahn, S.K., Kim, S.W., Han, C.K., Yoon, J.H., Lee,

- K.J., Choi, N.S., “Quinazolines as potent and highly selective PDE5 inhibitors as potential therapeutics for male erectile dysfunction”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18, 6279-6282, (2008).
- [60] Coward, R.M., Carson, C.C., “Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction”, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(6), 1315-1329, (2008).
- [61] Gresser, U., Gleiter, C.H., “Erectile dysfunction: Comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil-review of the literature”. *European Journal of Medical Research*, 7, 435-446, (2002).
- [62] Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., “Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C”, *The Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221-4229, (1967).
- [63] Balseven, H., İşgör, M.M., Mert, S., Alım, Z., Beydemir, Ş., Ok, S., Kasımoğulları, R., “Facile synthesis and characterization of novel pyrazole-sulfonamides and their inhibition effects on human carbonic anhydrase isoenzymes”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 21-27, (2013).
- [64] Supuran, C.T., “How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 345-360, (2016).
- [65] Beyaztaş, S., “Bazı Bitki Gelişim Düzenleyici Bitkilerin, Paraoksonaz ve Karbonik Anhidraz İzoenzimler Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [66] Şahin, A., “Bazı Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2008).
- [67] Özensoy, Ö., “Kanser İlişkili CA-Karbonik Anhidraz IX ve XII İzoenzimlerinin (CA-IX, CA-XII) Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Bazı Bileşiklere Karşı İlginin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [68] Arslan, O., “Galucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [69] Bayram, T., “Köpek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [70] Türkeş, C., Söyüt, H., and Beydemir, Ş., “In vitro inhibitory effects of palonosetron hydrochloride, bevacizumab and cyclophosphamide on purified

- paraoxonase-I (hPON1) from human serum”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 252-257, (2016).
- [71] Yavuz, E., “Paraoksonaz I Enziminin Yeni Bir Hidrofobik Jel ile Saflaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2014).
- [72] Bilen, Ç., “Paraoksonaz Enziminin Glutaraldehit ile İmmobilizasyonu ve Bazı Ağır Metaller Karşı Afinityesinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2009).
- [73] Reyhan, M., “Abdominal Aort Anevrizmalı Hastalarda Serum Paraoksonaz Aktivitesinin Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2016).
- [74] Kulka, M., “A review of paraoxonase 1 properties and diagnostic applications”, *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1), 225-232, (2016).
- [75] Tomas, M., Latorre, G., Senti, M., and Marrugat, J., “The antioxidant function of high density lipoproteins: A new paradigm in atherosclerosis”, *Rev Esp Cardiol*, 57(6), 557-569, (2004).
- [76] Bozdog, M., Isik, S., Beyaztas, S., Arslan, O., and Supuran, C.T., “Synthesis of a novel affinity gel of carbonic anhydrases”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(2), 240-244, (2014).
- [77] Özensoy, Ö., “Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2002).
- [78] Mc Intosh, J.E.A., “Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and dorsolateral prostate of the rat”, *Biochem. J.*, 114, 463-476, (1969).
- [79] Bilen, Ç., Beyaztaş, S., Arslan, O., and Özensoy Güler, Ö., “Investigation of heavy metal effects on immobilized paraoxonase by glutaraldehyde”, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(3), 440-446, (2013).
- [80] Sinan, S., “İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [81] Gokce, B., Gencer, N., Arslan, O., Karatas, M.O., Alici, B., “In vitro inhibition effect of some coumarin compounds on purified human serum paraoxonase 1 (PON1)”, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(4), 534-537, (2016).

- [82] Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W., La Du, B.N., “Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities”, *Drug Metab Dispos*, 19, 100-106, (1991).
- [83] Laemelli, D.K., “Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, 227, 680-685, (1970).
- [84] Rammler, D.H., “The effect of DMSO on several enzyme systems”, *Annals New York Academy of Sciences*, 141(1), 291-299, (1967).
- [85] Granaas, M.L., “Development of an assay for determining PDE5 enzyme activity and for screening of potential inhibitors of the PDE5 enzyme in cancer cells”, Masters’ Thesis, *University of Tromso*, The Faculty of Health Sciences, The Department of Medical Biology, (2013).
- [86] Rybalkin, S.D., Yan, C., Bornfeldt, K.E. and Beavo, J.A., “Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function”, *Circ Res.*, 93, 280-291, (2003).
- [87] Kukreja, R.C., Salloum, F.N., and Das, A., “Cyclic guanosine monophosphate signaling and phosphodiesterase-5 inhibitors in cardioprotection”, *Journal of the American College of Cardiology*, 59 (22), 1921-1927, (2012).
- [88] Başar, M., Bal, F., “Erektıl disfonksiyonun medical tedavisinde fosfodiesteraz tip 5 inhibitörlerinin günümüzdeki yeri”, *Turk Urol Sem*, 1, 85-91, (2010).
- [89] Danışoğlu, M.E., “Sıçanlarda ESWL (Vucut Dışı çok Dalgası) sonrası oluşan değişikliklerin histopatolojik olarak ve HSP 70 (Heat Shock Protein) ekspresyну kullanılarak değerlendirilmesi ve fosfodiesteraz tip 5 inhibitörünün (Tadalafil) rolü”, Uzmanlık Tezi, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Üroloji Anabilim Dalı, Bursa, (2011).
- [90] Coates, S., Mastovska, K., “SMPRs approved for high-priority dietary supplements: Phosphodiesterase type 5 inhibitors”, *Inside Laboratory Management AOAC International*, 19-26, (2016).
- [91] <https://www.drugs.com/sfx/tadalafil-side-effects.html>, (2017).
- [92] <https://www.ilacrehberi.com/v/cialis-20-mg-2-film-tablet-a08f/kt/yan-etkileri/>, (2017).
- [93] <http://steroidansiklopedisi.com/2017/09/cialis-tadalafil-nedir-kimler-kullanabilir.html>, (2017).
- [94] Aronsen, L., Orvoll, E., Lysaa, R., Ravna, A.W., Sager, G., “Modulation of high affinity ATP-dependent cyclic nucleotide transporters by specific and

- non-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors”, *European Journal of Pharmacology*, 745, 249-253, (2014).
- [95] Saenz De Tejada, I., Anglin, G., Knight, J.R., and Emmick, J.T., “Effects of tadalafil on erectile dysfunction in men with diabetes”, *Diabetes Care*, 25 (12), 2159-2164, (2002).
- [96] Özmerdiven, Ç.G., “Sıçanlarda testis iskemi/reperfüzyon hasarında nitric oksit (L-Arjinin) ve fosfodiesteraz tip 5 inhibitörünün (Tadalafil) etkisi”, *Uludağ Üniversitesi, Tıp fakültesi, Üroloji Ana Bilim Dalı*, Bursa, (2015).
- [97] Özbek, K., “Deneyisel contrast ilişkili nefropatinin önlenmesinde tadalafilin etkinliği”, *Uzmanlık Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı*, Tokat, (2012).
- [98] Kacar, D., “Farklı fosfodiesteraz tip 5 enzim inhibitörlerinin izole sıçan miyometriyum kasılması üzerine etkilerinin incelenmesi”, *Uzmanlık Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı*, Konya, (2014).
- [99] Çiftçi, H., Yeni, E., “PDE5 inhibitörlerinin ED tedavisinde kronik kullanımı (Derleme)”, *Androloji Bülteni*, 15(53), 85-88, (2013).
- [100] Ozensoy, O., Arslan, O., and Ozgur Sinan, S., “A new method for purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography”, *Biochemistry (Moscow)*, 69 (2), 216-219, (2004).