

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILAN YENİ ASETAZOLAMİT VE  
SÜLFANİLAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU,  
İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİ (*IN VITRO*) VE FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Belkıs BÜYÜKKIRCALI**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2009**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi.....	4
2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı.....	5
2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Etkileri.....	8
2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları.....	9
2.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	13
2.6. Karbonik Anhidraz Enzimini İnhibe Eden İlaçların Temel Etkileri.....	14
2.7. Etki Yerleri.....	15
2.8. Farmakodinamik Özellikler.....	16
2.9. Kullanım Alanları.....	16
2.10. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Aktiviteleri ve Tedavide Kullanımı.....	17
2.11. Yeni Karbonik Anhidraz İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	19
2.12. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Tasarımı ve Uygulamaları.....	22
2.12.1. Karbonik anhidraz anyon inhibitörleri.....	22
2.12.2. Sülfonamid, Sülfamat ve Sülfamid inhibitörleri.....	25
2.13. Glokom Tedavisinde Kullanılan Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	27
2.13.1. Primer açık açılı glokom, ilaç tedavisinde kullanılan karbonik anhidraz inhibitörleri.....	27
2.13.2. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri.....	27
2.13.2.1. Asetazolamid.....	28
2.13.2.2. Metazolamid.....	29
2.13.2.3. Diklorfenamid.....	30
2.13.3. Lokal kullanımda karbonik anhidraz inhibitörleri.....	30
2.13.3.1. Dorzolamid.....	31
2.13.3.1.1. Kullanımı.....	32
2.13.3.1.2. Brinzolamid.....	33
2.14. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Yan Etkileri.....	37
2.15. Sülfonamidlerin Tarihçesi.....	37
2.16. Sülfonamidlerin Farmakokinetiği.....	39
2.16.1. Uygulama yolu.....	39
2.16.2. Emilme.....	39
2.16.3. Dağılma.....	40
2.16.4. Atılma.....	40
2.17. Fiziksel Özellikleri.....	40
2.18. Yapı-Aktivite İlişkileri.....	41
2.19. Kimyasal Özellikleri.....	42
2.20. Yan Etkileri.....	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	44
3.1. Materyal.....	44
3.1.1. Kullanılan malzemeler.....	44
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	44
3.1.3. Kullanılan kimyasallar.....	44
3.2. Yöntem.....	46
3.2.1. Sentez.....	46

3.2.1.1. 4-( 4-klorobütanoilamino) – benzen sülfonamid (1) bileşiğinin sentezi.....	46
3.2.1.2. 4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamid (2) bileşiğinin sentezi .....	47
3.2.1.3. 4- (kloroasetilamino)-benzen sülfonamid (3) bileşiğinin sentezi.....	48
3.2.1.4. 4-(3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino)benzen sülfonamid (4) bileşiğinin sentezi.....	49
3.2.1.5. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamid (5) bileşiğinin sentezi.....	50
3.2.1.6. 2-(3-kloropropanoilamino)1,3,4-tiyadiazol 5-sülfonamid (6) bileşiğinin sentezi.....	51
3.2.1.7. 4-(D-glukozamino) benzen sülfonamid (7) bileşiğinin sentezi.....	52
3.2.1.8. 4-(D-fruktozamino) benzen sülfonamid (8) bileşiğinin sentezi .....	53
3.2.1.9. 4-(kloroasetil-D-fruktozamino) benzen sülfonamid (9) bileşiğinin sentezi .....	54
3.2.1.10. 4-(kloroasetil-gliserinamino) benzen sülfonamid (10) bileşiğinin sentezi.....	55
3.2.2. Biyolojik çalışma .....	55
3.2.2.1. Sentezlenen bileşiklerin IC50 değerlerinin saptanması.....	56
3.2.2.1.1. Sentezlenen bileşiklerin IC50 değerlerinin hesaplanması.....	56
3.2.2.2. Bölme katsayısı ölçümü.....	57
3.2.2.2.1. Bölme katsayısının belirlenmesi .....	57
3.2.2.3. İnhibitörlerin sudaki çözünürlüklerinin belirlenmesi.....	58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA .....	59
4.1.Sentezlenen Bileşiklerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması .....	59
4.1.1. 4-(2-oksopirolidinil) benzen sülfonamid (2) bileşiğinin sentezi .....	59
4.1.2. 4-( 3-kloro asetil amino) – benzen sülfonamid (3) .....	60
4.1.3. 4-(3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino)benzen sülfonamid (4) .....	61
4.1.4. 4-(3-kloropropanoilamino) – benzen sülfonamid (5) .....	62
4.2. Biyolojik Çalışma ( <i>in vitro</i> ) Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	63
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR .....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	72
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT IR Spektrumları.....	73
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin 1H NMR Spektrumları.....	76
EK 3 Sentezlenen Bileşiklerin 13C NMR Spektrumları.....	78
ÖZET .....	80
SUMMARY .....	81

## ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

**GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILAN YENİ ASETAZOLAMİT VE SÜLFANİLAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU, İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİ (*IN VITRO*) ve FİZİKSEL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**Belkıs BÜYÜKKIRCALI**

**Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Hasan TÜRKMEN  
Yıl: 2009, Sayfa: 81**

Bu çalışmanın amacı, yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi ve bu bileşiklerin inhibitör aktivitelerinin *in vitro* incelenmesidir. Bu çalışmada üç yeni karbonik anhidraz inhibitörü sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin yapıları FT IR, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR yöntemleriyle aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin sudaki çözünürlüğü, bölme katsayısı incelenmiştir. Biyolojik aktiviteleri (*in vitro*) UV-VIS spektrofotometre ile ölçülmüştür. Bu bileşiklerin bir kısmının asetazolamit ve sülfanilamitten daha güçlü inhibitör oldukları tespit edilmiştir. Bileşiklerin bölme katsayısı, inhibitör aktivitesi ve sudaki çözünürlükleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerden en az birinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılabilmesini umuyoruz.

**ANAHTAR KELİMELER:** Karbonik Anhidraz İnhibitörleri, Asetazolamit, Sülfanilamit

## ABSTRACT

MSc Thesis

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF NOVEL ACETAZOLAMIDE AND SULFONAMIDE DERIVATIVES USED FOR THE TREATMENT OF GLAUCOMA AND INVESTIGATION OF *IN VITRO* INHIBITORY ACTIVITIES AND PHYSICAL PROPERTIES

Belkıs BÜYÜKKIRCALI

Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan TÜRKMEN  
Year: 2009, Page:81

The objective of this study was synthesis and investigation of biological activities of novel carbonic anhydrase inhibitors. Three novel carbonic anhydrase inhibitors were synthesised in this study. Synthesised compounds were identified by FT-IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR. The compounds made were evaluated for water solubility and ether partition coefficient. Inhibitor Activities of the compounds (*in vitro*) were measured by UV-VIS spectrophotometer. Some of the synthesised compounds were found to be more potent inhibitor than acetazolamide and sulfanilamide. Correlation between water solubility, ether partition coefficient and inhibitory activity have also been investigated. We hope that at least one of the synthesised compounds will be used as carbonic anhydrase inhibitor.

**KEY WORDS:** Carbonic Anhydrase Inhibitors, Acetazolamide, Sulfanilamide

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamda katkılarını esirgemeyen ve bilgilerinden yararlandığım sayın Doç. Dr Hasan TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen hocalarıma ve özellikle Araş. Gör. Mustafa DURGUN'a ve Ramazan TATSIZ'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmam boyunca bana yardımcı olan değerli dostlarım Arş. Gör. Ayşegül KUTLUAY BAYTAK'a, İnci GÜLER'e ve değerli iş arkadaşım Hasan TUNÇ'a sonsuz teşekkür ederim.

Ve bugüne kadar hep yanımda olan değerli aileme çok teşekkür ederim.

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 2.1. Karbonik anhidraz izoenzimleri, katalitik aktivitesi(sülfonamid benzerliği) ve hücre içi yerleşimleri .....	18
Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin inhibitör aktiviteleri, bölme katsayıları ve sudaki çözünürlükleri .....	66

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1.1. Sülfanilamid .....	1
Şekil 1.2. Asetazolamid .....	2
Şekil 1.3. Metazolamid .....	2
Şekil 1.4. Dikloramid .....	2
Şekil 1.5. Dorzolamid .....	3
Şekil 2.1. Karbonik anhidraz KA(II) enziminin polipeptit yapısı .....	6
Şekil 2.2. HCA-II izo enziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi.....	7
Şekil 2.3. Bikarbonatın Reabsorpsiyonu'nun gösterimi .....	8
Şekil 2.4. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması .....	10
Şekil 2.5. 4-(3,4- diklorfenilüreidoetil)-benzensülfonamid .....	20
Şekil 2.6. Topiramid bileşiğinin yapısı .....	26
Şekil 2.7. İndisulam bileşiğinin yapısı.....	26
Şekil 2.8. Asetazolamid bileşiğinin yapısı .....	28
Şekil 2.9. Metazolamid bileşiğinin yapısı .....	29
Şekil 2.10. Diklorfenamid bileşiğinin yapısı .....	30
Şekil 2.11. Dorzolamid bileşiğinin yapısı .....	31
Şekil 2.12. Brinzolamid bileşiğinin yapısı .....	33
Şekil 2.13 Çinko, Bakır ve Alüminyum Sülfonamid komplekslerinin yapıları .....	36
Şekil 2.16. Sülfanilamid bileşiğinin yapısı .....	39
Şekil 2.17. Hipoglisemiyan bileşiğinin yapısı .....	41
Şekil 2.18. Sülfanilamid bileşiklerindeki aktivasyon durumları .....	41
Şekil 3.1. 4- (4-klorobütanoilamino)-benzen sülfonamid (1) bileşiğinin sentezi .....	46
Şekil 3.2. 4-(2-oksopirrolidinil) benzensülfonamid (2) bileşiğinin sentezi .....	47
Şekil 3.3. 4- (kloroasetilamino)-benzen sülfonamid (3) bileşiğinin sentezi .....	48
Şekil 3.4. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamid (4) bileşiğinin sentezi.....	49
Şekil 3.5. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamid (5) bileşiğinin sentezi .....	50
Şekil 3.6. 2-(3-kloropropanoilamino) 1,3,4-tiyadiazol 5-sülfonamid (6) bileşiğinin sentezi.....	51
Şekil 3.7. 4-(D-glukozamino) benzen sülfonamid (7) bileşiğinin sentezi .....	52
Şekil 3.8. 4-(D-fruktozamino) benzen sülfonamid (8) bileşiğinin sentezi .....	53
Şekil 3.9. 4-(2-d-fruktoziletanoilamino) benzensülfonamid (19) bileşiğinin sentezi.....	54
Şekil 3.10. 4-(2-gliseriletanoilamino) benzensülfonamid (10) bileşiğinin sentezi.....	55
Şekil 4.1. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak blank ve sülfanilamidin absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.2. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 2 nolu bileşiğin absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.3. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 3 nolu bileşiğin absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.4. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 4 nolu bileşiğin absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.5. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 5 nolu bileşiğin absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması.....	65



Ek Şekil 1.1. 4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamit (2) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spekturumu.....	73
Ek Şekil 1.2. 4-(kloroasetilamino) benzen sülfonamit (3) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spekturumu .....	73
Ek Şekil 1.3. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spekturumu .....	74
Ek Şekil 1.4. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (5) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spekturumu .....	75
Ek Şekil 2.1. 4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamit (2) bileşiğinin $CDCl_3$ içerisinde alınan $^1H$ NMR spekturumu .....	76
Ek Şekil 2.2. 4-(kloroasetilamino) benzen sülfonamit (3) bileşiğinin $CDCl_3$ içerisinde alınan $^1H$ NMR spekturumu .....	76
Ek Şekil 2.3. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşiğinin DMSO içerisinde $^1H$ NMR spekturumu .....	77
Ek Şekil 2.4. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (5) bileşiğinin DMSO içerisinde $^1H$ NMR spekturumu.....	77
Ek Şekil 3.1. 4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamit (2) bileşiğinin DMSO içerisinde alınan $^{13}C$ NMR spekturumu .....	78
Ek Şekil 3.2. 4-(kloroasetilamino) benzen sülfonamit (3) bileşiğinin bileşiğinin DMSO içerisinde alınan $^{13}C$ NMR spekturumu .....	78
Ek Şekil 3.3. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşiğinin $CDCl_3$ içerisinde $^{13}C$ NMR spekturumu.....	79
Ek Şekil 3.4. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (5) bileşiğinin $CDCl_3$ içerisinde $^{13}C$ NMR spekturumu.....	79

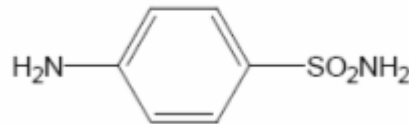
## SİMGELER DİZİNİ

DCM	Diklormetan
DMSO	Dimethyle sulfoxide
GİB	Göz İçi Basıncı
HCl	Hidroklorik asit
CA	Karbonik anhidraz
h CA	Human Karbonik anhidraz
IC <sub>50</sub>	Enzimin %50'sini İnhibe Eden İnhibitörün Molar Konsantrasyonu
IR	Infrared Spektroskopisi
KA	Karbonik Anhidraz
KAE	Karbonik Anhidraz Enzimi
KAİ	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
K <sub>i</sub>	İnhibisyon Katsayısı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PAAG	Primer Açık Açılı Glokom
THF	Tetrahidrofuran
TLC	Thin Layer Chromatography
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan

## 1.GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. Karbonik anhidraz, CO<sub>2</sub>'in, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ve H<sup>+</sup> iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidrasyonu katalizleyen bir enzimdir. İnsan gözünde CA-I, CA-II, ve CA-IV izoenzimleri bulunur. Karbonik anhidraz inhibitörleri, göz içi sıvısının salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncını düşürdükleri için, glokom hastalığı tedavisinde kullanılırlar (Soylu, 2001).

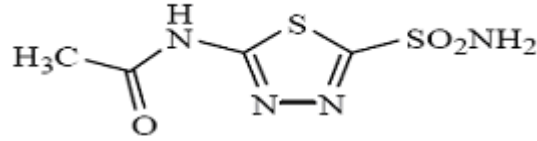
Glokom, göz içi basıncının yükselmesiyle görme sinirinin giderek zayıflamasına ve böylece görme kaybına yol açan ciddi bir hastalıktır (Soylu 2001). Göz hastalıkları içerisinde körlüğe en fazla glokom neden olur (%15-20). Amerika Birleşik Devletlerinde yaklaşık 2.2 milyon kişi 40 ve ileri yaşlarda glokumludur ve bunların 120 000 kadarı kördür (American Health Assistance Foundation, 2005). Glokom halk sağlığı için önemli bir sorun olup tedavi yöntemlerinin bir an önce bulunması gereken bir hastalıktır. Baylara nazaran bayanlarda daha sık görülmektedir. Bulunan ve uygulanan tedavi yöntemleri daha çok erken teşhise yöneliktir. Diğer durumlarda kullanılan ilaçlar ise çoğunlukla topikal (damla) olmadığından ve yan etkisi fazla olduğundan sadece acil durumlarda kullanılmaktadır. 1940 yılında Mann ve Keilin glokom tedavisi için karbonik anhidraz inhibitörü olan ilk Sülfanilamid (Şekil1.1) bileşiğini sentezlediler (Friedenwald, 1994).



Şekil 1.1. Sülfanilamid

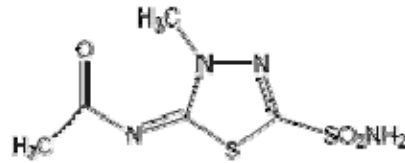
(1)

1944 yılında Friedenwald glokom tedavisi için gözdeki basıncın düşülmesi gerektiğini ifade etti (T.Mann, D.Keilin,Nature,1940,146,164). Başlangıçta diüretik olarak kullanılan KAl'nin GİB'ni da azalttığı ilk kez 1954 yılında Becker tarafından bildirilmiştir (M. Bruce Shields, Text book of Glaucoma,2nd ed, 416). Yine aynı yıl glokom tedavisi için karbonik anhidraz inhibitörü olan Asetazolamit (şekil 1.2) sentezlenmiş olup ve halen glokom tedavisi için tablet olarak kullanılmaktadır.

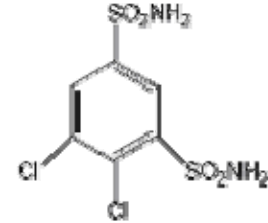


Şekil 1.2. Asetazolamit (2)

Asetazolamit dışındaki diğer karbonik anhidraz inhibitörleri metazolamit ve diklorfenamittir. Metazolamit asetazolamitin türevidir ve yalnızca glokom tedavisinde kullanılır (Cedric ve Reynard,1992).

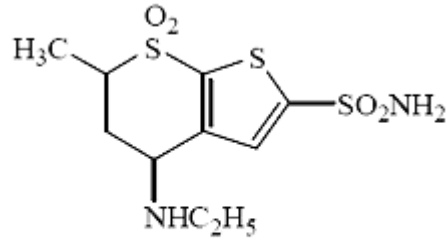


Şekil 1.3. Metazolamit (3)



Şekil 1.4. Diklorfenamit (4)

Topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinin kullanımı yüksek emilime sahip yeni iki sülfonamid türünün keşfini bekledi. Bunlardan birincisi ; heteroaromatik sülfonamidlerden oluşan MK-927 , MK-417 ve MK-507 ( Dorzolamit(5)) (şekil 1.5) ikinci türü de Brinzolamit temsil ediyordu (Michaud ve ark., 2001).



Şekil 1.5. Dorzolamid

(5)

Bu çalışmamızın amacı şu anda glokom tedavisinde kullanılan karbonik anhidraz inhibitörlerinden değişik ve daha kullanışlı maddeler sentezlemektir.

Sentezlenecek bileşiklerden beklenen özellikler şunlardır:

1. Enzimlere karşı yüksek aktivitede (enzimin % 99'unu inhibe etmesi) olmalı.
2. Su veya arasındaki çözünürlüğü dengede olmalı.
3. Sudaki çözünürlüğü en az % 3 w/v seviyesinde olmalı.
4. Yağ içindeki çözünürlüğünün istenilen seviyede olmalı.
5. Yan etkilerinin olmaması; en azından minimum seviyede olmalı.
6. Göze uyumlu yani tolere edilebilmeli.
7. Topikal (damla) olmalı.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

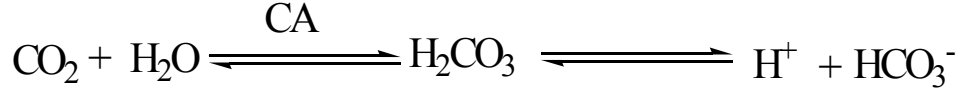
Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak %100'e yakın bir ürün sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve özel grubunu teşkil ederler. Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda 1 mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biri de karbonik anhidrazdır.

Enzimlerin, bazı bileşikler tarafından hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak aktivitelerinin azaltılması ve hatta yok edilmesi olayına inhibisyon adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir, inhibitörler, genellikle küçük; molekül ağırlığına sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzim aktivitesinin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturur. Bir çok ilaç ve zehirli bileşik, fonksiyonlarını bu yolla gerçekleştirirler. Enzim etki mekanizmalarının incelenmesinde de inhibisyon olayından faydalanılır (Keha ve Küfrevioğlu, 2000).

Karbonik anhidraz enzimi, vücutta yaygın olarak bulunan CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu ve dehidrasyonunu sağlayan reaksiyonu katalizleyen bir enzimdir.

Bu enzim etkin şekilde proksimal tubuluslarda ayrıca gözde, midede, eritrositlerde ve beyinde bulunur. Böbreklerdeki fonksiyonu H<sup>+</sup> iyonunun tubuluslardan atılmasını, kısaca idrarın asitleşmesini ve bikarbonatların tubuluslara geri emilimini sağlar, asit baz dengesini düzenler (Prof. İsmet Dökmeci, 1998).

Ayrıca bu enzim kan asitliğinin düzenlenmesinde yer alan bir enzimdir (biyolojik katalizör). Nefes alma hızı, kan asitliğinden etkilenen fizyolojik fonksiyonların arasındadır. Karbonik anhidrazın katalizlediği ve karbondioksitin karbonik aside (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dönüştüğü bir denge tepkimesidir (Maren, 1967).



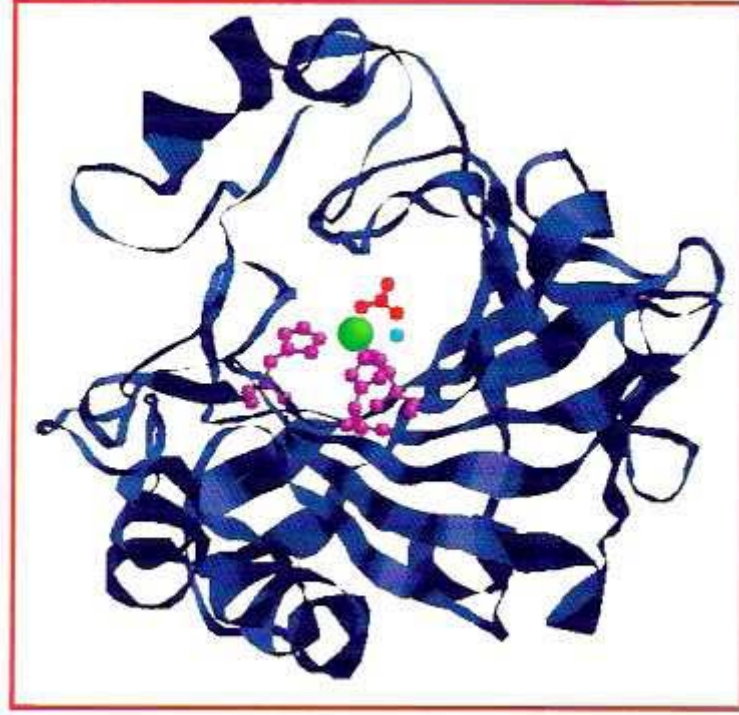
Bu enzim ilk olarak Meldrum ve Roughton tarafından 1933 yılında eritrositlerde keşfedilmiştir. Aktivitesi sonradan renal korteks, gastrik mukoza, pankreas, göz merkezi, sinir sistemini içine alan birçok yerde saptanmıştır. Ayrıca bu enzim başka eritrositler, mide, göz ve beyinde bulunur (Dökmeci,1985). Şu an tanımlanan 14 karbonik anhidraz enzimi (KAE) bulunmaktadır (Dodgson ve ark., 1991; Badger ve Price, 1992; Badger ve Price, 1994; Supuran ve Scozzafava, 2001).

Karbonik anhidraz ilk keşfedilen  $\text{Zn}^{2+}$  iyonlu bir metaloenzimdir. ilk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz, genel olarak metabolik  $\text{CO}_2$  geçişini sağlamanın yanı sıra, birçok dokunun  $\text{H}^+$  ve  $\text{HCO}_3^-$ 'in birikiminde de rol almaktadır. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böbrek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır. KA sözü geçen canlı hücrelerinde çoğu kez sitoplazmada çözülmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak yer almaktadır (Polya ve Wirtz, 1965; Maren, 1967; Carter, 1972; Pocker ve Joan, 1974; Pocker ve Sarkanen, 1978).

## 2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı

Karbonik anhidraz, 260 alt birimden (aminoasitler) oluşan doğal hali özel bir kürecik seklinde kıvrılmış bir protein zinciridir. Yapısında, aktif taraf denilen, reaktantların orada ürünlere dönüştüğü bir yarık veya cep bulunmaktadır. Karbonik anhidrazın protein zinciri şekil 2.1.'de mavi bir şerit olarak gösterilmiştir. Karbonik anhidrazın aktif tarafında bir su molekülü proton kaybederek hidroksit ( $\text{OH}^-$ ) iyonunu oluşturur. Bu proton, karbonik anhidrazın baz olarak davranan bir kısmı tarafından koparılır. Normalde su molekülünün

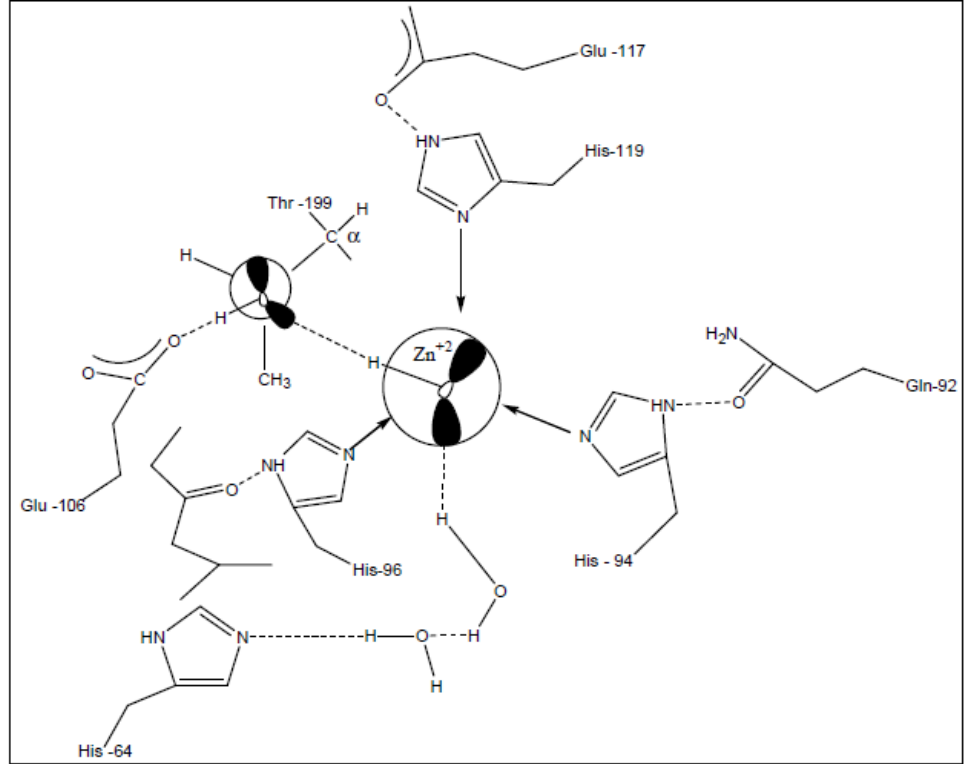
protonu çok asidik değildir. Ancak karbonik anhidrazın aktif tarafında bulunan bir çinko katyonu ve bir su molekülünün oksijen atomu arasındaki Lewis asit-baz etkileşmesi suyun oksijeni üzerinde pozitif yük oluşmasına yol açar. Bu durum su molekülünün protonlarını daha asidik yapar.



Şekil 2.1. Karbonik anhidraz KA(II) enziminin polipeptit yapısı

Su molekülünün protonlarından birinin uzaklaştırılması hidroksiti oluşturur ki bu da aktif taraftaki karbon dioksit ile  $\text{HCO}_3^-$  (hidrojen karbonat veya bikarbonat) oluşturmak üzere tepkimeye girer. Karbonik anhidrazın burada gösterilen yapısında (X-ışını kristalografisi verilerine göre) aktif taraftaki bikarbonat iyonu kırmızı ile aktif taraftaki çinko katyonu yeşil ile su molekülü ise mavi ile gösterilmiştir. Çinko katyonu ile koordine olan (Lewis bazları olarak) veya hidroksit oluşturmak üzere sudan proton koparan (Bronsted-Lowry bazları olarak) bazik taraflar morumsu kırmızıdır (bu bazlar, histidin imidazol halkalarındaki azot atomlarıdır). Bu türlerin hiç birinde hidrojen atomu gösterilmemiştir (Solomons ve Fryhle, 2002).





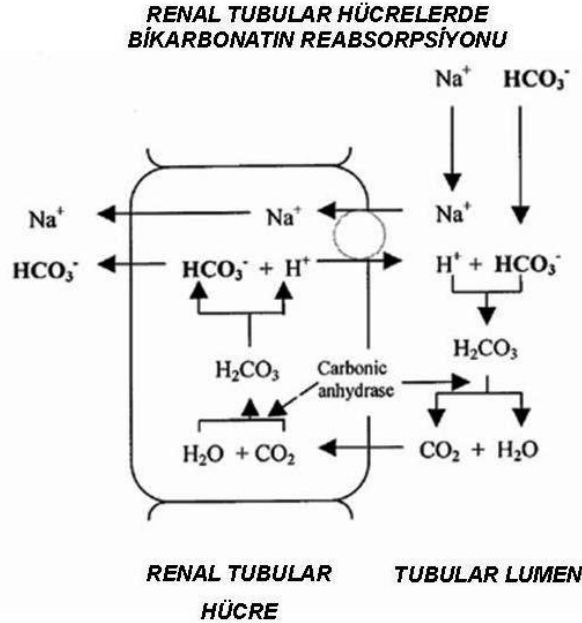
Şekil 2.2. HCA-II izo enziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi

Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyğun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi  $H_2O$  veya  $OH^-$  ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomuyla koordine edilmiştir. Ligantlar protein formundaki bir indirekt ligandın hidrojen bağı ile diğer gruplara bağlanmasıyla (Şekil 2.2.) oluşurlar (Lesburg ve Christianson, 1995).

Bu enzim karbondioksitle sudan proton ve bikarbonat iyonlarını hızlı bir şekilde üretir ve kullanımını sağlar. Karbonik anhidraz vücudumuzun farklı bölümlerinde sıvı dengesinde ve pH kontrolünde anahtar rolü oynar. Mide içinde asit salgılanma görevi yaparken aynı enzim pankreas öz suyunu alkali yapmaya yardım eder ve tükürük salgısını nötrleştirir, böbrek ve gözlerimizde proton ve bikarbonat iyonlarının geçişini sağlar, bu yerlerde hücrelerin sıvı hacmine etki eder (Goodsell ve Dutta, 2004).

### 2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Etkileri

Karbonik anhidraz reaksiyonu sonucu başta proksimal tubulumkiler olmak üzere tubul hücrelerinde  $H_2O$  ve  $CO_2$ 'den  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  oluşur.  $H^+$  tubul lümenine salgılanır. Bunun karşılığında  $Na^+$  iyonu lumenden hücreler alır. ( $H^+$ - $Na^+$  değiş tokuşu)  $HCO_3^-$  ise hücreden perütügüler kapiler içinden geçen kana aktarılır (Şekil 2.3.). Bu duruma göre tübül hücrelerinden  $H^+$  salgılanması, plazmaya ekivalent miktarda  $HCO_3^-$ , hücreden peritübülerkapiler içinden geçen kana aktarılır. Bu duruma göre tübül hücrelerinden  $H^+$  salgılanması plazmaya ekivalent miktarda  $HCO_3^-$  eklenmesi demektir. Ayrıca salgılanan  $H^+$ 'nin bir kısmı, plomerüllerden filtre olmuş sıvıdaki  $HCO_3^-$  'nin atılmasını önler. Bikarbonatın elektriksel gücü nedeniyle reabsorpsiyonu güç olduğu halde, onun,  $H^+$  ile birleşmesi sonucu dönüştüğü hipofilik  $CO_2$  molekülü şeklinde reabsorpsiyonu çok kolaydır. Lumene salgılanan  $H^+$  nin kalan kısmı lamende  $NH_3$  veya  $HPO_4^{2-}$  ve diğer zayıf asitler tarafından bağlanır. Böylece tubulus lümeninde birinci olay sonucu amonyum ( $NH_4^+$ ) ve ikinci olay sonucu titre – edilebilir asite ( $H_3PO_4$ ) ve benzeri protonlanmış zayıf asitler gibi oluşturulur. Bu sayede idrarda net  $H^+$  kaybı sağlanır (Kayaalp, 2001).



Şekil 2.3. Bikarbonatın Reabsorpsiyonu'nun gösterimi

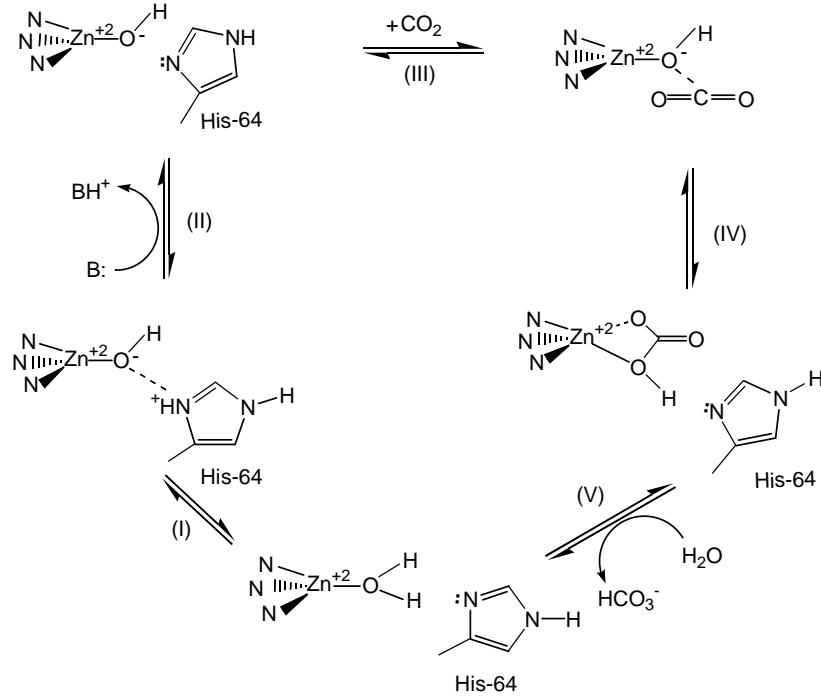
#### 2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkarılmıştır. HCA-I izoenzimi, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir enzimdir ve insan kanından saflaştırılmıştır. Eritrositlerde HCA-I izoenzimi yanında, HCA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan  $\text{CO}_2$ 'i  $\text{HCO}_3^-$ 'e ,akciğer pulmoner kapilerde ise  $\text{HCO}_3^-$ 'i  $\text{CO}_2$ 'e dönüştürmesi reaksiyonun katalizleyerek solunum olayında yer almaktadır.

Göz lensi, kornea ve silyer epiteryumda ise, HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan HCA-II izoenziminin önemi, glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. Glokom hastalığı, anormal derecede yüksek göz içi basıncından ileri gelmekte (*intraocular pressure*, IOP) ve dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (hümör aköz). Hümör aközün salgılanmasında, karbonik anhidraz enziminin uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile, silyer epitelinin salgı aktivitesi %25-30 oranında azalmaktadır ( Renzi, Scazzafava ve Supuran, 2000).

Karbonik anhidrazın aktivitesi; enzimin  $\text{CO}_2$ 'i hidrasyonu bikarbonatın dehidrasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir. Hidrataz aktivitesi,  $\text{CO}_2$ 'in hidrasyon süresinin ölçülmesiyle bulunur.

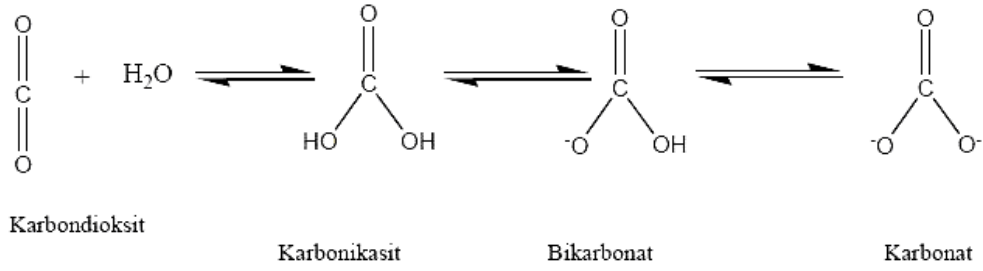
Şekil 2.4.'te İlk basamakta His-64 Zn'ye su molekülü üzerinden bağlanmaktadır. Zn'ye bağlı su molekülünde bulunan bir proton His-64 proteinine geçer (I). İkinci aşamada, ortamdaki kuvvetli baz His-64'de bulunan protonu koparmaktadır (II). Oluşan  $\text{Zn}(\text{OH}^-)$  (hidroksit ligandı)  $\text{CO}_2$ 'e çok hızlı etki eder ve geçiş halini oluşturur (III). Bu geçiş halinden sonra ürün kompleksi oluşur (IV). Son olarak ürün kompleksinde bulunan  $\text{HCO}_3^-$  su ile çok hızlı bir şekilde yer değiştirir (V). Bu olay metabolizmada döngüsel bir şekilde devam etmektedir (Briganti ve ark., 1997).



Şekil 2.4. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. KA, metabolizmadaki son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilebilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir (Pocker ve Janjic, 1989).

Karbonik anhidraz, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> veya ortamın pH'sına göre HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> veya CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO<sub>2</sub>'nin farklı açılara sahip piramidal yapıda H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'e kendiliğinden dönüşümü çok yavaştır.



KA, bu çok yavaş gerçekleşen dönüşüm reaksiyonlarını *in vivo* ve *in vitro* şartlarda son derece hızlı bir şekilde katalizlemektedir.

Karbonik anhidraz izoenzimleri (KA-I, KA-II, KA-III vb.) vücudun farklı bölgelerinde spesifik fonksiyonları yerine getirir.

KA-I ve KA-II kırmızı kan hücrelerinde (eritrositlerde) bulunur. Enzim sayesinde CO<sub>2</sub> kandaki su ile hızla reaksiyona girerek dokulardan akciğere bikarbonat iyonu halinde taşınır (Maren, 1967).

KA-II ve KA-IV gözlerde bulunur. Gözde processus siliarede lokalize olmuştur. Enzim aköz humör salgılanmasında önemli olan sodyum iyonuna optimum aktif transportu için uygun bir pH ortamı sağlar (Maren, 1967; Dökmeci, 1992).

KA-IV ayrıca hücre zarında vücutta sıvı üreten salgılayıcı dokularda bulunur, KA'nın önemli bir fonksiyonel formu olduğu düşünülmektedir (Maren ve ark., 1983).

Böbrek ve akciğerlerde de bulunduğu saptanmıştır (Supuran ve ark., 2003). Ayrıca ıspanak bitkisinin kloroplastlarında bulunmaktadır (Rowlet ve ark., 1994).

KA-III kırmızı iskelet kası ve yağ dokularında bulunur. Laktikasit laktat dengesinde çok önemli bir role sahiptir (Gros ve Dodgson, 1988; Lynch ve ark., 1993).

KA-V karaciğer mitokondrilerinde ve böbreklerde bulunur. Bikarbonat üretiminde metabolik bir fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir. Ayrıca glukogenezisde biotin içeren enzim pruvat karboksilat için ve ürogenizde karbamoil fosfat sentezi için bir substrattır (Dodgson ve ark., 1991). KA-V önemli karbonik anhidraz izoenzimlerinden ve onun katalitik mekanizması henüz tamamen anlaşılamamıştır.

KA-VI ve KA-VII tükürük bezinde bulunur ve tükürüğü nötralleştirdiği yani pH dengesinde rol oynadığı düşünülür ayrıca KA-VII beyin ve akciğerde bulunmaktadır.

KA-IX ve KA-XII kanser hücrelerinde baskındır ve normal emsallerinde bulunmaz (Posterak ve ark., 1994). Ayrıca KA-IX mide mukozası ve beyin tümörlerinde bulunmaktadır (Supuran ve ark., 2003).

Hücre zarlarında bulunan diğer izoenzimler (KA-XII ve KA-XIV) henüz fonksiyonları iyice anlaşılamamıştır (Supuran ve ark., 2003).

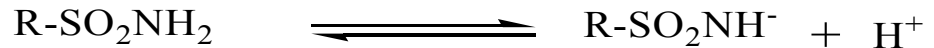
Ayrıca bitkilerde fotosentez süreçlerinde CO<sub>2</sub> atmosferden kullanır. CO<sub>2</sub> gazı bikarbonat iyonu olarak depolanır, hem kara hem de su bitkilerinde karbonik anhidraz bikarbonat iyonlarının CO<sub>2</sub>'e geri dönüşümünde rol oynar. Bu enzimin oynadığı diğer ilginç biyolojik olgu mercanların kireçlenmesidir. Deniz suyu kalsiyum tepkimeleriyle mercan poliplerinden karbonik anhidraz tarafından bikarbonat üretilir. Bu mercanların dışında sert bir tortu birikmesine neden olur (Goodsell ve Dutta, 2004).

### 2.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz enzimi; bir çok nefron bölgesinde (stoplazma, lüminal ve basolateral membran) ve peritübüler kapillerinin kırmızı hücrelerinde bulunur. En çok bulunduğu bölge proksimal tubulustur (Şimşek, 1992).

Karbonik anhidraz inhibitörleri, zayıf natriüretik ve diüretik etki gösterirler. Diüretik olarak tek başlarına nadiren kullanılırlar; bazı durumlarda diğer bir diüretikle kombine olarak kullanılabilirler. Daha az toksit ve daha etkin olan ayrıca tolerans gelişmesi sorunu olmayan daha yeni diüretiklerin çıkması ile terapötik önlemlerini yitirmişlerdir. Ancak ilk modern diüretik ilaç grubu olmaları ve böbrek fizyolojisi ile farmakolojisinin anlaşılmasındaki önemleri nedeniyle tarihsel ve kavramsal yönden değerlidirler. Bu grup ilaçların bulunuşu, en basit yapılı bir antibakteriyel bir grup olan sülfonamid türü olan sülfanilamidin, metabolik asidoz ve idrarda kalevileşme yaptığının fark edilmesi sonucu olmuştur. Bugün kullanılan antibakteriyel sülfonamidler, serbest sülfonamid ( $\text{SO}_2\text{-NH}_2$ ) grubu içermediklerinden karbonik anhidrazı inhibe etmezler.

Karbonik anhidrazın çoğu spesifik ve güçlü inhibitörleri, aromatik ve bazı heterosiklik sülfonamidlerdir. Bu bileşikler, sadece süstitüe olmamış bir  $\text{-SO}_2\text{NH}_2$ ; grubu bulundurmakla kalmaz, aynı zamanda bir  $\text{-SO}_2\text{NH(OH)}$  grubu da bulunduran etkili inhibitörlerdir. Bunlar sülfonamid grubunun azot atomuyla.  $\text{R-SO}_2\text{NH}^-$  veya  $\text{R-SO}_2\text{N-OH}^-$  anyonlarında olduğu gibi metal iyonlarına bağlanırlar. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi,



denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmalarındır. Bu özelliği, karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Safra

asitlerinin sülfonamid türevleri olan CA inhibitörleri enzim üzerinde yarışmasız bir inhibisyon gösterdiklerinden enzimin aktif bölgesine bağlanmazlar ve enzimin turnover sayısını yani katalitik aktivitesini düşürerek inhibisyon gösterirler. Bundan dolayı inhibitörler metal komplekslerinin 10-100 kat arasında enzim inhibisyonunu arttırır (Supuran, 1992).

Gözde aköz hümörün oluşumu karbonik anhidraz tarafından sağlanır. Enzimin inhibisyonu aköz hümör salgılanmasının azalmasına neden olur. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin göz içi ve kafa içi basıncını azalttıkları gözlenmiştir. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin pozitif yan etkileri vardır. Oküler ve serebral kan damarlarında vazodilatasyon yaparlar. Bu nöroloji ve beyin cerrahisinde, damarların mümkün olduğunca genişletilerek perfuzyonun arttırılma yüzdesinin, yedek kapasitesinin ölçümünde kullanılmıştır. Glokom tedavisinde de karbonik anhidraz inhibitörleri avantajlı olabilirler (Flammer, 2003).

### 2.6. Karbonik Anhidraz Enzimini İnhibe Eden İlaçların Temel Etkileri

Karbonik anhidraz enziminin ilaçlar tarafından inhibisyonu sonucu, tübül hücrelerinde  $H^+$  üretiminin azalması aşağıdaki etkileri doğurur.

- Sodyum reabsorpsiyonunun sonucu  $H^+$  ile değiş-tokuş suretiyle olan bölümü azalır, buna bağlı olarak su reabsorpsiyonu da azalır.
- Distal tübüllerde değiş-tokuş için gerekli  $H^+$ 'in azalması buradan  $K^+$  salgılanmasında artmaya neden olur. Bunun sonucu idrarla potasyum kaybı artar ve hipokalemi gelişebilir.
- Filtratta  $HCO_3^-$ 'ün  $CO_2$ 'ye dönüşümü ve dolayısıyla reabsorpsiyonu azalır. Bunun sonucu vücuttan  $HCO_3^-$  kaybı artar, hiper kloremik asidoz gelişir ve idrarın kalemliği artar.



- Amonyanın amonyum haline dönüşümü azalacağından filtrattan amonyanın geri alınması artar ve sonuçta amonyak retansiyonu gelişir.
- Oral karbonik anhidraz inhibitörleri sliyer epitelyumden arka kamaraya bikarbonat sekresyonunu engelleyerek göz içi basıncını azaltırlar (Kayaalp, 1978).

### **2.7. Etki Yerleri**

Karbonik anhidrazın başlıca 2 izoenzimi vardır. Bunlardan izoenzim I mide paryetal hücrelerinde ve izoenzim II böbrek tubulus hücrelerinde, gözde bulunur.

Bu enzimlerin aktivitesi karbonik anhidraz inhibitörleri ile baskılanır. Bu enzim böbrek korteksinde proksimal ve distal tübül hücrelerinin ayrıca toplayıcı tübül hücrelerinin lumene bakan kısımlarında konsantre olmuştur. Ayrıca eritrositlerde, mide mukozasında ve beyinde bulunur. Karbonik anhidraz çok önemli bir enzimdir, çünkü böbreğin alkalileri tasarruf etmesini, asit-baz dengesini korumasını sağlar. Gözde aköz hümörün oluşumu karbonik anhidraz enzimi tarafından sağlanır. Enzimin inhibisyonu aköz hümör salgılanmasının azalmasına neden olur. Midede parietal salgı hücrelerinde H<sup>+</sup> meydana gelir (Kayaalp, 2001).

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin göz içi ve kafa içi basıncı azalttıkları gözlenmiştir. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin pozitif yan etkileri vardır. Oküler ve serebral kan damarlarında vazodilatasyon yaparlar. Bu nöroloji ve beyin cerrahisinde, damarların mümkün olduğunca genişletilerek perfüzyonun artırılma yüzdesinin, yedek kapasitesinin ölçümünde kullanılmıştır. Glokom tedavisinde de karbonik anhidraz inhibitörleri avantajlı olabilirler. Ayrıca bazı organlarda sıvı transportunu beta-bloker kullanımında kontrendikedir (Flammer, 2003).

## 2.8. Farmakodinamik Özellikler

Karbonik anhidraz inhibitörleri Na-HCO<sub>3</sub> diürezisine ve total vücut HCO<sub>3</sub> nün azalmasına neden olurlar. Karbonik anhidraz aktivitesinin inhibisyonu proksimal tubulustan bikarbonat emilimini deprese eder. Bikarbonat hücrelerde ve lümende toplanır. Asetazolamit proksimal tubulustan bikarbonat emilimini inhibe eder. Fakat tubulusun başka bir bölgesinden karbonik anhidraz enziminden , bağımsız olarak yine bikarbonat emilir. Yani asetazolamit proksimal tubulustan emilen bikarbonat %85'ini, tüm böbrekten emilen bikarbonatın ise %45'inin emilimini önler. Vücut bikarbonat deposunda azalma hiperkloremik metabolik asidoza yol açar, tekrarlanan ilaç dozları diüretik etkisi giderek azalır. Proksimal bikarbonat reaksiyonunun inhibisyonunda ilginç olan etki,buna paralel proksimal tubulusta Cl<sup>-</sup> emilimide inhibe olmaktadır (Şimşek, 1992).

Sonuçta karbonik anhidraz inhibisyonunda proksimal tubulusta NaHCO<sub>3</sub> ve NaCl reabsorbe olmaz. Tubulusun distaline doğru (çıkan kolun kalın kısmına) gelen NaCl yükü artar, natri üresis bikarbonat atılımı ile birlikte (Clorid ile değil) olur.

## 2.9. Kullanım Alanları

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin kullanım alanları su şekilde sıralanabilir:

- Glokom: Karbonik anhidraz inhibisyonu aköz humörün formasyonunun azaltır ve göz içi basıncını düşürür. Glokomun kronik tedavisinde kullanılır.
- İdrarın alkalileştirilmesi amacıyla kullanılır. Bu da asit ilaçlarla gelişen zehirlenmelerin tedavisinde işe yarayabilir.
- Epilepsi tedavisinde yardımcı ilaç olarak kullanılır.
- Kronik metabolik alkalozda bikarbonat tüketimini sağlayarak asit-baz dengesini sağlarlar.

- Akut dağ hastalığı: Belirli bir yükseklikte ortaya çıkan uykusuzluk, baş ağrısı, bulantı, halsizlik, solunum bozuklukları gibi bulgulara karşı profilaktik olarak kullanılır.
- Hiperkalemik periodik paralizde üriner yolla PO<sub>4</sub> atılımını sağlarlar.
- Sirozda kullanılmamalıdır (kontrendikasyon) (Dökmeci, 1992).

### **2.10. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri, Aktiviteleri ve Kullanım Alanları**

Memelilerde 16 farklı  $\alpha$  karbonik anhidraz izoformları belirlendi. CO<sub>2</sub> 'in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 'a çevrilebilmesi için 13 katalitik aktiviteye sahiptir.

Bunların bazıları cytosolic (CAI-II-III-VII-XIII) diğerleri membrana bağlıdır. (CA IV-IX-XII-XIV-XV) CA VA- CA VB mitokondrialdır ve CA VI süt ve tükürükte gizlenir.  $\beta$ - $\alpha$ -CA ailesinin temsilcileri yüksek miktarda maya, bitki, bakteri ve mantarda bulunur.

Enzimleri elektrolitlerin salınımında asit ve baz dengesine, iyon transferine, biyosenetik reaksiyonda tümör başlangıcında çok önemli fizyolojiksel ve patolojiksel olaylarda rol oynayan bir katalizördür.

İnsanlardaki CA aktivitelerin çoğu ilaç tasarımı için amaçlıdır. CA inhibitörleri sülfonamid, sülfomat ve sülfamid türevleri, antiglok, anti epilepsi, antiobezite ve antitümör temsilcileri olarak aplikasyon gösterirler. Onlar farklı oluşumlar içeren farklı izoformları amaçlarlar ( CA II ve CA XII antiglok temsilcisi, CA VII ve CA II anti epilepsi, CA VA ve CA VB antiobezite hareketi için CA IX ve CA XII antitümör etkisi için). Hastalıklı organizmalarda, çeşitli CA' ların varlığına son zamanlarda ilaç olarak tasarımının araştırılmasına başlandı (Plasmodium Falciparum, Helico bakter Pylari, Mycobacterium Tuberculosis, Candida albicans, cryptococcus neoformans vb olarak).

Yoğun çalışmalarla aktivitelerinin sınıflandırılmasıyla memelilerdeki CA 'nın aktivasyonu, depresyon, alzheimer hastalığı tedavisi için yeni yaklaşımları da temsil eden faydalı synaptiğin çoğalması için yararlı farmakolojik türevlerinin tasarımı en sonunda belirlenebildi. Bu konuda önemli süreçler çeşitli izoenzimlerin araştırılması inhibitörlerin ve aktivitelerinin sınıflandırılması ile başarıldı. Aynı zamanda farmakolojik uygulamalarla farklı CA izoformlarının inhibitör/aktivitelerinin X-Ray kristal yapılarının çözümleri anlaşıldı.

Karbonik anhidraz, metal enzimleri ile ökaryot ve prokaryotta varlığının sürdürür (CA IV belirgin şekli ile kodlanır.). İlgisiz gelişimli gen ailesi,  $\alpha$ -CA (yeşil bitkilerin stoplazmasında bakteri, bakteri algeasında vardır),  $\beta$ -CA (genel olarak bakteri, algea, kloroplast),  $\gamma$ -CA ( genel olarak Archaea ve bazı bakterilerde),  $\delta$ -CA (bazı deniz diatomlarında mevcut).

Çizelge 2.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri, Katalitik Aktivitesi(sülfonamid benzerliği) ve Hücre içi yerleşimleri

İzoenzim	Katalitik Aktivitesi (Hidrataz)	Hücre İçi Yerleşimleri
KA-I	Düşük	Sitozol
KA-II	Yüksek	Sitozol
KA-III	Çok düşük	Sitozol
KA-IV	Yüksek	Plazma membranı
KA-V	Orta dereceli*/yüksek	Mitokondri
KA-VI	Orta dereceli*	Tükürük içinde
KA-VII	Yüksek	Sitozol
KARP-VIII	Yok	Sitozol
KA-IX	Yüksek	Plazma membranı
KA-X	Yok	Sitozol
KARP-XI	Yok	Sitozol
KA-XII	Düşük	Plazma membranı
KA-XIII	Düşük	Sitozol
KA-XIV	Yüksek	Plazma membranı

\*pH 7.4'de orta dereceli, pH 8.2'de yüksek

Memelilerde 16 farklı  $\alpha$ -CA izoenzimleri yada proteinlerle ilişkili CA tanımlanır (Çizelge 2.1). Birkaç Cytosolic şekilleri (CA I-III-VII), beş membrana

bağlı izoenzimler (CA IV-IX-XII-XIV-XV), iki mitokondrial şekilleri (CA VA ve CA VB) ve gizli bir CA izoenzim şekli olarak (CA VI) tükürükte ve sütte vardır (Scozavafa, 2006).

Enzimlerin katalizi karbondioksitin bikarbonat iyonuna çevrimi çok basit bir reaksiyondur. Ayrıca bu enzimler bir çok fizyolojiksel ve patolojiksel süreçleri içeren  $CO_2/HCO_3^-$ 'a değişimi ve solunuma bağlı olan çok önemli fizyolojik oluşumlarda rol oynar.

Birçok CA'lar gerçekten organizmanın çeşitli çevresel şartlarında adaptasyonu yaşamını sürdürmesinde önemli bir yere sahiptir. 2004 yılında başlanan araştırmalarda, CA hakkında memelilerde patolojik ve fizyolojik ilgileri incelenmeye başlanılmıştır. CA katalitik ve inhibitör mekanizmaları hakkında görüş ve araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda, ilaç olarak kullanılması hedeflenen insanlardaki izoformları ile birlikte (tıpkı CA VA-VB VII- IX- XII- XIII) özel enzimlerin aktivasyon ve inhibisyon çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca çoğu patolojik uygun organizmalarda CA'nın karakterizasyon araştırması yapılmaktadır (mantar, bakteri, protista).

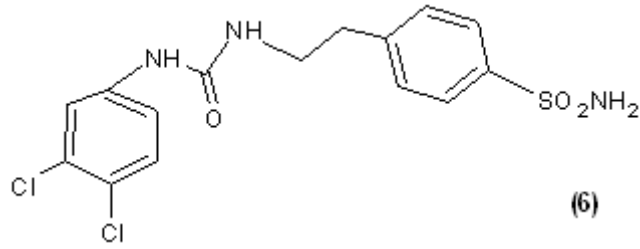
### **2.11. Yeni Karbonik Anhidraz İzolasyonu ve Karakterizasyonu**

2005 yılında çoğu memelilerde (insanları içeren) 15 CA izoformları tanımlandı. Bunlar  $\alpha$ - sınıfına ait CA izoformlarıdır. Bununla birlikte 16. izoenzimin var olduğu Parkilla'nın grubu tarafından desteklenmektedir.(CA XV) (Bu izoenzim 16. izoenzim olmasına rağmen, CA XV olarak numaralandırılır. Çünkü iki tane CA V izoenzimi vardır. Bunlar CA VA ve VB'dir.

Seri analizlerde bu enzimin sekiz tür CA XV genomik seri kodlamasına sahip olduğu tanımlandı. Bununla birlikte bir seri dataların sonucunda CA XV insanlarda ve şempanzelerde sahte bir gen olduğu görüldü. Ters transkrip PCR, insanlarda CA XV' i göstermediğini onayladı.

Buna karşın PSR' da, CA XV, böbrekte, beyin ve testiste az da olsa olumlu gösterim sergiledi. Farelerde yapılan analizlerde CA XV şekillendirildi. Buna göre CA XV, CA IV ile ilişkilidir. CA XV birkaç özelliği ile CA IV' e benzerdir. CA XV' in katalitik aktivitesi düşüktür.

**Plasmodium Falciparum**, son zamanlarda karakterize edilen insan salyasının en belirgin olan  $\alpha$ -CA katalitik özellikleri ortaya çıkmaktadır. Bir seri aromatik sülfonamidler (çoğu sülfanilamid/ homosülfanilamid/ 4- aminoetil benzensülfonamid, sülfonamidler gibi aromatik aldehytler den elde edilen shiff bazlar) sıtmalı parazit enziminin (pfCA) inhibitörü in vitro olarak araştırıldı. Böylece bu araştırmalarda pfCA için birkaç inhibitör mikromolar oranda benzerlikleri bulundu (pfCA  $K_i = 0,08- 1,230\mu\text{M}$  ). Buna karşın, sülfonamid CA inhibitörü asetazolamid kliniksel çalışmalarda kullanıldı (asetazolamid ve 4-(3,4-diklorofenilüredoetil)-benzensülfonamid) (şekil 2.5). Bu inhibitör pfCA'ya karşı 80 nM bağlı bir inhibisyon etkisi gösteren ve asetazolamidle kıyasla 4 kez daha etkili bir inhibitör olarak kliniksel çalışmalarda kullanıldı ( $K_i = 315$  nM). Ayrıca lipofilik 4-(3,4- diklorofenilüredoetil)-benzensülfonamid in vitro olarak P.Falciparum'un artışı için etkili bir inhibitördür. Buna karşın araştırmalar, asetazolamidin aynı inhibisyon seviyesini başardığını gözledi.



Şekil 2.5. 4-(3,4- diklorofenilüredoetil)-benzensülfonamid

Bu çalışmalar parazitin yaşam süreci, yeni bir mekanizmayla kritik bir enzim inhibisyonu tarafından sağlanabilir. Bu deneme çalışmalarına göre, sülfonamid CA inhibitörleri yeni bir anti-sıtma ilaçlarının gelişimi için yeni bir oluşum olabilir.

**Helicobacter pylori**, 1980'li yıllarda bulundu. Bu bakteri kronik gastrit, peptik ülser ve son zamanlarda gastrit kanserlerinde görünmektedir. İkinci en genel özelliği, insanlarda tümör olarak görünmektedir. H.pylori insan popülasyonunda bulaşıcı ve

bazende ölüme neden olan bir patojendir. Bu patojen ağrıda, yüksek asidik şartlarda (pH 1,4 'e kadar düşük) gelişme yönünden bakteriler arasında en yeteneklisidir. Bunun yanında H.pylori bakterisinin sitoplazmasında bir  $\beta$ -CA bulundu. Ürea'da ve bikarbonat metabolizmasında önemli rol oynar (patojenin asite dayanıklılığıyla).

hpCA'nın inhibitörleri sülfonamid/sülfomatlar araştırıldı. Buna karşın farklı bağlamalarla 4- tert-bütil-fenilkarboksamido/sülfonamido bağlı benzen sülfonamid/1,3,4 tiyadiazol-2 sülfonamid gibi yeni türevleri bulundu. hpCA inhibisyon aktivitelerinin tüm tipleri ortaya çıkarıldı. Dorzolamid ve basit 4-süstitüentli benzen sülfonamidler zayıf inhibitörlerdir. Sülfanilamid ve bazı türevleri daha iyi aktivite gösterdi ( $K_i = 423-640nM$ ). Buna karşın, kliniksel olarak inhibitör incelemeleri yapıldı ve bunlar orta kuvvette aktiviteli inhibitörler olarak hareketlendikleri ortaya çıktı (metazolamid, etokzolamid, diklorfenamid, brinzolamid, topiramet,.....)( $K_i = 105-378nM$ ).

Bazı güçlü hpCA inhibitörleri asetazolamid, 4-amino- 6-kloro-1,3-benzensülfonamid ve lipofilik kısımlarına birleşen yeni dizayn edilen tip 2 bileşikleri arasında oldukça fazla ortaya çıkarıldı. Yeni hazırlanmış bazı türevleri 1,2- 3,48 oranında hCA II' den üstün hpCA inhibitörleri seçici oralarda üstünlüğe sahipti. Ayrıca hpCA' lar bakteriyel enzimi inhibe için seçici özelliklerde gösterirler.

**Mycobacteria Tuberculos Rv 3888c geni**, aktivitesinin pH' a bağımlılığı ile pH'ı 8.4' de olan bir  $\beta$ -CA keşfedildi. pH 7.5'te bu oluşum gerçekleşmedi. Bu proteinin yapısı, Jone's grubu tarafından çözüldü.

Farklı kristal şekildeki CA' nın tiosiyanat yapısı, farklı tetramer yapılarını gösteren protein şekilleri, geniş yapısal değişiklikler gösteren ve faydalı bir karboksilat shift bölümü içeren gruplar çözüldü. Bu  $\beta$ -CA ile birkaç inhibisyon çalışmaları olmasına rağmen, yeni bir sınıf antitüberkülos ilaçların tamamen güçlü inhibitörlerin ortaya çıkabilirliği mümkün oldu.

Ayrıca araştırmalar sonucunda, *Saccharomyces cerevisiae* mayasının NCE 103 geni bir CA' da kodlandı (Scozavafa, 2006).

## **2.12. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Tasarımı ve Uygulamaları**

### **2.12.1. Karbonik Anhidraz anyon inhibitörleri**

Tüm metal enzimler gibi, CA' larda kompleks anyonlar tarafından inhibe edilirler (Tıpkı siyanit, siyanat, halojenler... gibi). Fakat aynı zamanda çözeltide metal iyonlarını (tıpkı perklorat, tetraflor borat, ...) bağlamak için düşük kapasiteli iyonlarda CA inhibitör aktivitesini gösterirler (Enzim aktif bölgesinden Zn(II) iyonuna kordine olan ). İnhibitörlerle CA' ların çeşitli etkileşimler fizyolojik açıdan kesinlikle önemlidir.

Çoğu CA' lar çeşitli anyon değişimciler enzim ile birlikte sodyum bikarbonat transferleri (NBCs) fonksiyonel ve fiziksel olarak etkileşimi gerçekleştirir. Gerçekten pH ve bikarbonat seviyelerinin kontrol takibi ile, hücreler proteinler plazma membranlarının içine hızlıca ve seçici olarak daha çok bikarbonat transferini gerçekleştirdiği gözlenmektedir (Scozavafa, 2006).

Fiziksel etkileşimler, CA II ve eritrosit membran (  $Cl^-/HCO_3^-$  ) anyon değişimcisi (AE I) arasında tanımlanır. AE I bikarbonatı hücre içine dışına taşıyarak hızlandırdığı, CA II' nin varlığının AE I' e bağlı olduğu Casey' in grubu tarafından bulundu. CA II' nin AE I' e bağlanmış hali AE I transfer bölgesinde bikarbonat konsantrasyonunu artırır. Bikarbonat AE I ile hücre içine transfer edildiği için, CAII' nin stoplazma yüzeyindeki varlığı bikarbonatın tüketimini hızlandırır. Bu da bikarbonatın membranlara transferi ile konsantrasyonunun düşüşü, AE I proteini ile gerçekleştiğini tanımlar. Bu CA II, bikarbonatla inhibisyona daha yüksek dayanıklılıkta olduğu anlamına gelir. Fonksiyonel ve fiziksel etkileşimler CA II ve  $Na/HCO_3^-$  transferci izoformlar NBC1 ve NBC3 arasında gerçekleşir. (28-30) Tüm



araştırılmış bikarbonat transfer proteini stoplazmik C sınırlarında CA II bağlanma bölgesine sahiptir. (DRA,  $Cl^-/HCO_3^-$  hariç) Gerçekten CA II DRA' ya bağlanmaz. CA IV bir GPI bağlantısı vasıtası ile hücrenin ekstra hücreli yüzeyine tutturulur.

AE1 ve NBC1' in ekstra hücreli tanımlanmış olan aynı gruplar (proteinler (SLC26A6) arasında fiziksel kompleks formunda CA IV ile etkileşen) stoplazmik enzim CA II' ye bağlanmış olduğu bulundu. CA II bağlanma bölgesi (CAB) büyük ölçüde SLC26A6 aktivitesini azaltır.

Geçen iki yıl içerisinde birkaç yeni enzim ve çok sayıda anyonlarla etkileşimleri araştırılmaktadır (örneğin; CA IV – VA – VII – IX – XII ). En iyi belirlenmiş inhibitörler, mCA13 inhibitörleri (siyanat, tiyosiyanat, siyanit ve sülfonamid'tir) (0,25– 0,74  $\mu$ M oranında  $K_i$  değerlidir). Buna karşın florür, iyodür, karbonat ve hidrojen sülfid daha az etkilidir ( $K_i = 3,0 - 5,5$  mM). En az etkili inhibitörler ise sülfat, klorür ve bikarbonattır( $K_i = 138 - 267$  mM).

HCAIV (insan membranlarında bağlı olan karbonik anhidraz izosyme) anyon inhibitörleriyle h CAIV'ün etkileşimi araştırıldı (bu enzimle katalizlenmiş  $CO_2$  hidrasyon reaksiyonu için araştırıldı). Halojenler güçlü h CAIV inhibitörleri olarak davrandığı görüldü. Halojenler arasında en iyi h CAIV inhibitörü florürdür. Fakat yinede izozimlere göre halojenler zayıf inhibitörlerdir (tıpkı h CAI-II-V gibi). Siyanat, siyanit, hidrojen sülfid daha zayıf h CAIV inhibitörleridir ( $K_i= 0,6- 3,9$ mM). Buna karşın tiyosiyanat, nitrat, nitrit daha zayıf inhibitör özellik gösterirler( $K_i= 30,8- 65,1$ mM). Sülfat izoenzim olmasına rağmen iyi bir hCAIV inhibitörüdür. Sülfamid, sülfamik asit, fenil boronik asit ve fenil arsonik asit ( $K_i$  değerleri 0,87-0,93 arasında olan) mükemmel hCAIV inhibitör özellikleri gösterdi.

5 farklı hCA izoenzimleri bulunur hCAI-II, hCAVA- hCAIV'tür. İnhibitörlerin geometrik şekiller (tetrahedral yada trigonal) enzim aktif bölgesinin Zn (II) iyonuna bağlanmasını etkilemez. Fakat merkez elementin yapısı etki gücünün en önemli faktörüdür. hCAI ve hCAII klorat, perklorat, silikat ve sülfamid, sülfamat sülfat'la ilişkili yapıllı anyonlarla diğerleri tarafından en iyi inhibitör etkili izoenzimlerdir.

Bununla birlikte sülfat tek başına zayıf bir inhibitördür. Molibdat zayıf bir hCAI inhibitörüdür. Fakat hCAII ile daha iyi etkileşim sağlamaktadır. hCAIV sülfat, sülfamat ve sülfamid tarafından iyi inhibe edilmektedir. Fakat perkloratla bu etki görülmemektedir. Bununla birlikte, bu beş izoenzimin detaylı inhibisyon çalışmaları , inorganik fosfat, karbamoyl fosfat, antiviral fosfonat foscarnet'lı yapıları üzerinden araştırılmıştır.

h CAI izoenzimi nötral fosfat ile zayıf inhibe edilir, buna karşın karbamoyl fosfat ile güçlüdür. hCAII ise tüm araştırılmış anyonlarla zayıf inhibe edilir. hCAIV membrana bağlı olan inhibe etmeye en duyarlı izoenzimdir (fosfat/fosfonatlarla). Bununla birlikte hCAIX izoenzimi tüm anyonlarla zayıf inhibe edilir.

Alifatik (asetat), di karboksilik (oksalat, malonat), hidroksi/keto asit(L-laktat, L-malat, piruvat), trikarboksilik yada aromatikler içeren (benzoat, tetrafloro benzoat) karboksilatlarla aynı bu beş izoenzimler üzerinde detaylı inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. hCAI asetat, oksalat, piruvat, L-laktat ve sitrat'la güçlü aktive edilir. Buna karşın malonat, malat ve benzoat ile daha zayıf aktifleştiricidir.

h CAII tüm araştırılmış anyonlarla zayıf inhibe edilir. h CAIV karboksilatlarla inhibe etmeye en duyarlıdır. hCAVA (mitokondrial izozyme) tüm karboksilatlarla zayıf inhibe edilir. h CAIX'da aynı şekilde tüm anyonlarla zayıf inhibe edilir (asetat, laktat ve benzoat hariç).

Aynı izoformlar üzerinde kompleks anyonlu inhibitörün florür, klorür, siyanid, bunun yanı sıra B(III), Si(IV), P(V), As(V), Al(III), Fe(II), Fe(III), Pd(II), Pt(II), Pt(IV), Cu(I), Ag(I), Au(I) ve Nb(V) türleri araştırılmıştır. Komplekslerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörü merkez metal iyonunun / elementinin nötrlüğü ve yüküdür. Bunun yanında geometrik şeklinin daha az önemli olduğu görünmektedir.

### 2.12.2. Sülfonamid, Sülfamat ve Sülfamid inhibitörleri

Çoğu CAI'ler çinko bağlı gruplara ya da bu gruba bioizosterik kısımlar (tıpkı sülfamat yada sülfamid gibi) sülfonamide sahiptir. Şimdiye kadar izoformlar üzerinde spesifik olarak bazı fizyolojiksel ilgileri üzerine araştırmalar yapılmıştır.

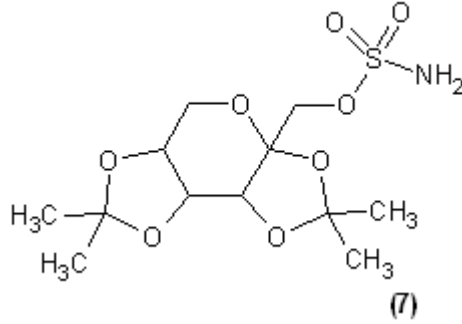
1990'larda antiglokom sülfonamidler topikal etkilerinin gelişimi CAIV izoformu inhibisyonu üzerine yapılan çalışmalar yayımlandı (inek enzimi (b CAIV) kullanıldı). bCAIV sülfonamidli inhibisyona iyi bir duyarlılığa sahiptir. İnsan vücudundaki h CAIV ile ineklerdeki b CAIV üzerinde çalışmalar yapılarak kıyaslama yapıldı. b CAIV türevlerinin çoğuyla güçlü olarak inhibe edilmektedir. hCAIV ise ondan başka daha farklı inhibisyon türevlerine sahiptir.

Birkaç bileşik (tıpkı asetazolamid, etokzolamid ve bromosülfanilamid gibi) güçlü hCAIV inhibitörleridir. Buna karşın bazı halojenli sülfanilamidler orta düzeyde güçlü inhibitör etkisine sahiptir. Bununla birlikte bunların çoğu zayıf etkili hCAIV inhibitörleridir (metazolamid, dorzolamid, topiramid, diklorfenamid).

Mitokondrial hCAVB Nishimori tarafından araştırıldı ve saflaştırıldı. Sülfonamid/sülfamat gruplu h CAVB inhibisyonu araştırıldı. Bileşimlerin bazıları kliniksel kullanıldı. Benzen sülfonamidler etkisiz inhibitörlerdir, buna karşın 4-amino, 4-hidrazino, 4-metil, 4-karboksi kısımlar ya da halojenli sülfanilamidleri taşıyan türevleri daha etkilidir. h CAVB ilaç amaçlıdır. Bazı inhibitörleri anti obezite tedavilerinin gelişiminde etkili olabilir.

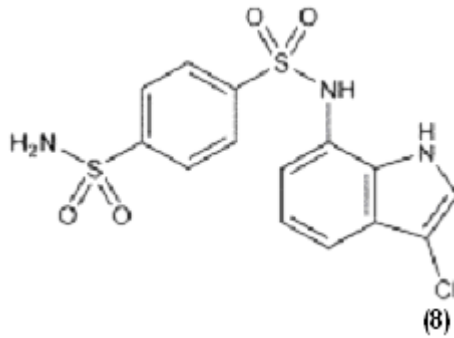
Yeni klonlanmış insan h CAVII inhibitöre aromatik ve heterosiklik sülfonamidliler araştırılmaktadır (asetazolamid, metazolamid, etokzolamid, diklorfenamid, dorzolamid, brinzolamid, benzolamid). Bunun gibi bazı kliniksel türevler kullanılarak araştırmalar yapılmaktadır. Bunun yanı sıra anti epilepsi sülfamat ilacı topiramid (Şekil 2.6.) araştırılmaktadır. h CAVII yüksek katalitik aktivite gösterdi. CO<sub>2</sub> hidrasyon reaksiyonu için 32 tür sülfonamid/sülfamat'lı h CAVII arasında çok ilginç inhibisyon profili gözlemlendi. h CAVII tüm araştırılmış

bileşimleri yüksek benzerlik gösterdi. Heterosiklik ya da bi siklik aromatik sülfonamidler mükemmel hCAIIV inhibitör özellikleri gösterdi. Buna karşın monosüstitüe ve disüstitüe benzen sülfonamidler daha az aktiftir. Bununla birlikte insan isozyeme hCAXII inhibisyonu aynı tür sülfonamidlerle araştırıldı. Etokzolamid ve birkaç halojenli sülfanilamidler güçlü inhibisyon etkisi gösterdi.



Şekil 2.6. Topiramate bileşiğinin yapısı

Anti glokom sülfonamidler kliniksel olarak kullanıldı, ölçülü bir inhibitör olan diklorfenamid hariç hariç bunun yanı sıra topiramit, indisulam (Şekil 2.7.), çok etkili hCAXII olarak davrandı. hCAXII hedefi anti glokom sülfonamidlerdir ve etkili hCAXII inhibitörleri hyroxic tümörlerin yönetimi için geliştirilebilir. Gerçekten büyük ölçüde hyroxic tümöründe hCA IX'a benzer, izoform hCAXII sık sık fazla denenmektedir (Scozavafa, 2006).



Şekil 2.7. Indisulam bileşiğinin yapısı.

### 2.13. Glokom Tedavisinde Kullanılan Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri sistemik (asetazolamid, diklorfenamid, metazolamid) veya lokal (dorzolamid, brinzolamid) kullanıldıklarında karbonik anhidrazı inhibe ederek aköz yapımını azaltarak göz içi basıncını düşürürler.

#### 2.13.1. Primer açık açılı glokom, ilaç tedavisinde karbonik anhidraz inhibitörleri

Bu grupta sistemik olarak kullanılan Asetazolamid vardır. Primer açık açılı glokom tedavisinde günümüzde eski popülaritesini kaybetmiştir. Bu ilaçlar sülfonamid grubu ilaçlardır. Sodyum tutar, potasyum atar, bu durumda korpus siliarede asit ortam oluşur, humör aköz yapımı asit ortamda azalır. 250 mg lık tabletleri vardır. Parmak uçlarında uyuşukluk, halsizlik, iştahsızlık, empotans, bulantı, kusma gibi sistemik yan etkileri vardır. Yanında bir K<sup>+</sup> preparatı ve potasyumdan zengin gıdalar vermek bu etkileri azaltır. Ameliyat önerilen hastalar, bir müddet için ameliyatı ertelemek istiyorlarsa bu ilaçlardan yararlanabilirler, uzun süre kullanılmamalıdır. Günlük doz 1 gramı geçmemelidir. Asidoz yaptığı için diabetiklerde, serum amonyak düzeyini arttırdığı için karaciğer hastalarında, üremi ve böbrek taşına yol açtığı için böbrek hastalarında kullanılmaz. KOAH'da karbondioksit birikimini arttırdığından çok risklidir, kullanılmaz (Kutay).

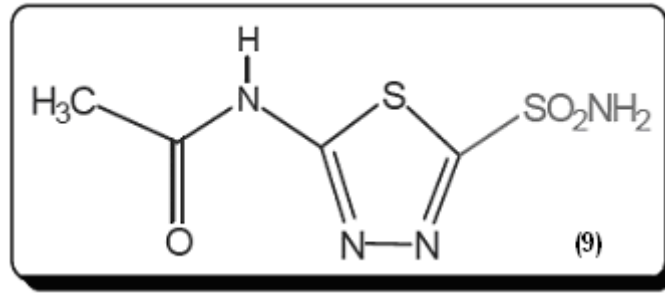
#### 2.13.2. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri arka kamaradaki bikarbonat akımını ve dolayısıyla aköz sentezini azaltarak göz içi basıncını etkiler.

- Asetazolamid
- Metazolamid
- Diklorfenamid

Bu ilaçlar hümör aköz yapımını azaltarak göz içi basıncını azaltırlar. Kullanımlarını kısıtlayan durum, yüksek oranda sistemik yan etkilere sahip olmalarıdır.

### 2.13.2.1. Asetazolamit



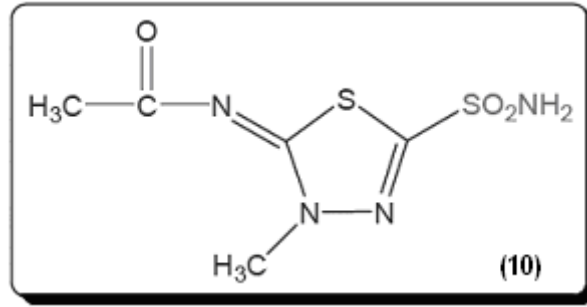
Şekil 2.8. Asetazolamit bileşiğinin yapısı

Asetazolamit (9) Becker tarafından yaklaşık 50 yıl önce glokom tedavisine sunuldu. Asetazolamit aköz hümörün üretimini yaklaşık olarak % 27 azaltır (Clark ve arkadaşları,1992). Antimikrobiyal etkinliği olmayan sentetik sülfonamid türevidir. Mide ve bağırsak kanalında kolaylıkla absorbe edilirler. Salgılama suretiyle proksimal tübüllerden itrah edilerek elimine edilir. Tübül hücrelerini humene bakan yüzlerinden etkiler, bu nedenle lumene salgılanması etkinliği yönünden önemlidir. İdrar içinde itrah edilen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve bikarbonat miktarını arttırır ve klorür miktarını azaltır. Asetazolamid genellikle tablet formunda kullanılır. Maksimum etkinlik için günlük dozu 1000 mg'dır. Her biri 250 mg olan tabletlerinden günde dört doz, veya her biri 500 mg olan iki yavaş salınımlı kapsül (tablet bağırsakta içeriğini yavaş yavaş bırakır) olarak alınabilir. Yavaş salınan kapsüllerin etkisi daha uzun sürer. Tüm karbonik anhidraz inhibitörleri gibi asetazolamid göz içi basıncını aköz sıvı yapımını azaltarak gösterir. Tüm glokom tiplerinde kullanımı vardır. Majör dezavantajı yan etkileridir: bunlar rahatsızlık verici ve çok sayıdadır, ancak

genellikle ilaç tedavisi kesildikten sonra geri döner ve az zararlıdır. Yan etkileri parestezi (kol ve bacaklarda iğnelenme gibi rahatsızlık), işitme güçlükleri, tinnitus (kulaklarda çınlama), iştah ve libido kaybı, acı tat alma (özellikle karbonlu içecekler sonrası), bulantı, vs.dir. İlaç hastanın kan potasyum düzeyini düşürür, ve potasyumdan zengin diyeti, bazen de potasyum hap kullanımını gerektirir. Korkutucu ve ağırlı bir komplikasyonu ürolityazistir (böbrek taşı). Bunun oluşumunu engellemek için hasta içebildiği kadar su içmelidir.

Acil durumlarda, mesela GİB'nın çok fazla yükseldiği durumlarda bu ilaç intravenöz verilebilir. Duruma göre günde 500 veya 1000 mg dozunda verilebilir. İlaç GİB'nı oldukça iyi düşürdüğü ve tüm glokom tiplerinde kullanılabilirdiği için, glokom tedavisinde halen en önemli acil ilaçtır. Çocuklara da verilebilir, ancak dozunun ayarlanması gerekir.

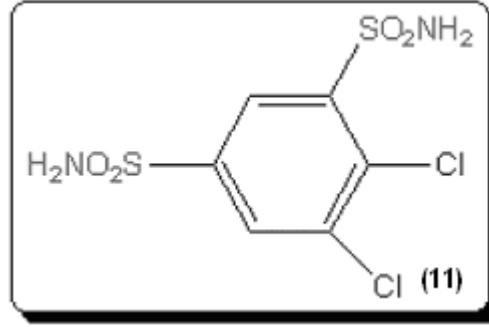
### 2.13.2.2. Metazolamid



Şekil 2.9. Metazolamid bileşiğinin yapısı

Bu ilaç daha az yan etkisi olan karbonik anhidraz inhibitörleri bulma çabaları sonucu geliştirilmiştir. Metazolamid (10), basınç düşürücü etkisi ile asetazolamid ile karşılaştırılabilir ve 50 ile 100 mg arası dozlarda günde iki veya üç defa kullanılır. Metazolamid asetazolamide kıyasla yağda daha çok çözünür ve pazarlama proteinlerine daha az oranda (%55) bağlanır. Oküler dokulara daha iyi difüzyonu vardır. Ağır yorgunluk, ve bazı olgularda depresyona yol açar.

### 2.13.2.3. Diklorfenamit



Şekil 2.10. Diklorfenamit bileşiğinin yapısı

Günde bir ile üç defa diklorfenamid (11) 50 mg dozda kullanılabilir. Potasyumun daha belirgin kaybı ile sonuçlanır, ve genellikle asetazolamidden daha fazla yan etkiye sahiptir. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörlerinin önemli yan etkileri sebebi ile bu sınıf ilaçların topikal formlarını geliştirmek gerekmiştir. Sistemik yan etkileri azalırken lokal reaksiyonlarda artış görülmüştür (Flammer, 2003).

### 2.13.3. Lokal kullanımda karbonik anhidraz inhibitörleri

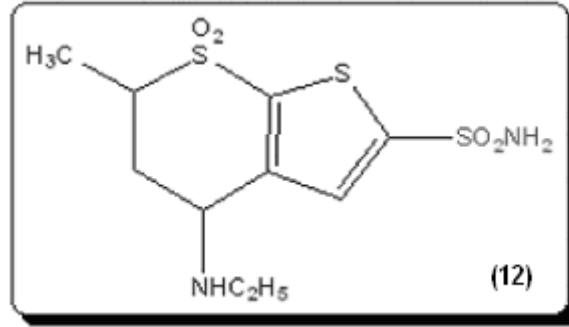
Karbonik anhidraz enzimi inhibitörlerinin lokal kullanımı 1989 yılında ortaya atılmıştır ve iyi tolere edildiği, GİB düşürmede etkili olduğu görülmüştür. 1954 yılından beri sistemik yolla kullanılan asetazolamid (9), metazolamid (10), etokzolamid ve diklorfenamid (11) lokal bir etkiye sahip değildir.

Lokal etkili karbonik anhidraz inhibitörlerinde göz önüne alınması gereken bazı güçlükler olmaktadır. Bunlar zayıf oküler penetrasyon, solüsyon içerisinde zayıf solubilité, oküler irritasyon ve hiperemidir. Günümüzde dünya piyasasına sunulan dorzolamide (MK 507) PAAG da lokal olarak kullanılmaya başlanmıştır. % 0.5-1-2 dozlarda 8 saat etkilidir. Fazla bir yan etkisi görülmemektedir, iyi tolere edilmektedir. Bir diğer lokal kullanılan karbonik anhidraz inhibitörü Brinzolamid olup, 10mg/ml süspansiyon halinde %1'lik göz damlasıdır. Ph 7.5 olduğundan dorzolamidde olduğu gibi oküler irritasyon ve



konjonktiva hiperemisi görülmemektedir. Gözde yanma, batma hissi olmaz. Sabah akşam damlatmak göz içi basıncını düşürmekte etkilidir. Gerekirse günde üç defa da kullanılabilir. Dorzolamid damlatıldığı zaman ağızda acı metalik bir tad bırakır, fakat bu durum brinzolamid ile görülmez (Kutay).

### 2.13.3.1. Dorzolamid



Şekil 2.11. Dorzolamid bileşiğinin yapısı

Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri gibi CAII' yi bloke ederek hümor aköz prodüksiyonunu azaltır. Deneysel çalışmalara %2'lik konsantrasyonda maximum göz içi basıncını düşürücü etkinin geliştiğini göstermiştir. Dorzolamid (12) tedavide 2 şekilde uygulanabiliyor.

Strahlman ve arkadaşları Ağustos 1995'te yayınladıkları çalışmalarda dorzolamidi timolol ve betaxolol ile etki ve güvenilirlik açısından karşılaştırmışlardır.

Dorzolamidin sistemik karbonik anhidraz inhibitörlerinde rastlanan majör sistemik yan etkileri doğurması, iyi tolere edilmesi, pupil çapım etkilememesi, asit baz ve elektrolit bozukluklarına neden olmaması, kan basıncı ve kardiyak nabızda değişiklik yaratmaması önemli olumlu özellikleridir. Diğer olumlu özelliği, yapılan çalışmalarda ilacın retina kan akımını arttırdığı gösterilmiştir.

Dorzolamidin timolol ile kombine kullanılması aditif etki doğuruyor. Dorzolamid %0.5'lik timolol ile kombine kullanıldığında göz içi basıncında 4.2 mmHg ek düşüş oluşuyor. Dorzolamidin timolol ile kombine kullanılmasında oldukça aditif bir etkinin gözlenmesi bu iki ilacın birleştirilerek kullanılması düşüncesini doğurmuş. Timolol %0.5 ile dorzolamid %2'nin kombinasyonu 1998'de tedaviye sunulmuştur.

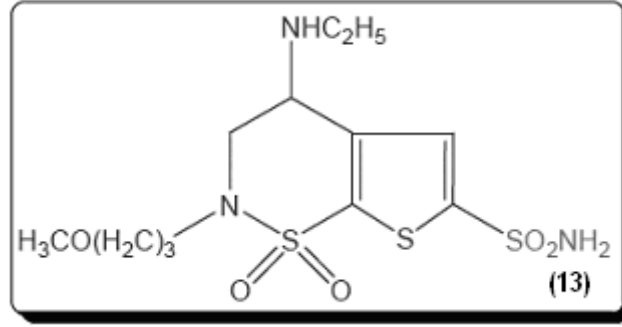
Ayrıca topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinin sistemik karbonik anhidraz inhibitörleriyle kullanılması önerilmiyor.

Rosenber ve arkadaşları 1998'de yayınladıkları çalışmalarda sistemik asetazolamid ve topikal dorzolamid kombinasyonunun göz içi basıncı azalması ve hüümör aköz formasyonu üzerindeki aditif etkilerini arştırmışlardır (Rasenber, 1998).

#### **2.13.3.1.1. Kullanımı**

Dorzolamid (12) günde iki kez % 2'lik göz damlası olarak kullanılır. Orta düzeyde GİB düşüşü sağlar. Asetazolamid ile olduğu gibi dorzolamidin oküler perfüzyonu arttırdığının belirtileri vardır. Bu bozuk kan akımının olduğu olgularda özellikle faydalıdır. Uygulama sonrası hafif bir yanma olabilir, gözler biraz kızarabilir. Kornea problemi olanlarda, durumlarında hafif bir bozulma olabilir. Bazı hastalarda geçici acı tadı hissedilebilir, bu da damlanın bir kısmının göz yaşı kesesinden gözü terk ederek buruna ve oradan ağza boşalması sebebiyledir. Burada dorzolamid karbonik anhidrazı inhibe etme etkiside gösterebilir. Daha az CO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'a dönüştürülerek CO<sub>2</sub> seviyesinde rotatif bir artış ağızda acı bir tat gelişimine yol açar. Ne yazık ki alerjik reaksiyonlar az değildir.

## 2.13.3.2. Brinzolamid



Şekil 2.12. Brinzolamid bileşiğinin yapısı

Brinzolamid (13) %1 lik lokal konsantrasyonda günde iki defa damlatılır. GİB'nı dorzolamid kadar etkili düşürürken daha az yan etki bildirilmiştir. Oküler dolaşıma dorzolamid gibi yararlı etkisinin var olup olmadığı zamanla görülecektir (Flammer, 2003).

Son yıllardaki çalışmalarda ise (13) ve (12) bileşiklerinin de; göz yanmaları, tahriş, yara oluşması ve dönüşümsüz tümör oluşumlarına sebep oldukları bulunmuştur. CA izoenzimlerinin fizyolojik ve fizyopatolojik fonksiyonlarında rol oynayan inhibitörlerden, 5-amino-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid (şekil 2.8) halkasına sahip safra asitleri türevleri sentezlenmiştir. (5-(3 $\alpha$ -hidroksi-5- $\beta$ -kolanamido)-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid, 5-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroksi-5- $\beta$  kolanamido)1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid ve 5-(3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -trihidroksi-5- $\beta$ -kolanamido)-1,3,4-tiyadiazol-2-sülfonamid] bileşikleri sentezlenip ve bu bileşiklerin vücutta büyük fizyolojik fonksiyonu olan CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir (Bülbül, 2002).

Daha yüksek omurgalılarda CA'nın önemli rol oynaması nedeni ile, CA inhibitörü özelliklerine sahip olan bileşikler başlıca aromatik/heterosiklik sülfonamidler (asetazolamid, metazolamid, etoksozolamid, diklorofenamid gibi), glokom ve çeşitli nörolojik/nöromuskolar bozukluklar (esas olarak titreme ve Parkinson hastalığı), asit-baz dengesizliği veya diüretikler olarak farklı patoloji

durumların tedavisinde 45 yıldan daha fazladır kullanılmaktadır.

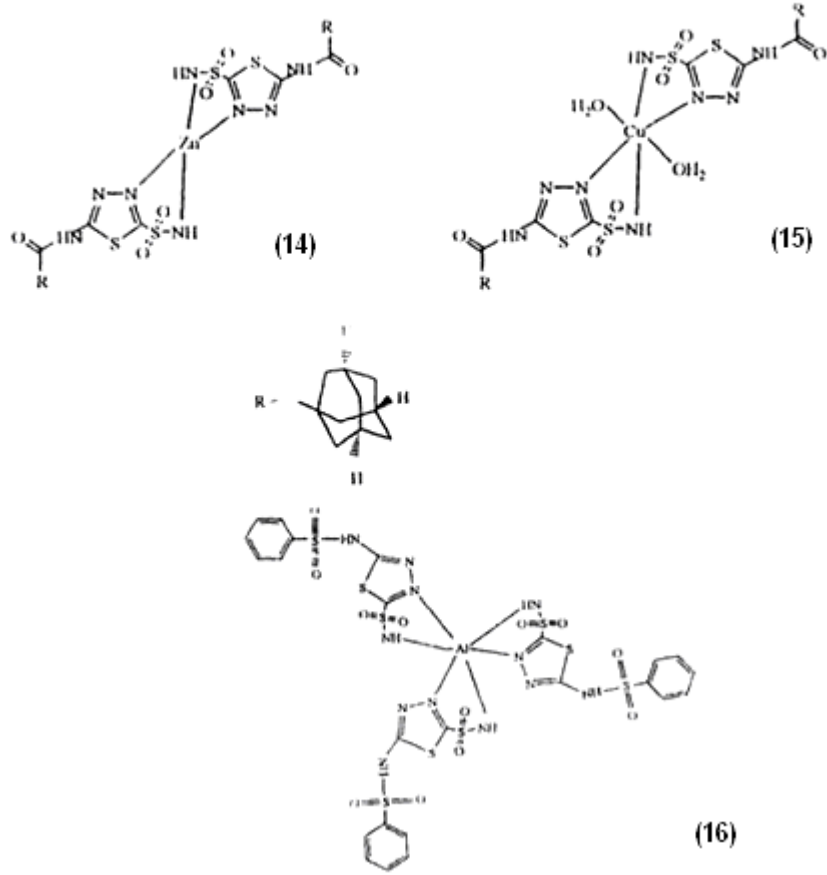
Bir çok alanda sülfonamidin koordinasyon kimyasına dikkate değer oranda bir ilgi vardır. Azot üzerindeki elektron yoğunluğunun elektronegatif oksijen atomları üzerine çekilmesi nedeniyle nötral sülfonamidler zayıf ligantlar olarak beklenir. Ancak, sülfonamidin azot atomuna bağlı olan hidrojenin kolay ayrılabilir olması nedeniyle sülfonamid anyonları etkili  $\sigma$ -verici ligantlar olarak davranır. Enzimin aktif olduğu sülfonamid kısmının metal ile koordine olabilmesi farmakolojik maddelerin bu ailesinin bir avantajıdır.

Asetazolamid, metazolamid, etoksozolamid, dorzolamid vs. gibi heterosiklik sülfonamid moleküllerinin içinde kalabalık heteroatomların bulunması (azot ve/veya sülfür) metal iyonları ile kompleks oluşturmak için onları cazip ligand haline getirir.

Heterosiklik sülfonamidler ile yapısal olarak ilgili spektroskopik ve X-ışını kristallografisi yöntemiyle karakterize edilen (Supuran, 1993). Bir çok metal kompleksi rapor edilerek farklı izoenzimlerin inhibisyonu için incelenmiştir (Supuran, 1992; Ilies, 2000). Ligand olarak daha çok incelenenler asetazolamid, metazolamid ve benzolamid gibi tiyadiazol sülfonamidlerdir. Gerçekten de metal kompleksleri için sadece bu üç sülfonamidin X-ışını kristal yapıları mevcuttur (Alzuet, 1994). Bununla beraber etoksozolamid ve dorzolamidin kompleksleri de bulunmaktadır. Heterosiklik sülfonamidlerin metal komplekslerinin CA inhibitörü özelliklerinin türetildikleri sülfonamidlere göre 10 ile 100 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Supuran, 1992). Bu güçlü inhibisyonun, sülfonamid anyonuna ve metal iyonlarına ilgisinden ileri geldiği koordinasyon bileşiklerinin seyreltik çözeltilerde çözünmesi ile bulunmuştur. Güçlü CA inhibisyonu gösteren sülfonamidin metal kompleksleri ile ilgili birkaç ilginç uygulama rapor edilmiştir Yüksek lipofilik tiyadiazol sülfonamidin kendisi CA inhibitörü özelliği göstermediği halde; çinko ve bakır komplekslerinin (şekil 2.13) (nanomolar CA II ve CA IV inhibitörleri) normal ve glokom hastalığı bulunan tavşanlara uygulanması sonucu çok etkili IOP düşürücü madde olduğu gözlenmiştir (Supuran ve Mincion, 1998). Daha sonra

bunun gibi bir çok diğer metal kompleksinin de buna benzer etki gösterdiği rapor edilmiştir (Briganti ve Tilli, 2000). Benzolamid kompleksi (şekil 2.13.) gibi, bazı alüminyum sülfonamid komplekslerinin de köpeklerde etkili antisekretör maddesi olarak davrandığı gözlenmiştir. Kronik gastrik fistüllü köpeklerin CA-I enzimi üzerinde günde 2x250 mg dozunda (şekil 2.13. alüminyum sülfonamid kompleksi) veya ilgili Zn(II) veya Mg(II) benzolamid/asetazolamid/etoksozolamid kompleksleri ile 3 gün denemeden sonra gastrik asit parametrelerinde bu enzim inhibitörlerini almayan hayvanlara göre kesin olarak bir azalma olduğu kayıt edilmiştir ( Ilies ve Scozzafava, 2000). Zn(II), Mg(II), Al(III) sülfonamid kompleksleri belkide çift mekanizma ile hareket ederek antiülser maddelerinin yeni sınıfını oluşturabilir.

Bahsedildiği gibi metal komplekslerinin CA-I inhibitör özelliklerinden elde edildikleri sülfonamidlere göre 10 ile 100 kat daha fazla etkili olmasının yanı sıra klinik olarak gastrik asit tedavisinde kullanılan asetazolamid (veya etoksozolamid)'in metal komplekslerinin asetazolamidin kendisi ile karşılaştırıldığında daha az yan etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Borrás ve çalışma arkadaşları yeni benzolamid ve asetazolamid türevlerinin Cu(II) ve Zn(II) komplekslerini sentezleyerek benzolamid ve asetazolamidin bu komplekslerdeki farklı koordinasyon özelliklerini incelemişlerdir.



Şekil 2.13. Çinko, Bakır ve Alüminyum Sülfonamid komplekslerinin yapıları

#### 2.14. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Yan Etkileri

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin uzun süreli uygulanmadaki faydaları, sistemik yan etkileri ve zayıf uyum nedeniyle sınırlanmaktadır. Çoğu vakada yan etkilerin şiddeti doza bağlıdır ve doz azaltılarak, başka bir ilaç kullanımına geçilerek ya da yavaş salınan bir preparat kullanılarak önlenmektedir (Özçetin, 2001).

1- Parmaklarda, ellerde ya da ayaklarda karıncalanma genel ve zararsız bir yakındır. Eğer hasta bu semptomların olmadığını iddia ediyorsa ilaca uyum mutlaka sorulmalıdır.

2- Yorgunluk, kırıklık, depresyon, kilo kaybı ve libido azalması gibi semptomlar görülebilir. Bu yüksek serum düzeyleri ve ilaca bağlı metabolik asidoz nedeniyledir. Hastaların % 50 sinde 2 haftalık sodyum asetat uygulaması semptomların gerilemesini sağlamıştır.

3- Gastrointestinal semptomlar, gastrik irritasyon, abdominal kramplar, diyare , bulantı ve kusma ile karakterizedir.

4- Çeşitli yan etkiler; renal taslar, steven jhonsen sendromu, kemik iliği depresyonu, geçici miyopiyi kapsar.

5- Kanda CO<sub>2</sub> birikimini artırdığından dolayı çok risklidir kullanılmaz. Karbonik anhidraz inhibitörleri, sülfonamitlerin değişik türevlerini oluşturan ajanlardır. Doğrudan karbonik anhidraz enzimini inhibe ederek ve daha küçük bir oranda asidoz oluşturarak hümor aköz salgılanmasını azaltmak suretiyle göz içi basıncını düşürürler. Karbonik anhidraz inhibitörleri, sistematik olarak verildiklerinde akut glokomların kısa süreli tedavisinde fayda sağlasalar da, uzun süreli kullanımlarda genellikle yüksek görme kaybı riski taşıyan hastalar için rezerve edilmistir. Miyotiklerle kombine edildiklerinde gayet iyi ilave etki oluştururlar (Orağlı, 2001).

### **2.15. Sülfonamitlerin Tarihçesi**

Kemoterapi ilaç tasarımı ve medisinal kimyanın kurucusu Paul Ehrlich'in buluşları özellikle Almanya'da antimikrobiyal ajanlar olarak düşünülen boyalar üzerindeki çalışmalarla yoğunlaşmış ve Bayer laboratuvarlarında azo grupların sentezleri başlamıştır. Gerhard Domagk 1932 yılında daha sonra "prontosil" olarak isimlendirilen kırmızı bir boya üzerinde çalışmış ve bunun farelerdeki streptokok enfeksiyonlarında oldukça etkili olduğunu bulmuştur. Ancak bakteri kültürlerinde inaktif olduğu görülmüştür. Prontosil'in invitro inaktif, invivo olarak ise aktif bulunması oldukça ilgi çekmiştir (Farmasotik tek.,2000).

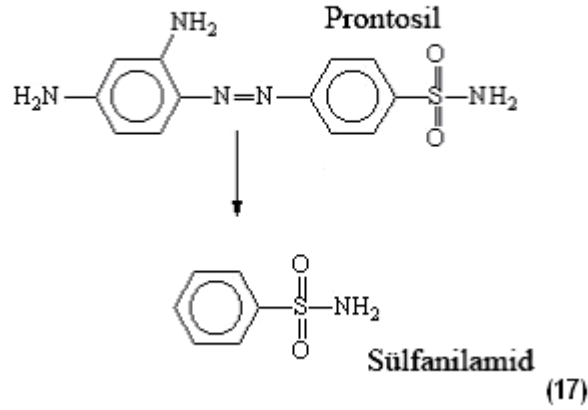
1935'te Gerhard Domagk ve arkadaşlarının farelerde oluşturdukları hemolitik streptococcuslardan ileri gelen enfeksiyonları prontosille tedavi

etmelerinden sonra antienfeksiyöz kemoterapide ilk adım atılmış oldu (Dökmeci, 1996).

Bir grup araştırmacı, 1936 yılında yaptıkları çalışmada , sülfonamid yapısı taşıyan azo boyaların yapı etki ilişkilerini incelemiş ve N=N bağının biyotransformasyon sonucu kırılarak aktif bileşik olan sülfonamid yapısının oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç prontosille, tedavi edilen hastaların kan ve idrarında sülfanilamidi izole etmesi Fuller tarafından doğrulanmıştır. Bu bulgulardan sonra 1948 yılına kadar 4500'ün üstünde sülfonamid türevi sentez edilerek incelenmiş ancak bunlardan sadece iki düzine kadarı klinikte kullanım alanı bulmuştur (Farmasotik tek.,2000).

Bunlardan bir kısmı antibakteriyel diğer bir kısımda hipoglisemiyen ve dairesel etkilere sahip sülfonamidlerdir. Antibakteriyel etkili sülfonamidler geniş spektrumları nedeniyle tek başlarına çok sayıda endikasyonda uzun yıllar kullanılmışlardır. Daha sonra trimetoprim, tetoksoprim ya da primetamin (diaminoprimidinler) gibi dihidrofolat reduktaz inhibitörleriyle kombine edilerek, günümüzde de çok sayıda enfeksiyona karşı kullanılmaktadırlar. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde, idrar yolu enfeksiyonu ve trohom gibi bakteriyel hastalıklarda etkili ve ucuz oldukları için, sülf grubu ilaçlar halen kullanılmaktadır. Ancak dirençli suşlar geliştiğinden, hastalarda alerjik reaksiyonlar görüldüğünden ve penisilinlerin yaygın kullanımı nedeniyle sülf grubu ilaçlar trimetoprim ile sinerjistik etki gösterdikleri saptanıncaya kadar kullanılmamışlardır (Farmasotik tek., 2000).





Şekil 2.16. Sulfanilamid bileşiğinin yapısı

## 2.16. Sülfonamidlerin Farmakokinetiği

### 2.16.1. Uygulama yolu

Sülfonamidler sistemik etki oluşturmak için genellikle ağız yolundan kullanılırlar. Mide ve ince bağırsaklardan oldukça hızlı bir şekilde tam veya tama yakın oranda absorbe edilirler. Plazma albüminine bağlanma oranları % 20-95 arasında değişir. Etki süreleri kısa olanlar genelde düşük oranda bağlanırlar; örneğin sülfadiazinin bağlanma oranı % 25' dir. Depo sülfonamidler yüksek oranda bağlanırlar. Kandaki etkin konsantrasyonları antibiyotiklerinkine göre oldukça yüksek olup 60 -150 mg/ml arasındadır. Ağız yolundan alındıktan sonra 2-4 saat içinde kanda doruk konsantrasyona erişirler.

### 2.16.2. Emilme

Sülfonamid, sülfisoksazol, sülfamerazin, sülfadiazin, sülfametazin, sülfametizol ve sülfametoksazol sindirim sisteminde hızla emilir. Bunların önde gelen avantajları asidik ortamda çok eridiklerinden, böbrekte çökmeleridir.

Bununla birlikte uzun etkili sülfamidlerin yüksek konsantrasyona erişmesi yan etkilerin daha sık görülmesine ve daha ciddi boyutlara varmasına yol açar.

### **2.16.3. Dağılım**

Sülfonamidler hücre zarlarını kolaylıkla geçerler ve beyine eritrositlere, akciğerlere, karaciğere, pankreasa, kaslara ve sinirlere dağılırlar. Sülfonamidler insan plasentasına kolaylıkla geçerler ve fetüsteki konsantrasyonu hemen hemen anne plazmasındaki konsantrasyonuna eşit olurlar.

Diğer önemli özelliğibütün beden sıvılarına kolaylıkla geçmeleridir. Bu özellikleri nedeniyle omurilik sıvısındaki konsantrasyonları plazma konsantrasyonunun %35 – 75'ne kadar ulaşarak menenjit tedavilerinde kolaylık sağlamalarıdır. İltihaplı beyin zarlarının normallere göre daha geçirgen olmaları sonucu omurilik sıvısında tedavi edici konsantrasyonlara daha kolaylıkla ulaşırlar.

### **2.16.4. Atılma**

Bütün sülfonamidlerin plazmadan atılması böbrekler aracılığıyla olmaktadır. Serbest ya da konjuge şekillerde atılırlar. Suda eriyen sülfonamidler ince bağırsağın üst kısmından atılır ve alt kısmından reabzorbe olur (Diphalma, 2000).

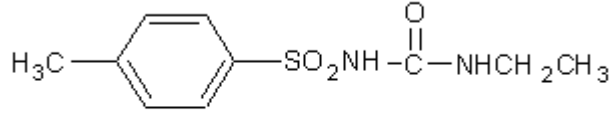
### **2.17. Fiziksel Özelliği**

Sülfonamidler, beyaz, kokusuz, suda az çözünen, buna karşın serum ve safrada iyi çözünen, acı tatda kristalize tozdurlar ve alkali pH'da çözünürlükleri artar. Sülfonamidler sentetik maddelerdir, para-aminofenil sülfonamid ya da sülfanilamid türevleridirler.  $SO_2NH_2$  fonksiyonu üzerindeki değişmelerle elde edilen türevler antibakteriyel yönden çok aktiftirler.

### 2.18. Yapı – Aktivite İlişkileri

Sülfonamid molekülünde  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubunun tek başına olması antibakteriyel aktivite için yeterli değildir. Fakat serbest  $-\text{NH}_2$ 'nin para pozisyonunda bulunması gerekir. Çünkü yapısında  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubu bulunduran hipoglisemiyen ve diüretik sülfonamidlerin anti bakteriyel aktiviteleri yoktur.

En aktif antibakteriyel sülfonamidler  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubundaki hidrojen yerine heterosiklik grupların getirilmesiyle elde edilmektedir. Örneğin; pirimidin, ve dimetoksipiridin, metoksipiridazin, tiadiazol.

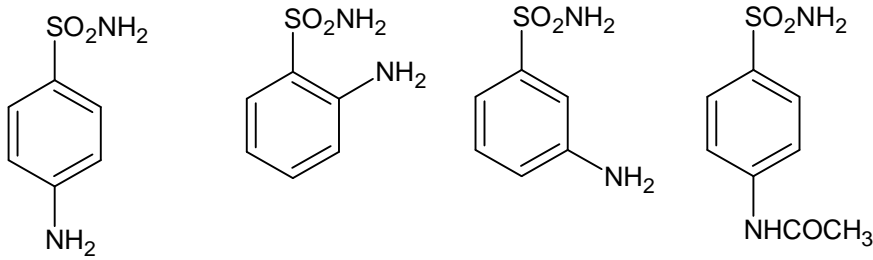


Hipoglosemiyan Sülfonamid (18)

(Tolbutamid)

Şekil 2.17. Bileşiğinin yapısı

Antibakteriyel aktivite için gerekli olan para  $-\text{NH}_2$  grubunun asetilleşmesi antibakteriyel etkinin kaybolmasına neden olur. Aşağıda sülfanilamidin yapısındaki değişikliklerle ortaya çıkan inaktivasyon durumları gösterilmiştir.



**Aktif**

**İnaktif**

**İnaktif**

**İnaktif(asetilen)**

Şekil 2.18. Sülfanilamid bileşiklerindeki aktivasyon durumları

### 2.19. Kimyasal Özellikleri

Prontosilin bulunması ve prontosilin bir azo grubu boya olması, önceleri bu bileşiğin antimikrobik etki ve eyleminin azoik grupla ilgili olduğu kanısını verdi. Fakat daha sonra azo grubunun antimikrobik etki ve eylem için gerekmediği, bu durumun antimikrobik gücünün sülfonamid grubuna bağlı olduğu bulundu. Bu temel bilgiden gidilerek oldukça geniş bir mikrop türü üzerinde antimikrobik etki ve eylemli sülfonamidler tedaviye sokuldu. Azoik nitelikte boyalı bileşiklerin, bu biçimde azo grupları atılınca, renkleri ile birlikte emilme, metabolizma, atılma özellikleri değişti, ağırlıkları azaldı ve daha ilginç, antimikrobik güçlerinde artma oldu.

Sülfonamidlerin genel kimyasal yapısında, benzol halkasında para durumunda bir amino grubu ile bir sülfonamid grubunun bulunması gerekir. Sülfonamid grubuna meta ve orto durumda amino grubu getirilirse, bu bileşiğin antimikrobik etki ve eylemi olmaz. Sülfonamid grubuna para durumunda bulunan amino grubunun hidrojenleri yerine herhangi bir grup getirilerek, bileşiğin antimikrobik etki ve eylem gücünü tamamen kaldırır. Orto ve meta durumlarında bulunan yan gruplar sülfonamidin asitilasyonu antibakteriyel etki ve eylemi siler.

Amino grubunun hidrojenleri yerine başka gruplar sokulmuş ve eylemi silinmiş bileşikler, vücuda girdiklerinde değişikliğe uğrayıp yeniden yan grupsuz amino duruna ( $\text{NH}_2$ ) geçerlerse, bu bileşikler eski antimikrobik etki ve eylem güçlerini kazanırlar.

Sülfonamid grubunun  $\text{NH}_2$  bölümündeki hidrojenler yerine değişik gruplar getirilerek, bir çok antimikrobik etki ve eylem gösteren bileşikler elde edilir. Hidrojen yerine getirilen gruplar alifatik zincir olabileceği gibi, halkalı bileşiklerde olabilir. Bu halkalı bileşiklerde azot – kükürt, azot – azot, azot – oksijen bağları elde edilen bileşiklerin bazı niteliklerine yön verir.

Sülfonamid grubunun sülfan (SO<sub>2</sub>) bölümü antimikrobik etki ve eylem için kesinlikle gerekli değildir. Sülfan yerine kükürtlü herhangi bir grup aynı etki ve eylemi sağlar. Sülfonamid biçiminde sentez ve bu sentez sonucu türevler elde etmek kolay olduğundan, bu yol daha çok kullanılır (Şafak, 1991).

### **2.20. Yan Etkileri**

Yan etkileri, bulantı, kusma ve diyare gibi reaksiyonları; döküntü, Steve Johnson sendromu, vaskülit, serum hastalığı, anafilaksi ve anjiyödem gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları; kristaluri, oliguri ve anuri; methemoglobinemi, granülositoz, trombositopeni, yeni doğanda kerniterus ve G6PD noksanlığı olan hastalarda hemolitik anemi gibi hematolojik reaksiyonlar; fotosentivite, perferik nörit, insomni ve baş ağrısı gibi nörolojik yan etkilerdir. Steve Johnson sendromunun uzun etkili sülfonamidlerle kısa etkililere göre daha sık etkili olduğu sanılmaktadır. Sülfonamidlerin termdeki anne veya yeni doğana verilmesi kernikterusla sonuçlanabilir. Çünkü sülfonamidler yeni doğanda bilirubini albuminden ayrılırlar. Bu nedenle terme yakın gebelerde ve yeni doğanlara sülfonamid verilmemelidir. Diğer yan etkileri, hipotiroidi, hepatit, sülfonilüre etkisini potansiyalize etmelerine bağlı hipoglisemi ve kumarin antikogulanların etkisinin potansiyalize olmasıdır. Yan etki indisesi çeşitli sülfonamidler için farklıdır ancak çapraz duyarlılık sık görülür (Keklikoğlu ve Tuzcu, 1995).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan malzemeler**

- Cam malzemeler olarak tek ve iki boyunlu çeşitli ebatlarda balon, geri soğutucu, erlen, beher, büret, mezür, kılcal boru
- Manyetik karıştırıcı ve balık
- Spor ve kısıkaç
- Buzdolabı
- Piset, baget, puvar, pipet
- İnce Tabaka Kromatografisi için alüminyum plakalar DC Alufolin 60 F 724 TLC (Merck)
- UV spektroskopisi için Quartz küvetler.

##### **3.1.2 Kullanılan cihazlar**

- **UV Lambası:** Camag UV-Lamb (254-366 nm).
- **Hassas Terazi:** Sertorius CP 224 S.
- **Rotary Evaporator:** Heidolph Laborta 4003–contral.
- **Erime Noktası Tayin Cihazı:** Stuart Scientific Melting Point Apparatus.
- **Etüv:** Nüve FN 500, Safety Thermostat.
- **pH Metre:** Crison pH Meter Basic 20.
- **FT-IR Spektrometre:** Perkin Elmer Spektrum.
- **UV-Vis Spektrometre:** Hitachi U-1900 UV-Vis Spektrometre.
- **Manyetik Karıştırıcı:** Heidolph MR 3001.

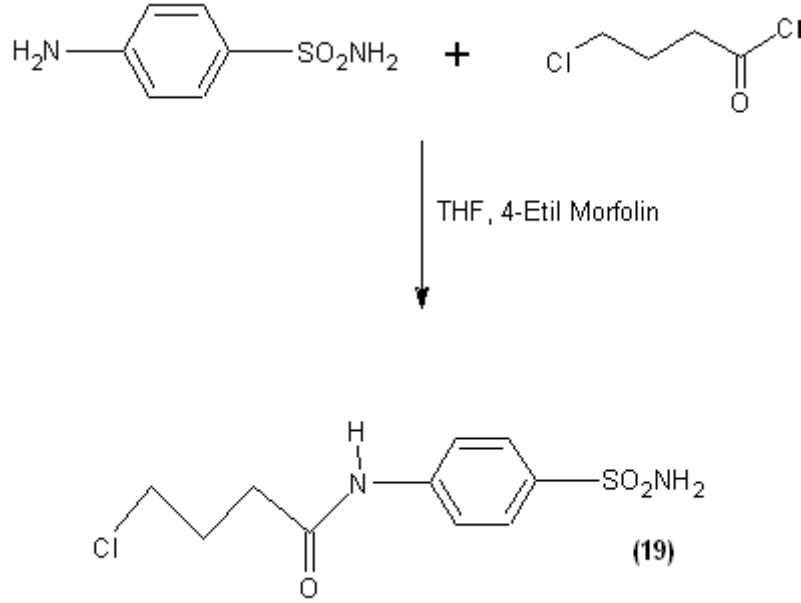
### 3.1.3. Kullanılan kimyasallar

- Aseton
- Etil asetat
- Etil alkol
- Sülfanilamid
- Kloroasetilklorür
- 4-etil morfolin
- Tetrahidrofuran (THF)
- Diklormetan (DCM)
- 3-kloropropanoil klorür
- 3-kloropivaloil klorür
- Asetazolamid
- Metanol
- Dimetilsülfoksit (DMSO)
- Potasyum bromür
- Metil alkol
- *p* – nitrofenil asetat
- Tris(hidroksimetil)aminometan
- Hidroklorik asit
- Karbonik anhidraz enzimi
- Potasyum karbonat ( $K_2CO_3$ )
- Dietileter
- D-glukoz
- D-fruktoz
- Gliserin

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Sentez

##### 3.2.1.1. 4-(4-klorobütanoilamino) – benzen sülfonamid (1) bileşiğinin sentezi

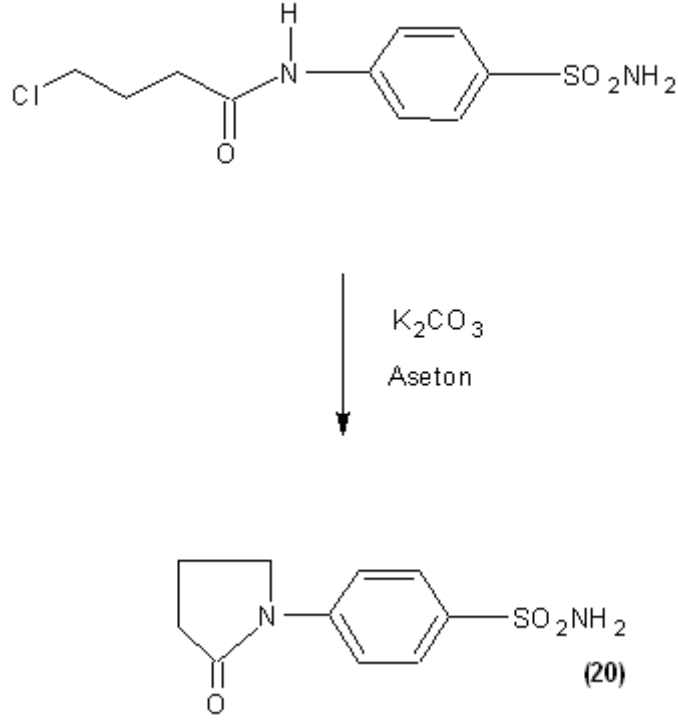


Şekil 3.1. 4-(4-klorobütanoilamino)-benzen sülfonamid (1) bileşiğinin sentezi

4-(4-klorobütanoilamino)-benzen sülfonamid (1) bileşiğini sentezlemek amacıyla 250 ml lik çift boyunlu balona alınan sülfanilamid (3 g, 0.017 mol) 75ml THF’de çözüldü. Balona 4-etil morfolin bileşiği (2 g , 0.023 mol), ilave edildi ve 4-klorobütanoilklorür (2.47 g, 0.017 mol) 20 ml THF de çözümlenerek reaksiyon balonuna damla damla ilave edildi. Reaksiyon manyetik karıştırıcıda devamlı karıştırmak suretiyle oda sıcaklığında 3 saat devam etti. Reaksiyon gidişatı TLC analizleri (diklor metan/etanol) ile kontrol edildi. TLC analizi ile reaksiyonun bittiği gözlemlendi. Süzülerek tuz ayrıldı. Daha sonra evaporatörde çözücü buharlaştırıldı. Son aşamada bileşimiz kurutulularak ürünümüz elde edildi. Verim: %76, erime noktası: 195 °C , kapalı formülü: C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>SO<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Cl



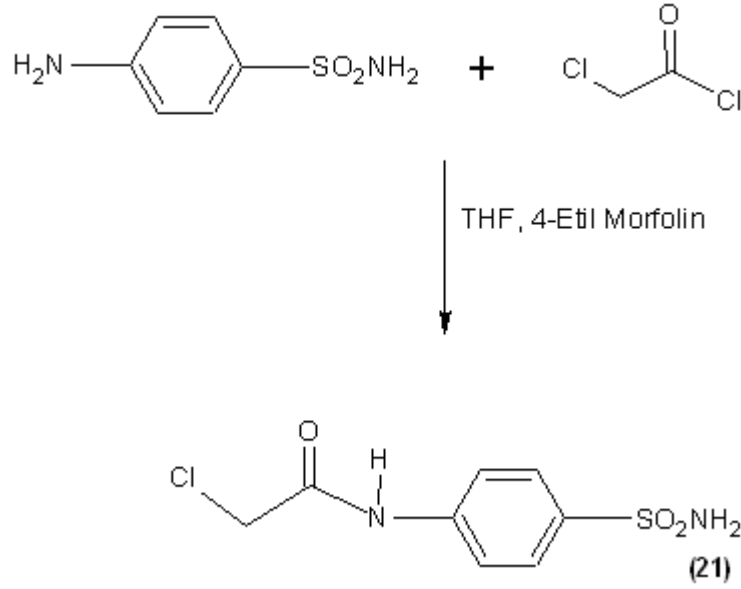
## 3.2.1.2. 4-(2-oksopirolidinil) benzen Sülfonamit (2) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.2. 4-(2-oksopirolidinil) benzen Sülfonamit (2) bileşiğinin sentezi

Sentez için 250 ml'lik bir balona daha önce sentezlenen 4- klorobütanoil amino benzen Sülfonamit (19) bileşiğinden 1,5 g (0.0054 mol) alındı. 1 g (0.0072 mol) potasyum karbonat ile karıştırıldı. 100 ml aseton çözücü olarak ilave edilerek kaynatıldı. 24 saat sonra reaksiyonun tamamlandığı TLC 'ye bakılarak gözlendi (çözücü olarak etil asetat kullanıldı). Süzme yapılarak tuzu alındı, daha sonra evaporatörde çözücü buharlaştırıldı. Son aşamada bileşiğimiz kurutularak ürünümüz elde edildi. Verim: %53, erime noktası: 245  $^{\circ}C$ , kapalı formülü:  $C_{10}H_{12}SO_3N_2$

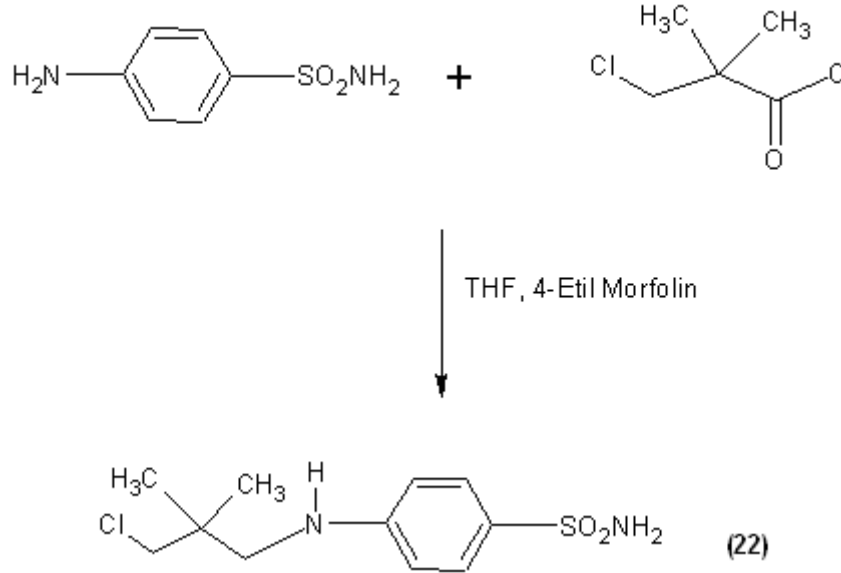
## 3.2.1.3. 4-( kloroasetilamino) – benzen sülfonamid (3) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.3. 4- (kloroasetilamino)-benzen sülfonamid (3) bileşiğinin sentezi

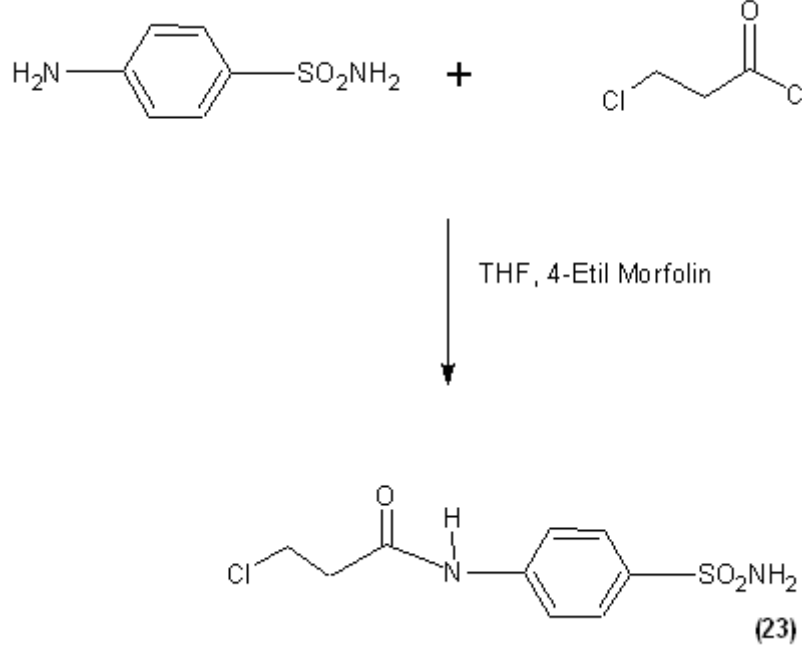
Sentez için 1 g (0.0058 mol) sülfanilamid bileşiği 250 ml'lik çift boyunlu bir balona alındı. Üzerine 35 ml THF yavaş yavaş oda sıcaklığında eklendi. Üzerine 0.88 ml (0.007 mol) 4-etil morfolin ilave edildi. Reaksiyon geri soğutucuya takılarak gerçekleştirildi. Üzerine 0.55 ml (0.008 mol) kloroasetilklorür 20 ml THF'de çözümlenerek balona yavaş yavaş ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 3 saat sonra TLC'ye bakılarak reaksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğine bakıldı. Ürün oluşmadığı gözlemlendi. Bu nedenle 0.46 ml (0.006 mol) kloroasetilklorür ve 0.73 ml (0.0058 mol) 4-etil morfolin daha ilave edildi. 4 saat sonra tekrar TLC'ye bakıldı ve reaksiyonun tamamlandığı gözlemlendi. Çözücü olarak diklorometan/etanol kullanıldı. Daha sonra karışım süzüldü ve tuzu alındı. Sonra evaporatörde çözücü uçuruldu. Daha sonra etil alkol ile kristallendirilerek saf ürün elde edildi. Verim: %62, erime noktası : 221 °C, kapalı formülü: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>SO<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Cl

### 3.2.1.4. 4-(3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino)benzen sülfonamit (4) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.4. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşiğinin sentezi

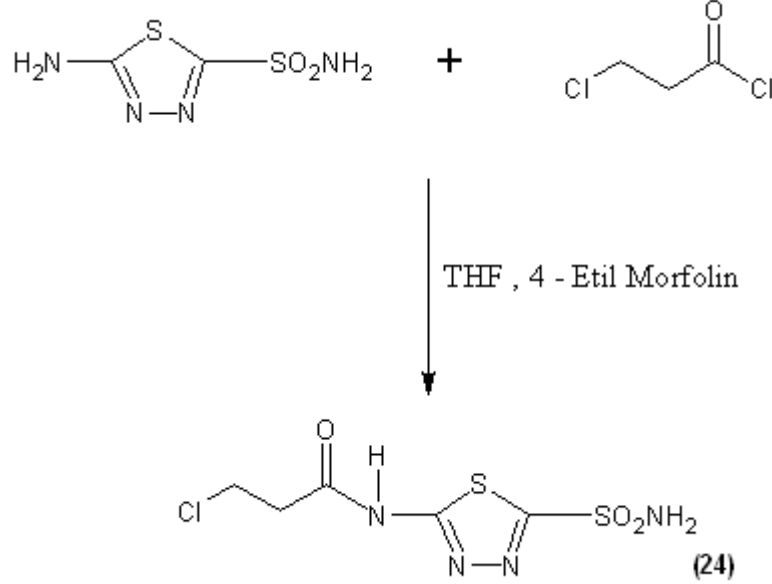
250 ml'lik çift boyunlu balona 3 g (0.018 mol) sülfanilamit alındı. 50 ml THF ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Reaksiyon oda koşullarında gerçekleştirildi. Üzerine 4.3 ml (0.034 mol) 4- etilmorfolin ilave edildi. Daha sonra 4.55 ml (0.047 mol) 3-kloro 2,2 dimetilpropanoiklorür 20 ml THF ile karıştırılarak karışıma ilave edildi. Tuz oluşumu hemen gözlemlendi. Reaksiyon gidişatı TLC analizleri ile kontrol edildi. 24 saat sonra TLC'de (etil asetat/ aseton) reaksiyonun tamamlandığı gözlemlendi. Daha sonra süzme yapıldı ve kalan sıvı kısmın çözücüsü evaporatörde buharlaştırıldı. Kalan kısım buzdolabında bekletildi. Sonra etil alkol ile kristallendirme yapılarak ürün elde edildi. Verim: %56, erime noktası: 183-184<sup>0</sup>C, kapalı formülü: C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>SO<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Cl

**3.2.1.5. 4- ( 3-kloropropanoilamino ) benzen sülfonamit (5) bileşiğinin sentezi**

Şekil 3.5. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (5) bileşiğinin sentezi

250 ml'lik çift boyunlu balona 2 g (0.011 mol) sülfanilamit alındı ve 40 ml THF karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Üzerine 1.74 ml (0.016 mol) 4- etil morfolin, daha sonra 1.34 ml (0.014 mol) 3- kloropropanoilklörür ilave edildi. 4 saat sonra TLC'ye (etil asetat/aseton ile) bakılarak reaksiyonun bittiği gözlemlendi. Daha sonra süzme yapıldı ve evaporatörde çözücü uçuruldu. Buzdolabında kalan kısım bekletilerek kristal oluşum gerçekleştirildi. Verim: %75, erime noktası: 220<sup>0</sup>C, kapalı formülü: C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>SO<sub>3</sub>N<sub>2</sub>Cl

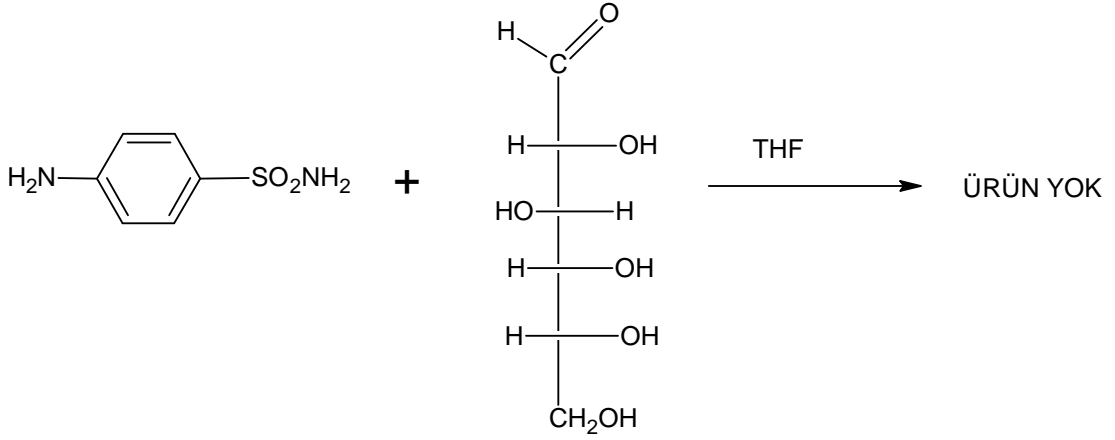
### 3.2.1.6. 2-(3-kloropropanoilamino)1,3,4-tiyadiazol 5-sülfonamit (6) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.6. 2-(3-kloropropanoilamino) 1,3,4-tiyadiazol 5-sülfonamit (6) bileşiğinin sentezi

250 ml'lik çift boyunlu balona 2 g (0.011 mol) 2-amino-1,3,4-tiyadiazol 5-sülfonamit alındı ve 50 ml THF karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Üzerine 1.7 ml (0.016 mol) 4- etil morfolin, daha sonra 1.3 ml (0.013 mol) 3- kloropropanoilklorür ilave edildi. Reaksiyonun gidişatı TLC analizinden takip edilerek gözlemlendi. 24 saat sonra TLC'ye (Diklormetan/metanol çözücü ile) bakılarak reaksiyonun bittiği gözlemlendi. Daha sonra süzme yapıldı ve evaporatörde çözücü uçuruldu. Buzdolabında kalan kısım bekletilerek kristal oluşum gerçekleştirildi. Verim: %58, erime noktası: 203 °C, kapalı formülü: C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Cl

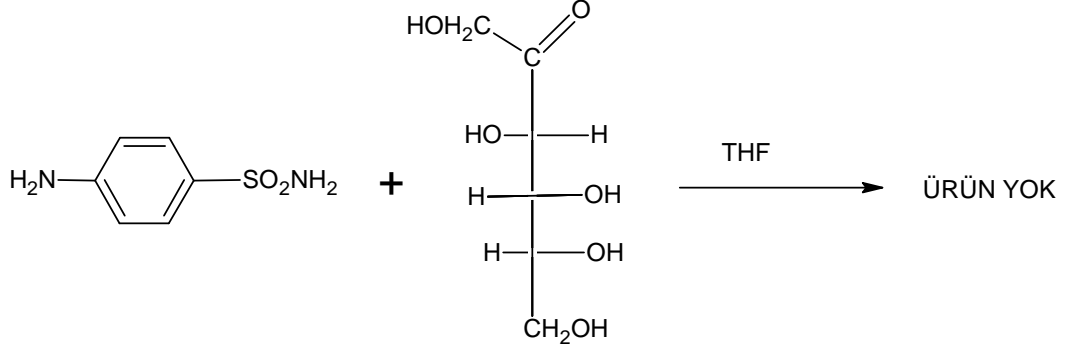
## 3.2.1.7. 4-(D-glukozamino) benzensülfonamit (7) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.7. 4-(D-glukozamino) benzensülfonamit (7) bileşiğinin sentezi

Sentez için çift boyunlu balon kullanıldı. Reaksiyon geri soğutucuda gerçekleştirildi. Başlangıç maddesi olarak sülfanilamit bileşiğinden 1 g (0.0058 mol) alındı. 40 ml THF içerisinde manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak oda sıcaklığında çözüldü. 1.04 g (0.008 mol) D-glukoz 25 ml metanol içerisinde çözüldükten sonra balona ilave edildi. 1 gün sonra TLC'ye (etilasetat/etanol, diklormetan/metanol, etilasetat/metanol çözücü sistemlerinde) bakıldı. Ürün gözlenmedi. Reaksiyon sıcaklığı 70<sup>0</sup>C'ye çıkarılarak bir gün sonra tekrar TLC'de reaksiyon gidişatı kontrol edildi. Ürünün oluşumu gözlenmedi. 8.gün sonunda yeterince madde oluşumu gözlenmediği için reaksiyona son verildi.

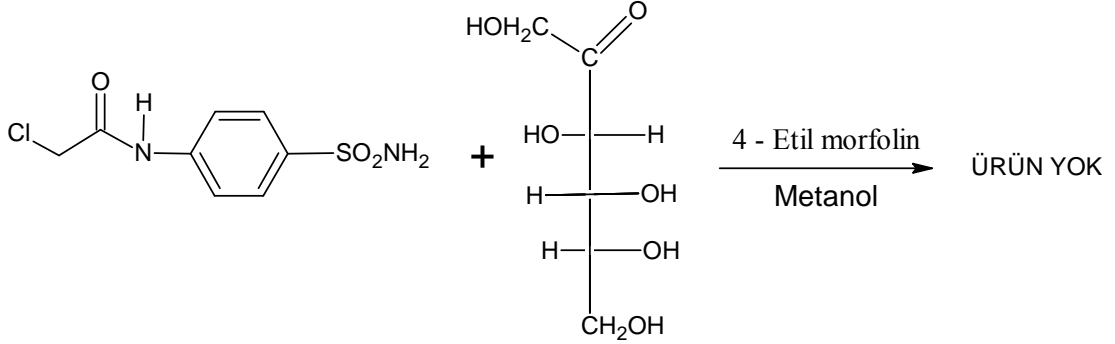
## 3.2.1.8. 4-(D-fruktozamino) benzensülfonamit (8) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.8. 4-(D-fruktozamino) benzensülfonamit (8) bileşiğinin sentezi

Sentez için çift boyunlu balon kullanıldı. Reaksiyon geri soğutucuda gerçekleştirildi. Başlangıç maddesi olarak sülfanilamit bileşiğinden 1 g (0.0058 mol) alındı. 40 ml THF içerisinde manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak oda sıcaklığında çözüldü. 1.04 g (0.008 mol) D-fruktoz 20 ml etanol içerisinde çözüldükten sonra balona ilave edildi. 1 gün sonra TLC'ye (etilasetat/etanol, diklormetan/metanol, etilasetat/metanol çözücü sistemlerinde) bakıldı. Ürün gözlenmedi. Reaksiyon sıcaklığı 70 °C'ye çıkarılarak bir gün sonra tekrar TLC'de reaksiyon gidişatı kontrol edildi. Ürünün oluşumu gözlenmedi. 8. gün sonunda yeterince madde oluşumu gözlenmediği için reaksiyona son verildi.

### 3.2.1.9. 4-(2-D-fruktoziletanoilamino) benzensülfonamit (9) bileşiğinin sentezi

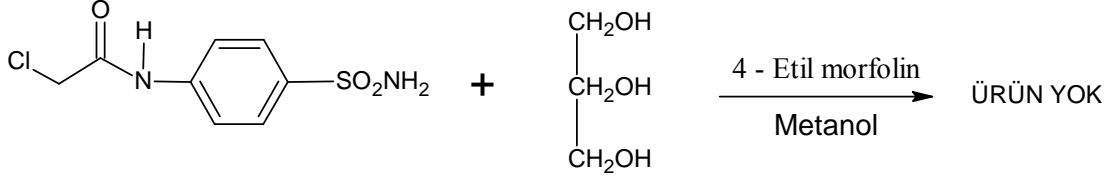


Şekil 3.9. 4-(2-d-fruktoziletanoilamino) benzensülfonamit (9) bileşiğinin sentezi

Sentez için çift boyunlu balon kullanıldı. Reaksiyon geri soğutucuda gerçekleştirildi. Başlangıç maddesi olarak 4-(2-kloroasetilamino) benzen sülfonamit bileşiğinden 0.2 g (0.00078 mol) alınarak 20 ml metanolde balon içerisinde manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak çözüldü. Balon içerisine 0.21 ml(0.0017 mol) 4-etil morfolin ilave edildi. 0.14 g (0.00077 mol) D-fruktoz alındı, 20 ml metanol içerisinde 50 °C'de çözüldü. Çözünen başlangıç çözeltisinin üzerine D-fruktoz çözeltisi ilave edildi. 3 saat kaynatıldı. Daha sonra TLC analizi yapıldı. (etilasetat/etanol, diklormetan/etanol, çözücü sistemlerinde) bakıldı. Ürün gözlenmedi. Reaksiyon gidişatı bir gün sonra tekrar TLC'de kontrol edildi. Ürünün oluşumu gözlenmedi. 10. gün sonunda madde oluşumu gözlenmediği için reaksiyona son verildi.



### 3.2.1.10. 4-(2-gliseriletanoilamino) benzensülfonamit (10) bileşiğinin sentezi



Şekil 3.10. 4-(2-gliseriletanoilamino) benzensülfonamit (10) bileşiğinin sentezi

Sentez için çift boyunlu balon kullanıldı. Reaksiyon geri soğutucuda gerçekleştirildi. Başlangıç maddesi olarak 4-(2-kloroasetilamino) benzen sülfonamit bileşiğinden balon içerisine 0.2 g (0.00078 mol) alınarak, 20 ml metanolde manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak çözüldü. Balon içerisine 0.21 ml (0.0017 mol) 4-etil morfolin ilave edildi. 0.11 ml (0.0015 mol) gliserin alındı, 20 ml metanol içerisinde karıştırıldı. Çözünen başlangıç çözeltisinin üzerine gliserin çözeltisi ilave edildi. 3 saat kaynatıldı. Daha sonra TLC analizi yapıldı. (etilasetat/etanol, diklormetan/etanol, çözücü sistemlerinde) bakıldı. Ürün gözlenmedi. Reaksiyon gidişatı bir gün sonra tekrar TLC'de kontrol edildi. Ürünün oluşumu gözlenmedi. 10. gün sonunda madde oluşumu gözlenmediği için reaksiyona son verildi.

### 3.2.2. Biyolojik çalışma

Biyolojik çalışmada sentezlenen yeni bileşiklerin (*In vitro*) inhibitör aktiviteleri incelendi. Bu yeni bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayısı ve inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. İnhibitör aktivitesi  $IC_{50}$ , bölme katsayısı  $P_{eter} / P_{su}$  sudaki çözünürlükleri g/100 ml olarak verilmiştir. İnhibitörlerin birbirleriyle kıyaslanmasında iki sabit vardır. Birincisi: İnhibitör enzim ayrışma sabiti  $K_i$ , ikincisi: inhibitör enzim bağlama sabiti  $IC_{50}$ 'dir.

### 3.2.2.1. Sentezlenen bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerlerinin saptanması

İlaç olarak kullanılan maddelerin aktivitesi IC<sub>50</sub> değeri ile ifade edilir. IC<sub>50</sub> değeri enzimin %50'sinin inhibe olması için gerekli olan molar konsantrasyonudur. Bu değer saptanması için Aldrich firmasından sağlanan Sığır Karbonik Anhidraz Enzimi standart olarak kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalara uygun olarak inhibitör aktivitelerinin ölçümünde 348 nm dalga boyunda enzimin etkisiyle *p*-nitro fenilasetatın hidrolizi incelenmiştir. Burada hidroliz sonucunda *p*-nitro fenol oluşmaktadır (pocker ve ark. ,1967). İnhibitör aktivite ölçümleri ideal pH olan 8.3'de 400 nm dalga boyunda Erel yöntemiyle yapılmıştır (Erel ve ark,2002).

#### 3.2.2.1.1. Sentezlenen bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması

- *P*-nitro fenilasetat çözeltisi hazırlandı, 0.0275 g (0.1518 mol) madde 1 ml asetonda çözüldü ve deiyonize suyla 50 ml'ye tamamlandı.
- Tris tampon çözeltisi, 6.06 g tris(hidroksimetil)amino metan (0.015 mol) alındı ve 100 ml deiyonize suda çözüldü pH 'ı HCl ile 8.3'e ayarlandı.
- Karbonik anhidraz enzimi, 5 mg enzim alındı 10 ml tris tamponunda çözüldü.
- Blank çözelti hazırlama, bir spektro küveti içerisine 1000 µl tris tamponu +100 µl su + 100 µl hazırlanan karbonik anhidraz enzimi konuldu.
- Hazırlanan blank UV-VIS'e konuldu. 400 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. 75.sn 'de 100 µl *p*-nitro fenil asetat çözeltisinden eklendi.
- 100 sn'den sonra her 50 sn'de bir değerler alındı. Bu alınan değerler excell'de grafiğe döküldü.
- Daha sonra 0.0222 g sülfanilamid alındı 5 ml metanol + 5 ml su ile karıştırılarak 10 ml çözelti oluşturuldu.
- Bu çözeltden 0.1 ml alındı. Üzerine 9.9 ml saf su eklenerek yeni çözelti oluşturuldu. (0.1 mM sülfanilamid çözeltisi hazırlanmış oldu)

- Hazırlanan çözeltilerden 100 µl spektro küvetine alındı + 1000 µl tris tamponu + 100 µl hazırlanan karbonik anhidraz enzimi konuldu.
- 400 nm’de absorpsiyon ölçümü yapıldı. 75.sn ‘de 100 µl p-nitro fenil asetat çözeltilisinden eklendi.
- 100 sn’den sonra her 50 sn’de bir okunan değerler kaydedildi. Excell’de grafik oluşturuldu.
- Diğer maddelerde aynı şekilde yapıldı.

### **3.2.2.2. Bölme katsayısı ölçümü**

Sentezlenen bileşiklerin bölme katsayısı Hans (30) tekniği olarak bilinen standart teknik kullanılarak eter-su çözücü sistemi ile ölçüm yapıldı. Bu ölçüm hesabı aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$P = C_o/C_w (1-\alpha)$$

Burada P: bölme katsayısı Co: bileşiğin eter fazındaki konsantrasyonu Cw: bileşiğin su fazındaki konsantrasyonu α: bileşiğin sudaki dissosiyasyon derecesi. Göz içi dokulara iyi dağılım olması için bölme katsayısı değeri en az 0.01 olmalıdır. Asetazolamidin bölme katsayısı 0.14.

#### **3.2.2.2.1 Bölme katsayısının belirlenmesi**

Bölme katsayısı bir maddenin birbirine karışmayan iki sıvı arasındaki faz dağılım dengesidir. Sentezlenen bileşiklerin bölme katsayılarının hesaplanması için %0.01’lik çözeltileri hazırlandı. Standart grafiklerinin çizilmesi için değişik konsantrasyonlara seyreltildi. Seyreltilen çözeltilerin UV-Vis Spektrofometre’de absorpsiyonları ve dalga boyları ölçüldü. Belli konsantrasyonda madde miktarı bilinen çözeltilerden 5 ml alındı. Üzerine eşit hacimde eter eklendi ve 5 dakikadan az olmamak

şartıyla ekstraksiyon yapıldı. Su fazının absorpsiyonu ölçüldü ve eter fazındaki eter uçurulup su eklenerek absorpsiyonu ölçüldü.

Eter ve su fazındaki maddenin konsantrasyonlarının bulunması için UV-Vis Spektrofometre’ de bulunan absorpsiyon ve dalga boyu değerleri excelde grafiğe geçirilerek absorpsiyon-konsantrasyon standart grafikleri çizildi ve bu grafik yardımıyla konsantrasyonlar hesaplandı.

### **3.2.2.3. İnhibitörlerin sudaki çözünürlüklerinin belirlenmesi**

Etkili bir inhibitörün suda iyi çözünmesi gerekmektedir. Bir inhibitörün sudaki çözünürlüğünü belirlemek için % 1’lik çözeltisi hazırlanmaktadır. Bu çözelti ile çözünürlük hesaplaması yapılır. Maddelerin çözünürlükleri 24.5<sup>0</sup>C’de 30 dakikadan az olmamak koşuluyla iyice çalkalanır. Süzme yapılarak çözünmeyen kısım alınarak hesaplama yapılır. Çözünürlük değeri g/100 ml şeklinde verilir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Sentezlenen Bileşiklerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması

#### 4.1.1. 4-(2-oksopirolidinil) benzensülfonamit (2)

Elde edilen bileşiğin yapısı IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR analizleri ile aydınlatılmıştır.

Bu reaksiyon sonucunda elde edilen madde belirli çözücülerde TLC'ye bakılarak ürün kısmında ürünün oluştuğunu belirten spot gözlenmiştir ve bununla birlikte safsızlık belirtisi gözlenmiştir. Safsızlık daha sonra etil alkolle kristallendirilerek giderilmiştir.

(2) nolu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri içerisinde alındı. Bu bileşiğin spektrumu Ek Şekil 1.1'de verilmiştir. 3324 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik N-H gerilmesinden kaynaklanan bir piktir. Alifatik C-H gerilmelerinden kaynaklanan pikler 2977.23, 2888.09 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. 1675.37 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik δ-laktam'daki karbonil grubun gerilmesinden kaynaklanan piktir. 1460, 1392, 1420 cm<sup>-1</sup>'de aromatik C-H gerilmesinden kaynaklanan piklerdir. 1334 cm<sup>-1</sup>'de C-N aromatik gerilmesinden kaynaklanır.

(2) nolu bileşiğin CDCl<sub>3</sub> (döteryumlukloroform) içerisindeki, <sup>1</sup>H NMR spektrumu Ek Şekil 2.1'de verilmiştir. 7.31 ppm'de çıkan pikler -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubundaki protonlardan kaynaklanan piklerdir. 7.87 ppm'de gözlenen pik aromatik protonlardan kaynaklanan piklerdir. 2.1, 2.5, 3.8 ppm'de gözlenen pikler ise ikinci aromatik halkadaki -CH<sub>2</sub> protonlarından kaynaklanır.

(2) nolu bileşiği DMSO içerisindeki, <sup>13</sup>C NMR spektrumu Ek Şekil 3.1'de verilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde, 139 ppm'deki pik SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubunun bağlı olduğu karbondan kaynaklanır. 144.9 ppm'de gözlenen pik SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubuna göre para konumundaki karbondan kaynaklanır. 126.8 ppm'de gözlenen SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubuna göre orto, 119.1 ppm'deki pik ise meta konumundaki karbonlardan kaynaklanır. 48.4 ppm'de gözlenen pik ikinci halkadaki C-N karbonundan kaynaklanır. 175 ppm'deki

pik ise ikinci halkadaki oksijene bağlı karbondan kaynaklanır. İkinci halkadaki karbonlardan kaynaklanan pikler 17.7- 32.8 ve 48.4 ppm'de gözlenmektedir.

#### 4.1.2. 4-(3-kloroasetilamino) – benzen sülfonamid (3)

Elde edilen bileşiğin yapısı IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR analizleri ile aydınlatılmıştır.

Bu reaksiyon sonucunda elde edilen madde belirli çözücülerde TLC'ye bakılarak ürün kısmında ürünün oluştuğunu belirten tek spot gözlenmiştir.

(3) nolu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri içerisinde alındı. Bu bileşiğin spektrumu Ek Şekil 1.2'de verilmiştir. 3325, 3209, 3133  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler N-H gerilmesinden kaynaklanan piklerdir. 2949  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik C-H (alifatik) gerilmesinden kaynaklanır. 1440 $\text{cm}^{-1}$ 'de aromatik C-H gerilmesinden kaynaklanan bir piktir. 1689  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik C=O gerilmesinden kaynaklanır. 1598, 1547  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler aromatik C=C gerilmelerinden kaynaklanır. 1405  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik C-N aromatik gerilmesinden kaynaklanır. 1187  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik  $\text{SO}_2$  asimetric gerilim pikidir. 1156  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik ise  $\text{SO}_2$  simetric gerilmesinden kaynaklanır. 781  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik C-Cl geriliminden kaynaklanır.

(3) nolu bileşiğin  $\text{CDCl}_3$  içerisindeki,  $^1\text{H}$  NMR spektrumu Ek Şekil 2.2'de verilmiştir. 7.3 ppm'de çıkan singlet pikler  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubundaki protonlardan kaynaklanan piklerdir. 7.74-7.81 ppm'de gözlenen pik aromatik protonlardan kaynaklanan piklerdir.  $-\text{CONH}$  protonundan kaynaklanan pik, 10.65 ppm'dir. 3.6 ppm'de gözlenen pik  $\text{CH}_2\text{Cl}$  protonlarından kaynaklanır.

(3) nolu bileşiğin DMSO içerisindeki,  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu Ek Şekil 3.2'de verilmiştir. Spektrum incelendiğinde, 139.4 ppm'deki pik  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubunun bağlı olduğu karbondan kaynaklanır. 141.8 ppm'de gözlenen pik  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubuna göre para konumundaki karbondan kaynaklanır. 127.2 ppm'de gözlenen  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubuna göre orto, 119.4 ppm'deki pik ise meta konumundaki karbonlardan kaynaklanır. 165.6 ppm'de gözlenen pik  $-\text{CONH}$  grubundaki karbondan kaynaklanır.

#### 4.1.3. 4-(3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino)benzen sülfonamit (4)

Elde edilen bileşimin yapısı IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR analizleri ile aydınlatılmıştır.

Bu reaksiyon sonucunda elde edilen madde belirli çözücülerde TLC ' ye bakılarak ürün kısmında ürünün oluştuğunu belirten tek spot gözlenmiştir.

(4) nolu bileşimin IR spektrumu KBr tabletleri içerisinde alındı. Bu bileşimin spektrumu Ek Şekil 1.3'de verilmiştir. 3347, 3320, 3110 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pikler N-H gerilmesinden kaynaklanan piklerdir. 2939 cm<sup>-1</sup> 'de gözlenen pik C-H (alifatik) gerilmesinden kaynaklanır. 1435 cm<sup>-1</sup>'de aromatik C-H gerilmesinden kaynaklanan bir piktir. 1666 cm<sup>-1</sup>'deki pik C=O gerilmesinden kaynaklanır. 1592, 1525 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pikler aromatik C=C gerilmelerinden kaynaklanır. 1435 cm<sup>-1</sup>'deki pik C-N gerilmesinden kaynaklanır. 1370 cm<sup>-1</sup>'deki pik SO<sub>2</sub> asimetric gerilimi ve 1185 cm<sup>-1</sup>'deki pik ise SO<sub>2</sub> simetric gerilmesinden kaynaklanır. 792 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik C-Cl geriliminden kaynaklanır.

(4) nolu bileşimin DMSO içerisindeki , <sup>1</sup>H NMR spektrumu Ek Şekil 2.3'de verilmiştir. 7.2-7.4 ppm'de çıkan pikler -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubundaki protonlardan kaynaklanan piklerdir. 7.83 ppm'de gözlenen pik aromatik protonlardan kaynaklanan piklerdir. -CONH protonundan kaynaklanan pik, 9.67 ppm'dir. 1.31 ppm'deki pik -CH<sub>3</sub> gruplarından kaynaklanır. 3.88 ppm'de gözlenen pik CH<sub>2</sub>Cl protonlarından kaynaklanır.

(4) nolu bileşimin CDCl<sub>3</sub> içerisindeki, <sup>13</sup>C NMR spektrumu Ek Şekil 3.3'de verilmiştir. Spektrum incelendiğinde, 139.1 ppm'deki pik SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubunun bağlı olduğu karbondan kaynaklanır. 142.4 ppm'de gözlenen pik SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubuna göre para konumundaki karbondan kaynaklanır. 126.8 ppm'de gözlenen SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubuna göre orto, 120.3 ppm'deki pik ise meta konumundaki karbonlardan kaynaklanır. 173.8 ppm'de gözlenen pik -CONH grubundaki karbondan kaynaklanır. 23.4 ppm'de gözlenen pik CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> grubundan kaynaklanan karbon pikidir.

#### 4.1.4. 4-(3-kloropropanoilamino) – benzen sülfonamit (5)

Elde edilen bileşiğin yapısı IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR analizleri ile aydınlatılmıştır.

Bu reaksiyon sonucunda elde edilen madde belirli çözücülerde TLC ‘ ye bakılarak ürün kısmında ürünün oluştuğunu belirten tek spot gözlenmiştir.

(5) nolu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri içerisinde alındı. Bu bileşiğin spektrumu Ek Şekil 1.4’de verilmiştir. 3344, 3229  $\text{cm}^{-1}$ ’de gözlenen pikler N-H gerilmesinden kaynaklanan piklerdir. 2972  $\text{cm}^{-1}$ ’de gözlenen pik C-H (alifatik) gerilmesinden kaynaklanır. 1451  $\text{cm}^{-1}$ ’de aromatik C-H gerilmesinden kaynaklanan bir piktir. 1675  $\text{cm}^{-1}$ ’deki pik C=O gerilmesinden kaynaklanır. 1500, 1533  $\text{cm}^{-1}$ ’de gözlenen pikler aromatik C=C gerilmelerinden kaynaklanır. 1402  $\text{cm}^{-1}$ ’deki pik C-N gerilmesinden kaynaklanır. 1372  $\text{cm}^{-1}$ ’deki pik  $\text{SO}_2$  asimetric gerilimi ve 1187  $\text{cm}^{-1}$ ’deki pik ise  $\text{SO}_2$  simetric gerilmesinden kaynaklanır. 726  $\text{cm}^{-1}$ ’de gözlenen pik C-Cl geriliminden kaynaklanır.

(5) nolu bileşiğin DMSO içerisindeki,  $^1\text{H}$  NMR spektrumu Ek Şekil 2.4’de verilmiştir. 7.27 ppm’de çıkan pikler  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubundaki protonlardan kaynaklanan piklerdir. 7.77-7.75 ppm’de gözlenen multipllet pik aromatik protonlardan kaynaklanan piklerdir.  $-\text{CONH}$  protonundan kaynaklanan pik, 10.53 ppm’dir. 3.89 ppm’de gözlenen pik  $\text{CH}_2\text{Cl}$  protonlarından kaynaklanır. 3.37 ppm’deki gözlenen pik ise  $-\text{COCH}_2$  protonlarından kaynaklanır.

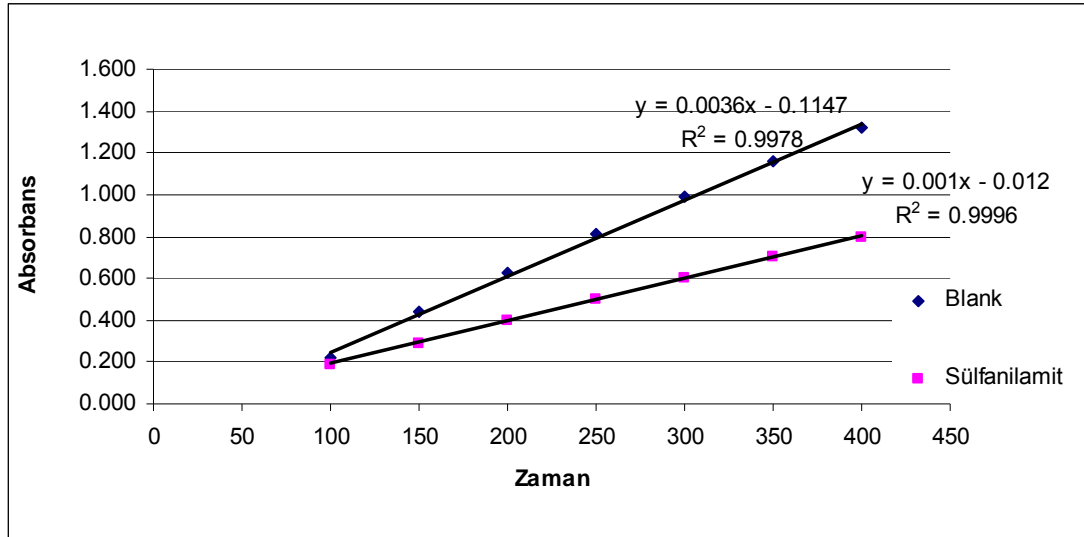
(5) nolu bileşiğin  $\text{CDCl}_3$  içerisindeki,  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu Ek Şekil 3.4’de verilmiştir. Spektrum incelendiğinde, 139.01 ppm’deki pik  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubunun bağlı olduğu karbondan kaynaklanır. 142.38 ppm’de gözlenen pik  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubuna göre para konumundaki karbondan kaynaklanır. 127.2 ppm’de gözlenen  $\text{SO}_2\text{NH}_2$  grubuna göre orto, 119.3 ppm’deki pik ise meta konumundaki karbonlardan kaynaklanır. 169.07 ppm’de gözlenen pik  $-\text{CONH}$  grubundaki karbondan kaynaklanır. 25.6 ppm’de gözlenen pik  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  grubundan kaynaklanan karbon pikidir.



#### 4.2. Biyolojik çalışma (*in vitro*) sonuçlarının değerlendirilmesi

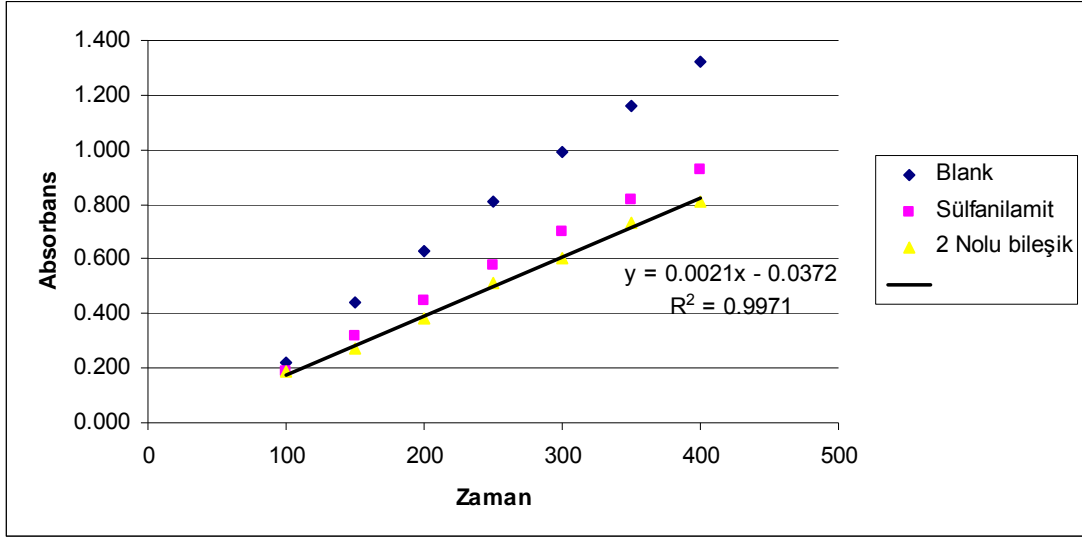
Bileşiklerin veya ilaçların aktiviteleri  $K_i$  yada  $IC_{50}$  değerleri ile ifade edilir.  $K_i$  değeri bileşiğin inhibisyon katsayısıdır.  $IC_{50}$  değeri ise enzimin %50'sini inhibe etmesi için gereken bileşiğin konsantrasyonudur.  $IC_{50}$  değerinin saptanması için Bovine karbonik anhidraz enzimi kullanılmıştır.  $IC_{50}$  değerlerinin saptanması 3. Bölümde detaylı olarak anlatılmıştır.

Elde ettiğimiz bileşiklerin inhibitör aktivitelerini saptamak amacıyla inhibitörsüz ortamda (blank), enzimin *p*- nitrofenil asetatı hidrolize ederek *p*- nitrofenol asetata dönüştürmesi bununla birlikte inhibitörlü ortamda da *p*-nitrofenil asetatı *p*-nitrofenol asetata dönüştürerek bu konsantrasyonun artmasına ve zamanla değişimi incelendi. Gözle görülebilen bu olayda enzim üzerine substratı eklenince inhibitörsüz ortamdakine göre daha fazla sarı renk gözlemlendi. Bunun yanında inhibitörlü ortamda ise daha az sarı renk gözlemlendi. Bu da inhibitörlerin enzime bağlanarak inhibe ettiğini kanıtlamıştır. Bu ölçümler UV-VIS spektrofotometresinde yapıldı.

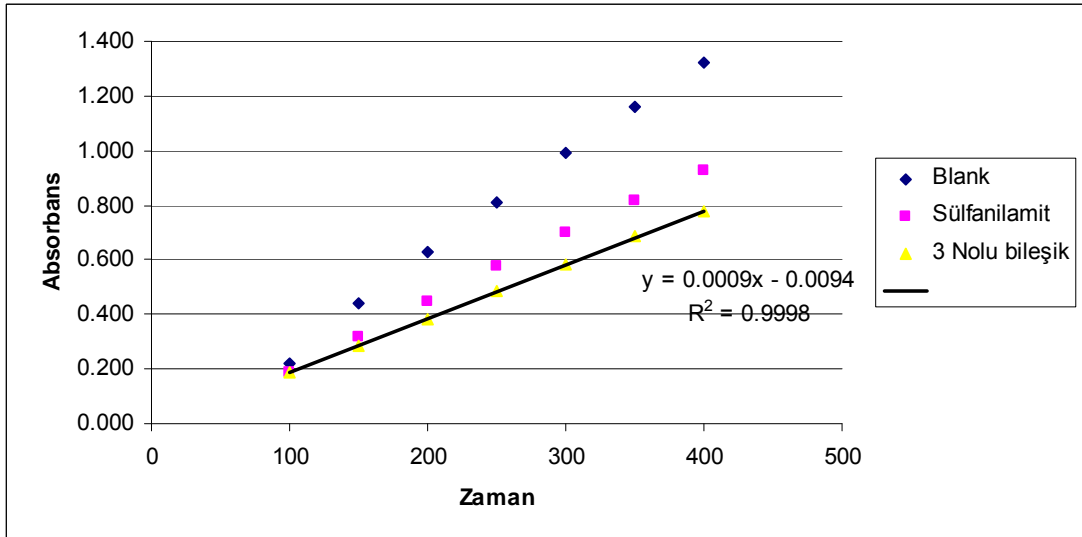


Şekil 4.1. *p*-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak blank ve sülfanilamitin absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması

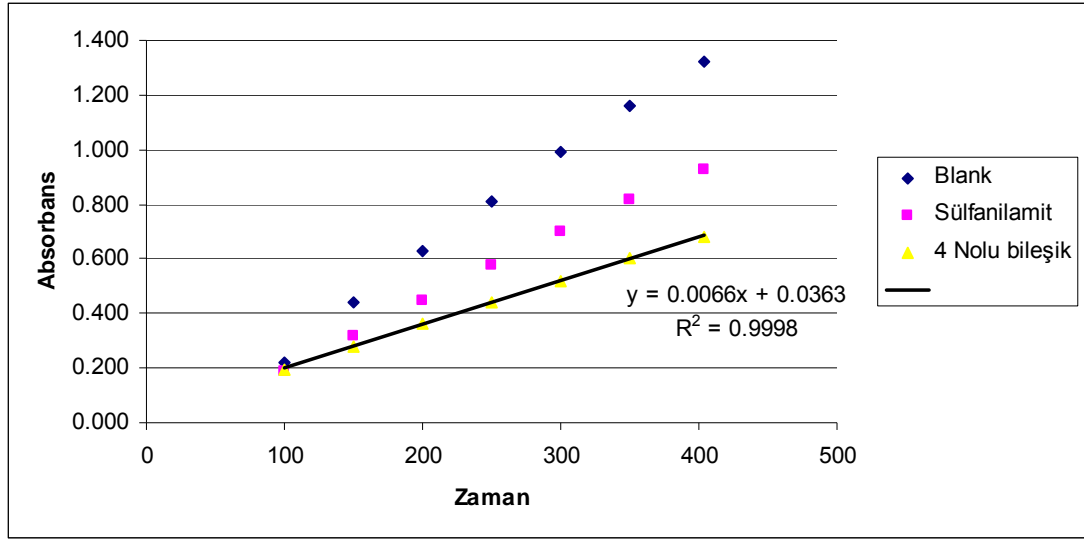
Şekil 4.1.'de gözleendiği gibi blank ortamında zamanla enzimin etkisiyle 400 nm'de p-nitro fenolasetat konsantrasyonu artarken; sülfanilamid ortamında aynı süre içerisinde absorbansının düştüğü yani aynı zamanda konsantrasyonun da düştüğünü gösterir. Bu da enzimle inhibitörün aynı ortamda bulunması halinde inhibe edildiğini kanıtlar.



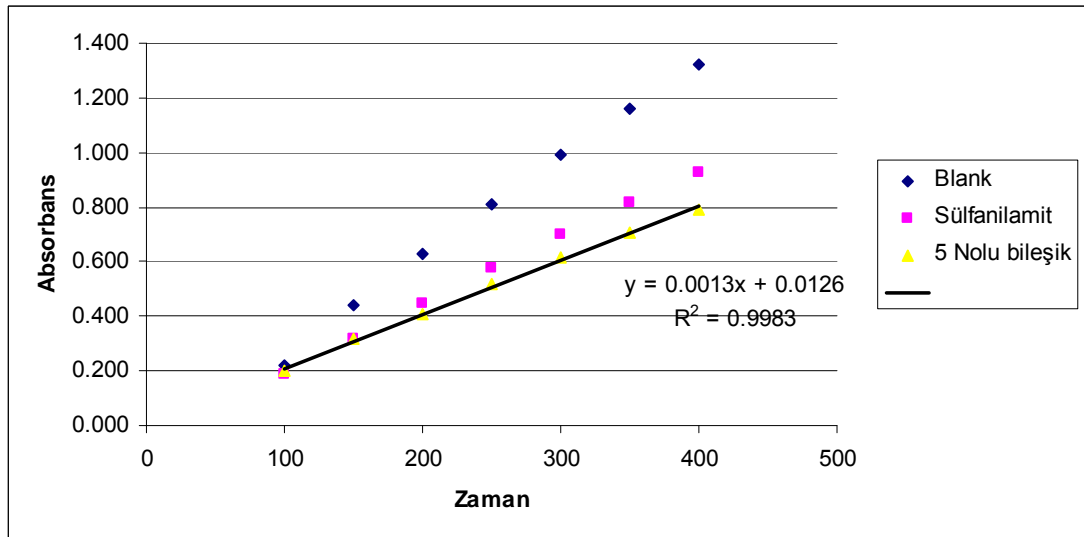
Şekil 4.2. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 2 nolu bileşiğin absorbans değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması



Şekil 4.3. p-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 3 nolu bileşiğin absorbans değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması



Şekil 4.4. *p*-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 4 nolu bileşik'in absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması



Şekil 4.5. *p*-nitro fenilasetatın enzim etkisiyle 400 nm'de zamana bağlı olarak sülfanilamid ve 5 nolu bileşik'in absorpsiyon değişiminin (inhibitör aktivitesinin) karşılaştırılması

Sentezlenen bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayıları ve inhibitör aktiviteleri araştırıldı.

Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin inhibitör aktiviteleri, bölme katsayıları ve sudaki çözünürlükleri

Bileşikler	Sudaki Çözünürlükleri g/100 cm <sup>3</sup>	Bölme katsayıları (P) pH=7.2	İnhibitör Aktiviteleri IC <sub>50</sub> (nM)
Sülfanilamit	0.75±0.01	0.082	72.2
2	0.15	0.99	119.9
3	0.3	0.436	66.6
4	0.5	1.2	69.4
5	0.1	0.37	78.3

İnhibitör aktivite sonuçları gösteriyor ki bir bileşiğin düşük IC<sub>50</sub> değerine sahip olması onun güçlü inhibe etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara bakıldığında 3 ve 4 nolu bileşiklerin sülfonamide yakın olduğu; 2 ve 5 nolu bileşiklerin ise inhibitör aktivitelerinin yüksek olduğu görülmektedir.

Sentezlenen bileşiklerin bölme katsayısı ölçümleri Hansch (1964) tekniği kullanılarak su-eter çözücü sisteminde incelenmiştir. Bu ölçüm sonuçlarına göre sentezlenen bileşiklerin bölme katsayısı değerleri 0.35-1.2 arasında değişmektedir. Tüm bileşikler göz içi dokulara iyi dağılım olması için gereken en az bölme katsayısı değeri olan 0.01'i aşmıştır. Bir bileşiğin etkili olması, güçlü inhibitör aktivitesinin yanı sıra iyi bir bölme katsayısı değerine sahip olmasını gerektirir Tabloya göre sentezlenen tüm bileşikler oldukça iyi bölme katsayısı değerlerine sahiptir.

Etkili enzim inhibitörü olarak bölme katsayısı ile inhibitör aktivitesi arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığının belirlenmesi için bölme katsayısı (P) ve IC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırılır. Sentezlenen bileşiklerin hesaplanan değerleri açıkça göstermektedir ki inhibitörler için IC<sub>50</sub> ve P arasında doğrusal bir ilişki yoktur. Sülfanilamitle yakın oranda IC<sub>50</sub> değerlerine sahip olan bileşiklere bakılırsa; 3 nolu

bileşigin bölme katsayısı 0.43, 4 nolu bileşigin bölme katsayısı 1, 2 ve 5 nolu bileşigin bölme katsayısı ise 0.37 dir. Görüldüğü gibi inhibitör aktiviteleri birbirlerine yakın değerlerde olsa da bölme katsayılarında oldukça farklılıklar görülmektedir. 2 nolu bileşiğe bakılırsa  $IC_{50}$  değeri 119.9 nM ve bölme katsayısı 0.99'dur. bu bileşik ise inhibitör aktivitesi düşük olmasına rağmen bölme katsayısının iyi olduğu görünüyor. Bu da bölme katsayısı ile  $IC_{50}$  değeri arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını gösteriyor.

Bileşiklerin inhibitör aktivitesi ve sudaki çözünürlükleri arasında doğrusal bir ilişkinin bulunmadığı söylenebilir. Suda daha iyi veya daha az çözünen bir bileşigin daha iyi inhibitör olduğuna dair yorum yapılamaz. 4 nolu bileşigin inhibitör aktivitesi 3 nolu bileşiğe göre daha düşük olmasına rağmen çözünürlüğünün daha yüksek olduğu görünüyor. Bununla birlikte 2 ve 4 nolu bileşiklere bakıldığında inhibitör aktivitelerinin ve sudaki çözünürlüklerinin de düşük olduğu iyi birer inhibitör olmadıklarını söyleyebiliriz.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Karbonik anhidraz enziminin 1932 yılında Meldrum ve Raughton tarafından keşfinden sonra değişik aromatik ve heterohalkalı sülfonamidler sentezlenmiş ve glokom tedavisi için kullanılmıştır. Bunlar arasında heterohalkalı bileşiklerin güçlü karbonik anhidraz inhibitörleri oldukları bilinmektedir. Bu çalışmamızda şu anda kullanılan karbonik anhidraz inhibitörlerinden daha güçlü bileşikler sentezlemesi amaçlanmaktadır.

Sentezlenen bileşiklerin yapıları FT-IR, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin inhibitör aktiviteleri (*in vitro*) ölçülerek, biyolojik aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sentezlenen bileşiklerden 3 ve 4 nolu bileşikler sülfanilamitten daha iyi inhibitör aktivitesine sahipken; 2 ve 5 nolu bileşikler daha düşük inhibitör aktivitesine sahiptir. 7 nolu bileşik ise 5-amino 1,3,4 tiyadiazol sülfonamid bileşiğine göre daha düşük inhibitör aktivitesine sahiptir.

Sentezlediğimiz bileşiklerin glokom tedavisinde kullanma amacı olduğu için bileşiklerin *in vivo* çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarla elde edilen sülfanilamid ve asetazolamitten türetilen bileşiklerin, antiobezit, antikanser, antibakteriyel, antiAIDS, karbonik anhidraz inhibitörü ve antitümör olmak üzere birçok özellik taşıdıkları görülmektedir. Bu da bu bileşiklerin ne derece önemli olduklarını göstermektedir.

Bu nedenle sülfanilamid ve asetazolamid türevlerinden yeni bileşiklerin sentezlenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- ALZUET,G;FERRER,S;BORRAS,J;SUPURAN,C.T., 1994, Roum Chem.Quart.Rev, ,2,283.
- AMERİCAN Health asistance Foundation, 2005. Glaucoma.http/www.ahaf.org./glaucoma/about glaout\_body.htm.
- BADGER, M. R., and PRICE, G. D., 1994. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 45:369-392.
- BÜLBÜL. M., Saraçoğlu N.,Küfrevioğlu Ö.İ., Çiftçi,M, Bioorganic and medicinal
- BRIGANTI,F., TİLLİ S., MENABUONİ L.,SUPURAN C.T. Carbonic Anhydrase Inhibitors,2000;15;185-200
- BRIGANTI ve arkadaşları,1997.
- CEDRİC,C.R.and ALAN ,M.R., 1992. Textbook of Pharmacology. Little, Brown and Company, USA 1213 s.
- DİPHALMA,J.AKCASU,A.,ÖZÜNER,Z.,EŞKAZAN,E.,2000,Temel Tıp Farmakolojisi (Basic Pharmacology in Medicine) 276-280s.
- DÖKMECİ, İ., 1996. Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitabevi, 1. Baskı, İstanbul, 976
- DÖKMECİ, İ., 1992. Farmakoloji. Saray Kitabevleri, İstanbul, 925s.
- DÖKMECİ, İ., 1985. Farmakoloji. Beta Basım ve Yayım, 2. Baskı, 1136s,İstanbul
- DÖKMECİ A, Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar. Cilt II,Gazi Üniversitesi,180s.
- DODGSON, S. J., TASHIAN, R. E., GROS, G., and CARTER, N. D., 1991. The Carbonic Anhydrases. Cellular Physiology and Molecular Genetics. Plenum Press, New York, pp.297–306.,
- FLAMMER ,J, Yaycıoğlu,R., Dabil H. (çeviri) Glokom (2003)
- GOODSELL, D. S., and DUTTA, S., 2004. PDP Molecule of the Month: Carbonic Anhydrase, [www.rcsb.org/pdp/molecules/pdp49\\_1.html](http://www.rcsb.org/pdp/molecules/pdp49_1.html).
- GROS, G., and DODGSON, S. J., 1988. Velocity of CO<sub>2</sub> Exchange in Muscle andRiver, Annu.Rev.Physiol.50:669-694.
- İLİES M.A, SCOZZAFAVA,A.;SUPURAN,C.T. 2000, Metal Based Drugs, 7,57. Prof.Dr. İSMET DÖKMECİ,1998, Farmakoloji, Nobel Tıp Kitapevi,978.
- J.G FRIEDENWALD,Br. J. Opththal., 1994,28,503
- KAYAALP, O. Rasyonel Tedavi Tıbbi Farmakoloji, Cilt I, Ankara 2001
- KAYAALP, O. 1978, Rasyonel Tedavi Tıbbi Farmakoloji, Cilt I, Ankara.
- KAYAALP, O. 2001, Rasyonel Yönden Tıbbi Farmakoloji, Cilt I, Ankara 1726.
- KEHA,E,E, ve KÜFREVIÖĞLU ,Ö.İ. Biyokimya Aktif Yayınları İstanbul,2000,97-125.
- KUTAY,A, <http://Sayici.freeservers.glokom.htm>, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı.

- LESBURG, C.A., and CHRISTIANSON D.W., 1995. X-RAY Crystallographic Studies Oengineered Hydrogen-bond Network In Protein-Zinc Binding-site. *Journal of The American Chemical Society*, 117:6838-6844.
- LYNCH, C. J., BRENNEN, W. A., VARY, T. C., CARTER, N., and DODGSON, S. J., 1993. Carbonic Anhydrase III in Obese Zucker Rats. *American Journal of Physiology*, 264:E621-E630.
- M. BRUCE SHIELDS, *Text book of Glaucoma*, 2nd ed, 416
- MAREN, T. H., 1967. Carbonic Anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. *Physiological Reviews*, 47:595-781.
- MAREN, T. H., JANKOWSKA, L., SANYAL, G., and EDELHAUSER, H. F., 1983. The Transkorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion. *Exp. Eye. Res.*, 36:457-480.
- MAREN,H. 1994. The Development of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Journal of Glaucoma*, 4:49-62
- MAREN, T. H., 1967. Carbonic Anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. *Physiological Reviews*, 47:595-781.
- MICHAUD,J. FRIREN,B. And The International Brinzolamide Adjunctive Study Group.,2001. Comparison of Topical 1% and Dorzolamide 2% Eye Drops Given Twice Daily in Adition to Timolol 0.5% in Patients with Primary Open Angel Glaucoma and Ocular Hypertension. *American Journal of Ophthalmology*, 132(2):235-243
- ORAĞLI, K. M., 2001. *Klinik Oftamoloji*. Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, 65s. *Farmasotik Teknolojileri*,2000,977,978s.
- ÖZÇETİN, H., 2001. *Göz Tansiyonu ve Glokomlar*, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 127s. *Gazi Üniversitesi , Ankara 2000, Farmasotik Teknolojisi*,148.
- POCKER, Y., and JOAN, S. Y., 1974. Plant Carbonic Anhydrase, Hydrase Activitiy and Its Reversible Inhibition. *Biocehm.*, 13:5116-51120.
- POCKER, Y., and SARKANEN, S., 1978. Carbonic Anhydrase: Structure, Catalytic Versatility and Inhibition. *Adv. Enzymol*, 47:149-247.
- POCKER, Y., and JANJIC, N., 1989. Molecularity of Water In Enzymic Catalysis. Application To Carbonic Anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111:731-733.
- POLYA, J.B., and WIRTZ, A.J., 1965. Studies On Carbonic Anhydrase-II. Occurence of the Enzyme In Some Invertebrates. *Enzymologia*, 29(1):27-37.
- POSTERAK, J., PASTOREKOVA, S., CALLEBAUT, I., MORNON, J. P., ZELNIK, V., OPAVSKY, R., ZATOVICOVA, M., LIAO, S., PORTETELLE,D., STANBRIDGE, E. J., ZAVADA, J., BURNY, A., and KETTMANN, R., 1994. Cloning and Characterization of MN, a Human Tumor-Associated Protein with a Domain Homologous to Carbonic Anhydrase as a Putative Helix-Loop-Helix DNA Binding Segment. *Oncogene*, 9:2877-2888.
- RASENBERG,et.all, 1998,Combination of systemic Acetazolamide and Topical Dorzolamide in reducing/ Intraocular Pressure and Aqueous Humour Formation,105,88-93.
- RENZİ,G,SCAZZAFAVA,A and SUPURAN C.T, Carbonic Anhydrase Inhibitors; *Bioorg. Med. Chem. Italy* 2000



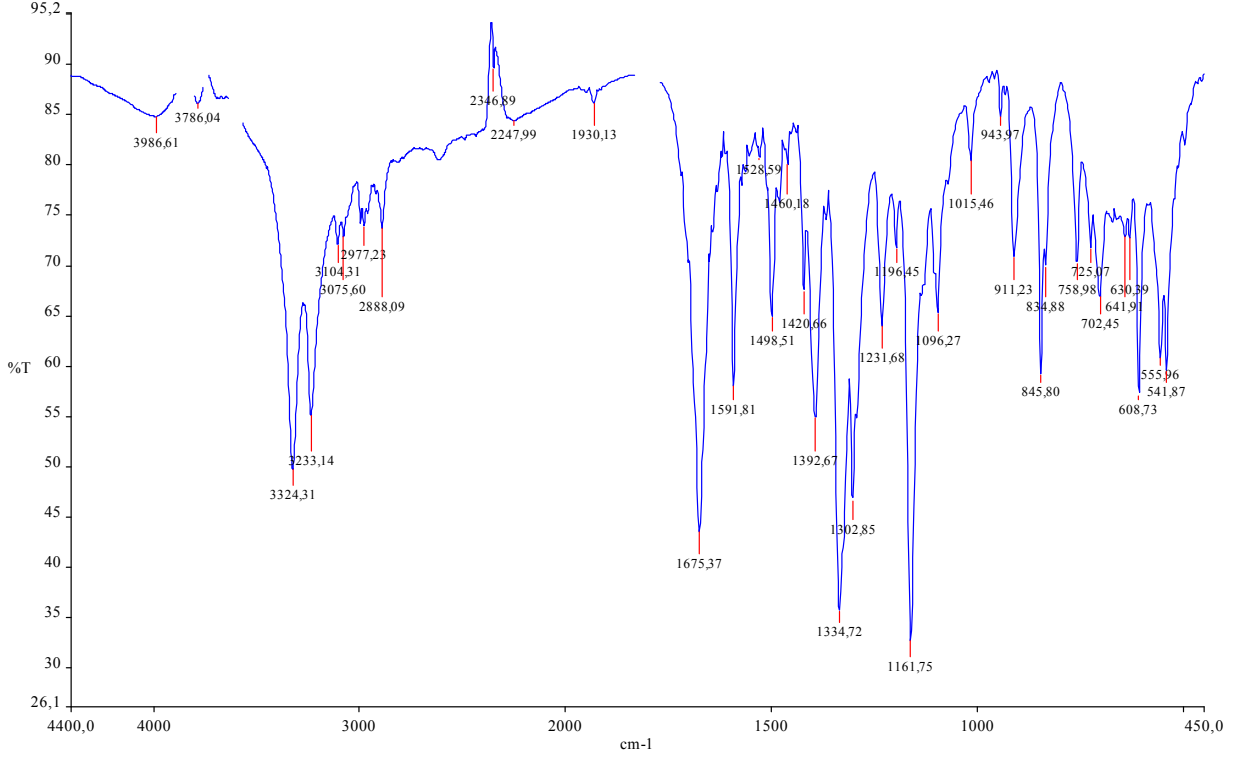
- ROWLETT, R. S. CHANCE, M. R., and WIRT, M. R., 1994. Kinetic and Structural Characterization of Spinach Carbonic Anhydrase. *Biochemistry*, 33:13967-13976.
- SCOZZAFAVA, A., MASTROLORENZO, A., SUPURAN, C. T., 2006. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. 1627-1640.
- SOYLU, T., 2001. Göz Hastalıkları ve Cerrahisi. [http://goz.gen.tr/web/h\\_glokom](http://goz.gen.tr/web/h_glokom)
- SUPURAN, C. T., and SCOZZAFAVA, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1:61-97.
- SUPURAN, C. T., 2003. Indisulam: An Anticancer Sulfonamide in Clinical Development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12:283-287.
- SUPURAN C.T. 1992, *Rev. Roum Chim.*, 37 849.
- SUPURAN.C.T. MANOLE, G., 1993, *ANDRUH, M.J. Inorg Biochem*, 49, 97.
- SUPURAN C.T., 1992, *Rev. Roum Chim.*, 37, 849.
- SUPURAN C.T.; MINCION, E., F.; SCOZZAFAVA, A.; ILIES M.A. *Eur. J.* 1998, *Med Chem.*, 33, 247.
- ŞAFAK, C, Ertan, M. Dalkara, S. 1991. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Anabilim Dalı Yayınları. 943.
- ŞİMŞEK E., 1992, *Farmakolojisi*, 245
- T.MANN, D. Keilin, *Nature*, 1940, 146, 164

## **ÖZGEÇMİŞ**

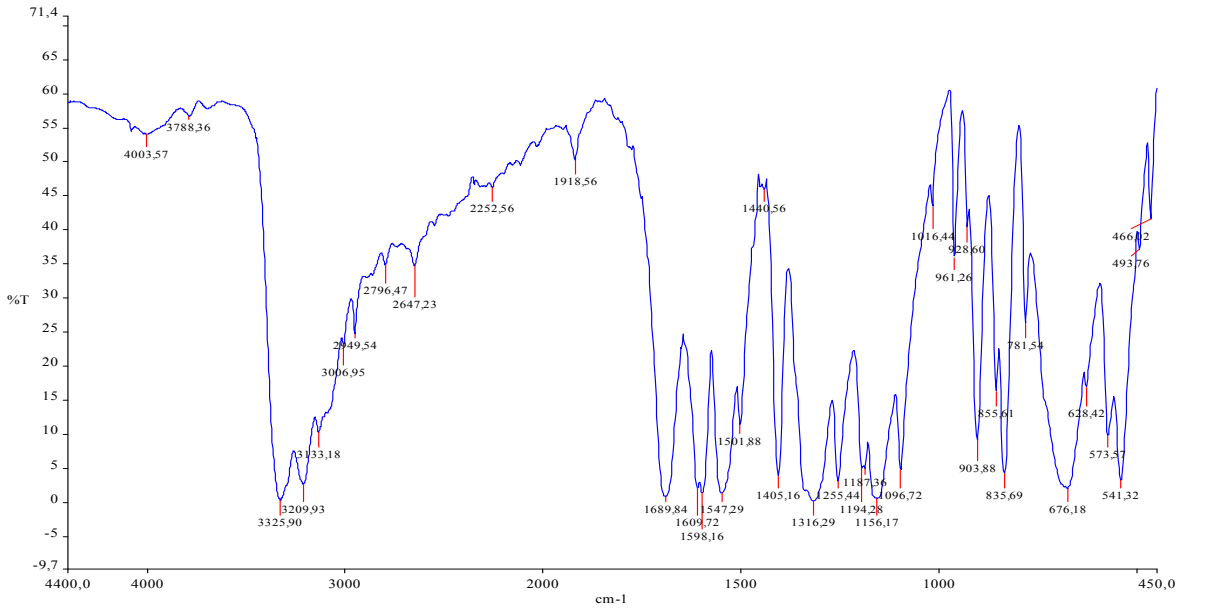
1984 yılında Şanlıurfa'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şanlıurfa'da tamamladı. 2002 yılında Harran Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde üniversite öğrenimine başladı. 2006 yılında mezun oldu. 2006-2007 bahar döneminde Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. Şuan özel bir şirkette, Harranova Besi ve Tarım Ürünleri A.Ş Tarımsal Analiz Laboratuvarı'nda Kimyager olarak çalışmaktadır.

## EKLER

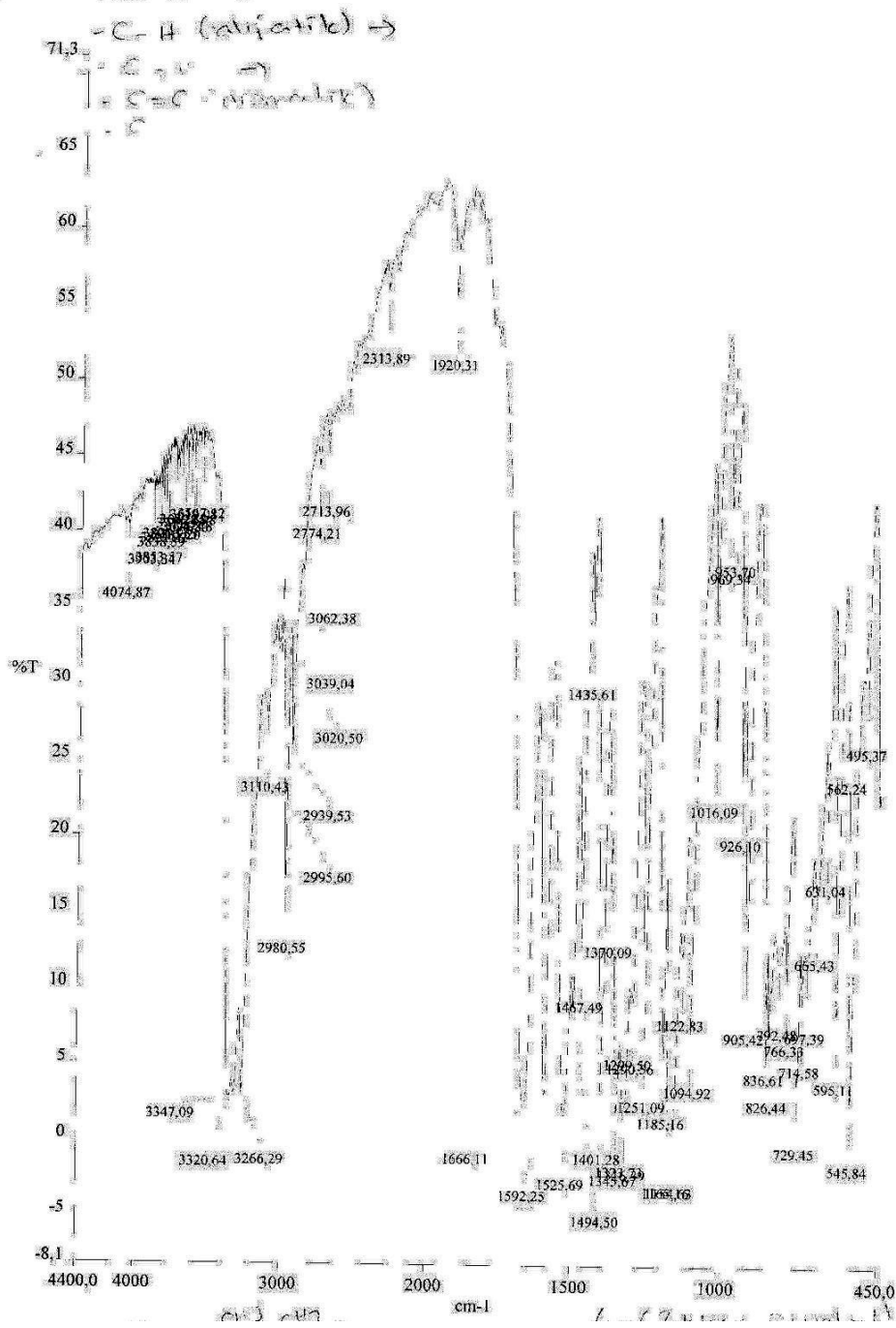
### EK1 Sentezlenen Bileşiklerin FT IR Spektrumları



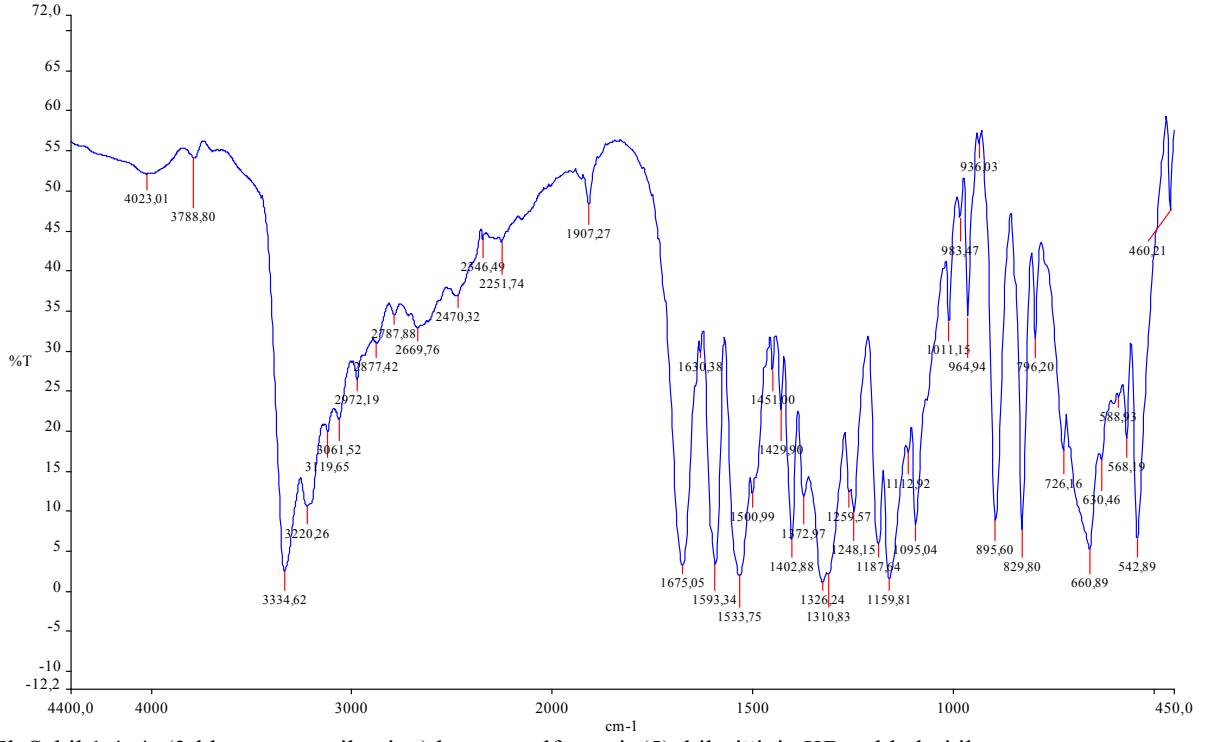
Ek Şekil 1.1.4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamit (2) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu



Ek Şekil 1.2. 4-(kloroasetilamino) benzen sülfonamit (3) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu



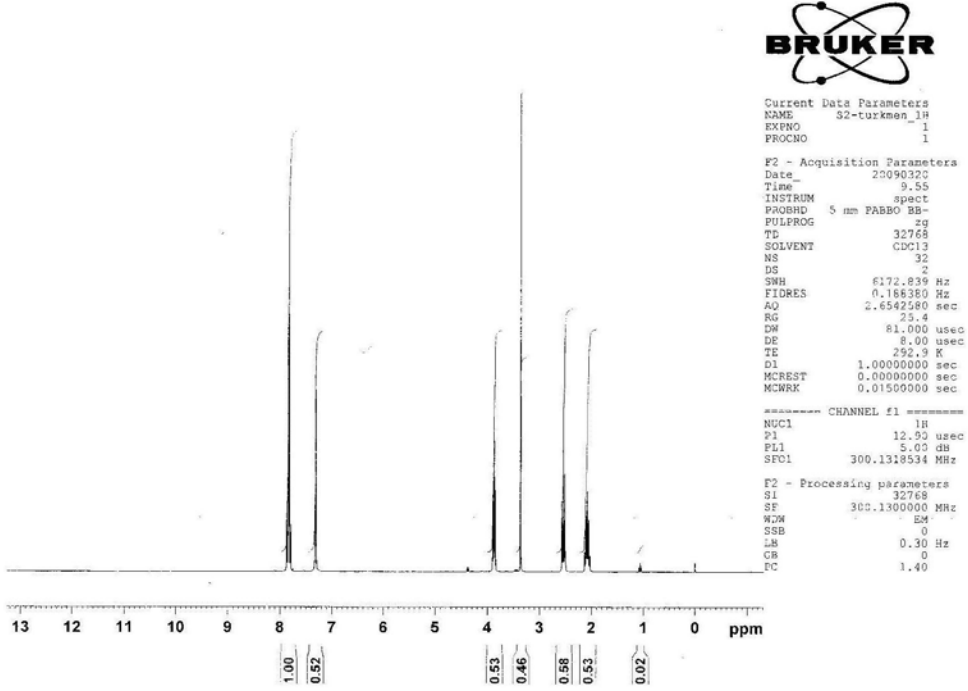
Ek Şekil 1.3. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spekturumu



Ek Şekil 1.4. 4- (3-kloropropanoamino) benzen sülfonamid (5) bileşiğinin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spekturumu

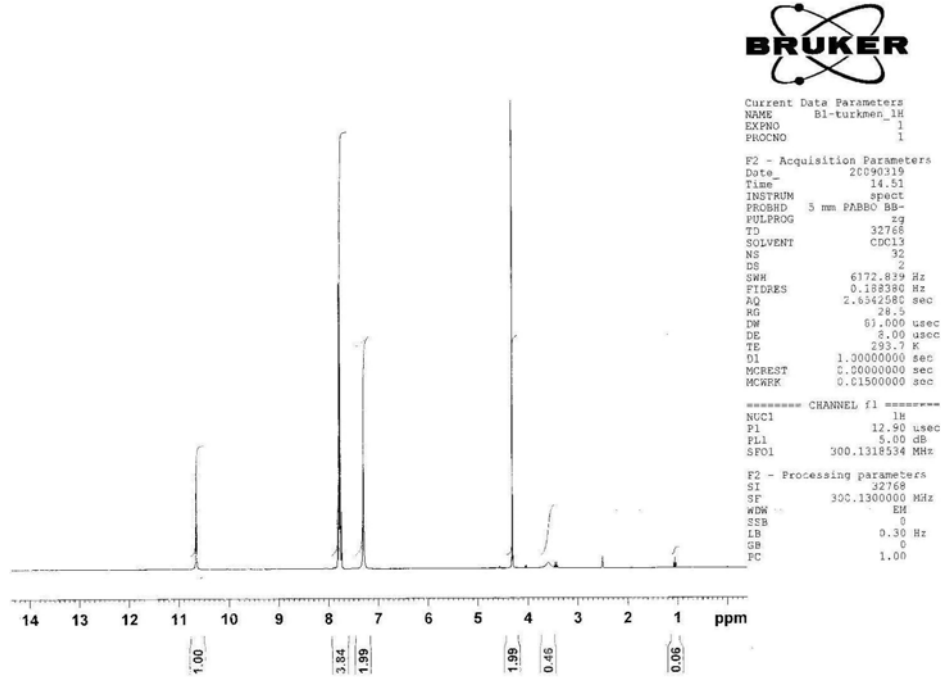
## EK2 Sentezlenen Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR Spektrumları

S2\_1H



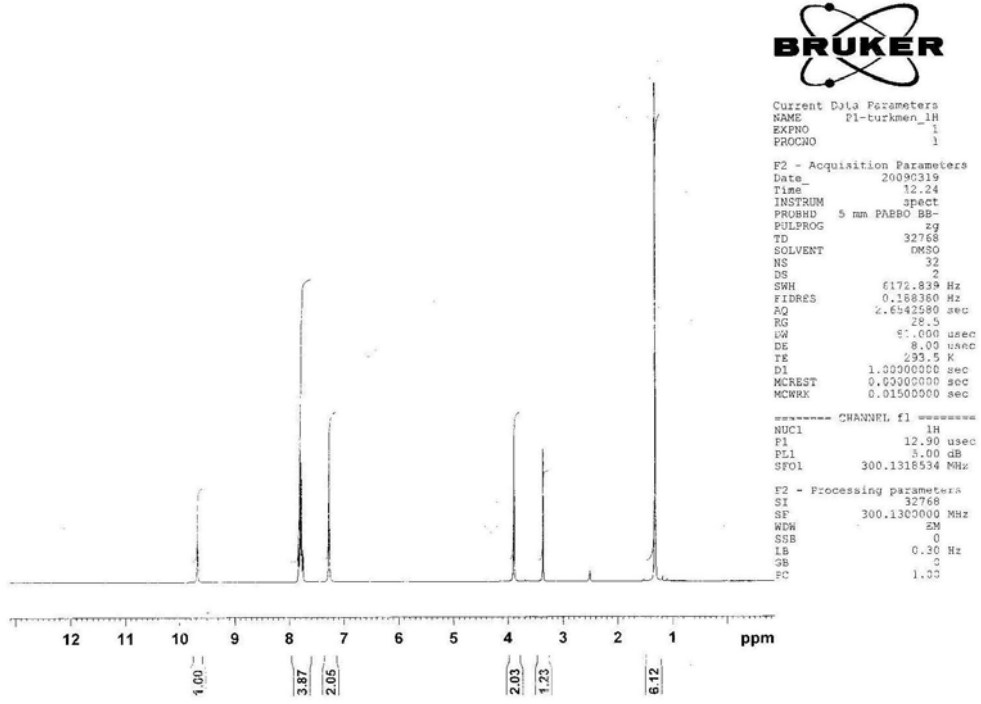
Ek Şekil 2.1.4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamit (2) bileşiğinin CDCl<sub>3</sub> içerisinde alınan <sup>1</sup>H NMR spekturumu

B1\_1H



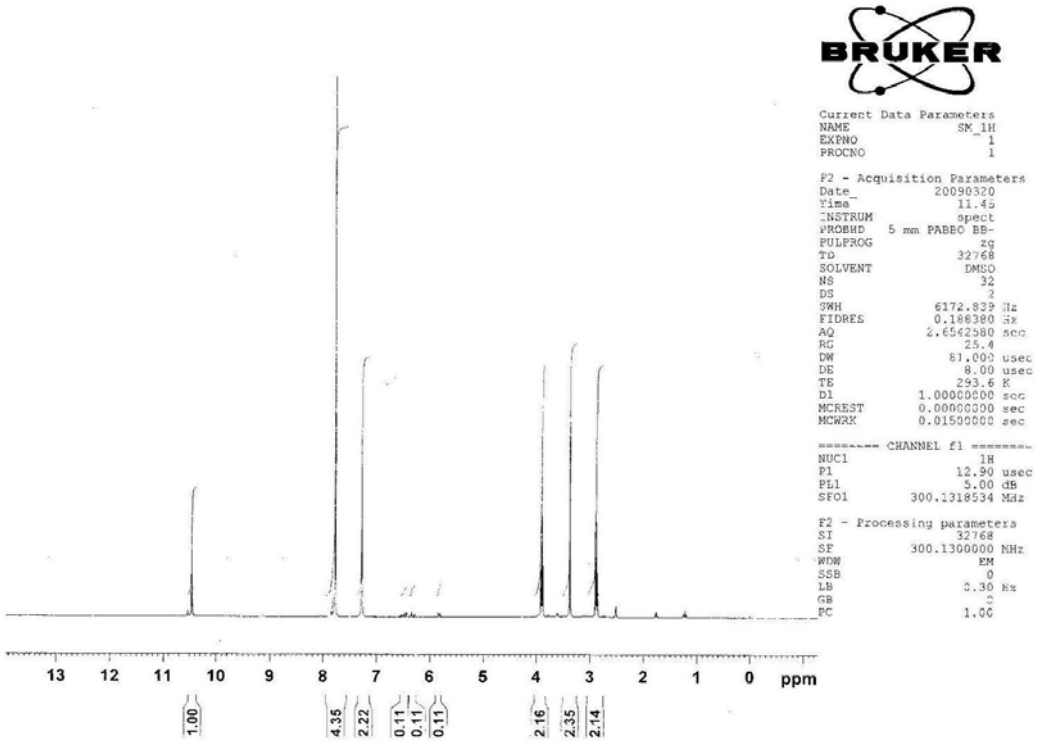
Ek Şekil 2.2. 4-(kloroasetilamino) benzen sülfonamit (3) bileşiğinin CDCl<sub>3</sub> içerisinde alınan <sup>1</sup>H NMR spekturumu

F1\_1H



Ek Şekil 2.3. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşiminin DMSO içerisinde  $^1\text{H}$  NMR spekturumu

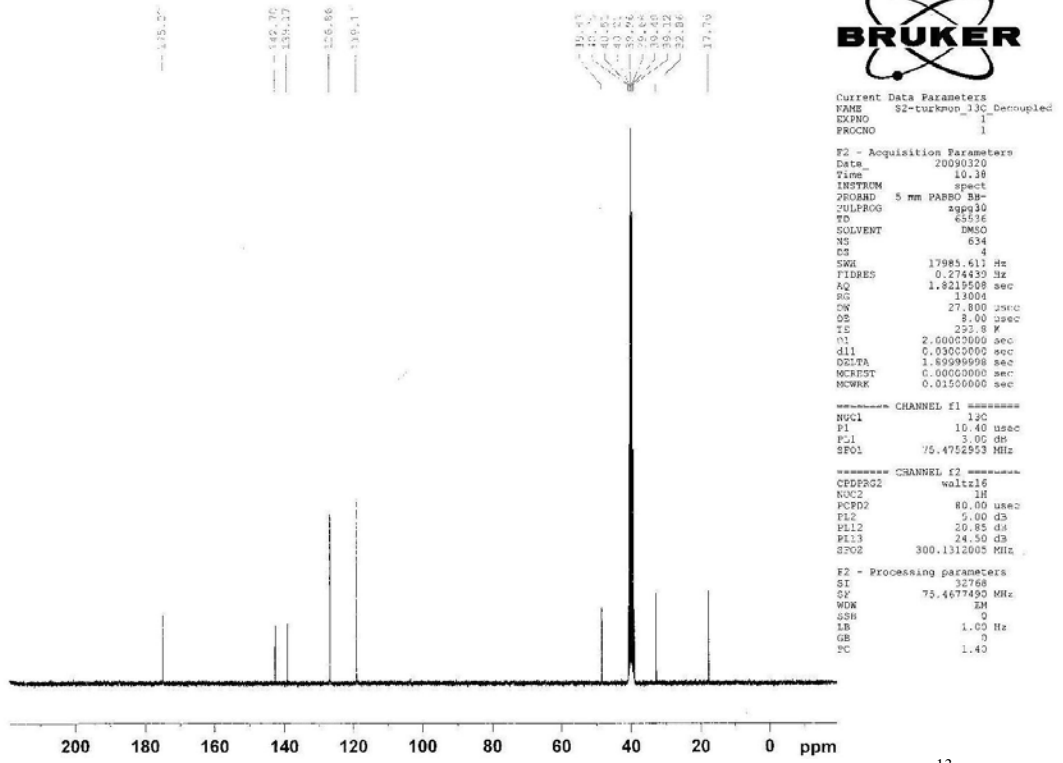
SM\_1H



Ek Şekil 2.4. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (5) bileşiminin DMSO içerisinde  $^1\text{H}$  NMR spekturumu

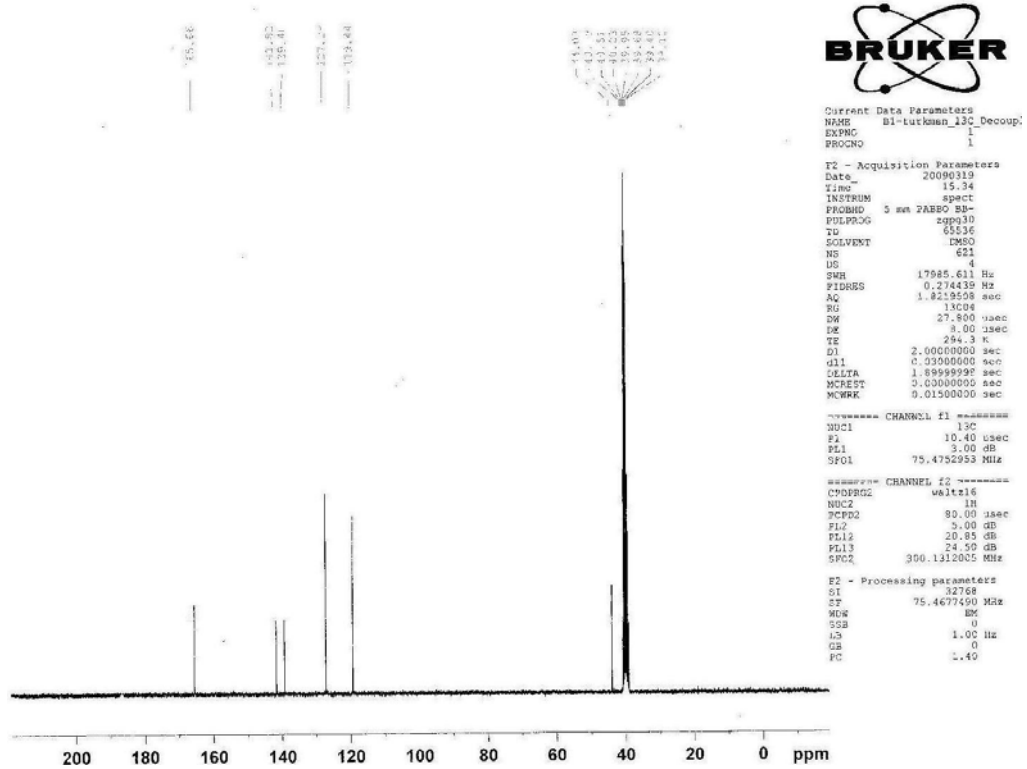
## EK 3 Sentezlenen Bileşiklerin $^{13}\text{C}$ NMR Spektrumları

S2\_13C\_Decoupled



Ek Şekil 3.1.4-( $\delta$ -laktamamino) benzen sülfonamit (2) bileşiğinin DMSO içerisinde alınan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunu

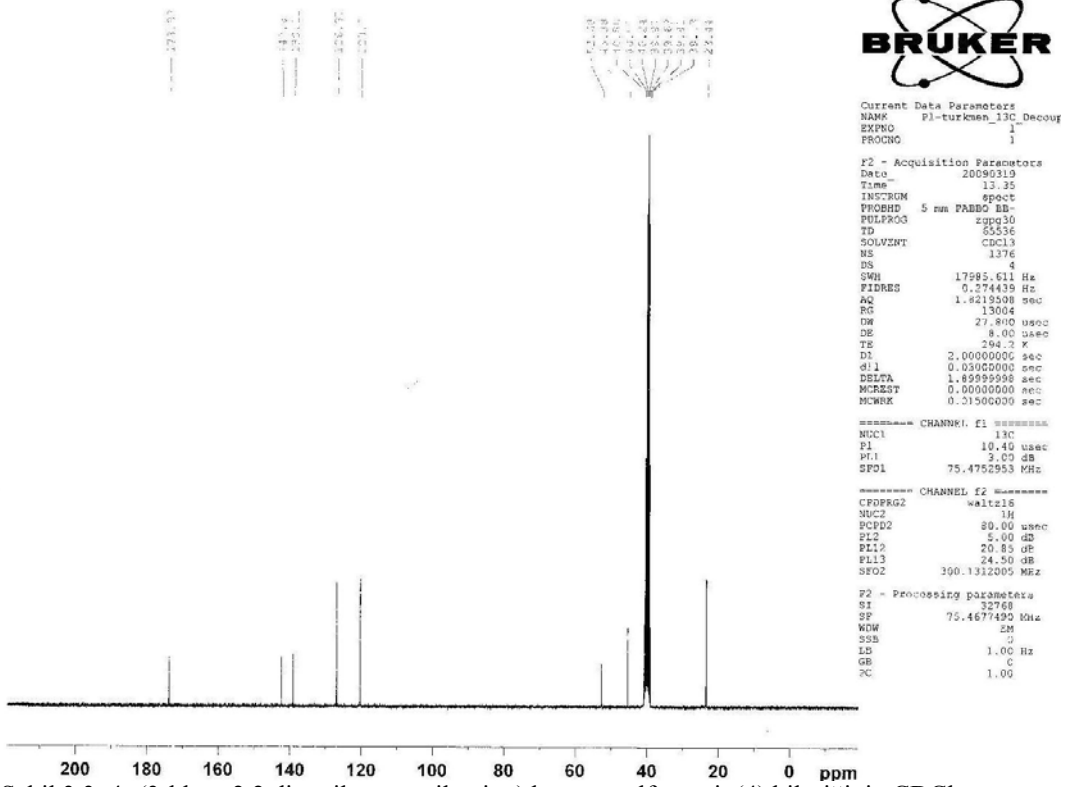
S1\_13C\_Decoupled



Ek Şekil 3.2. 4-(kloroasetilamino) benzen sülfonamit (3) bileşiğinin DMSO içerisinde alınan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunu

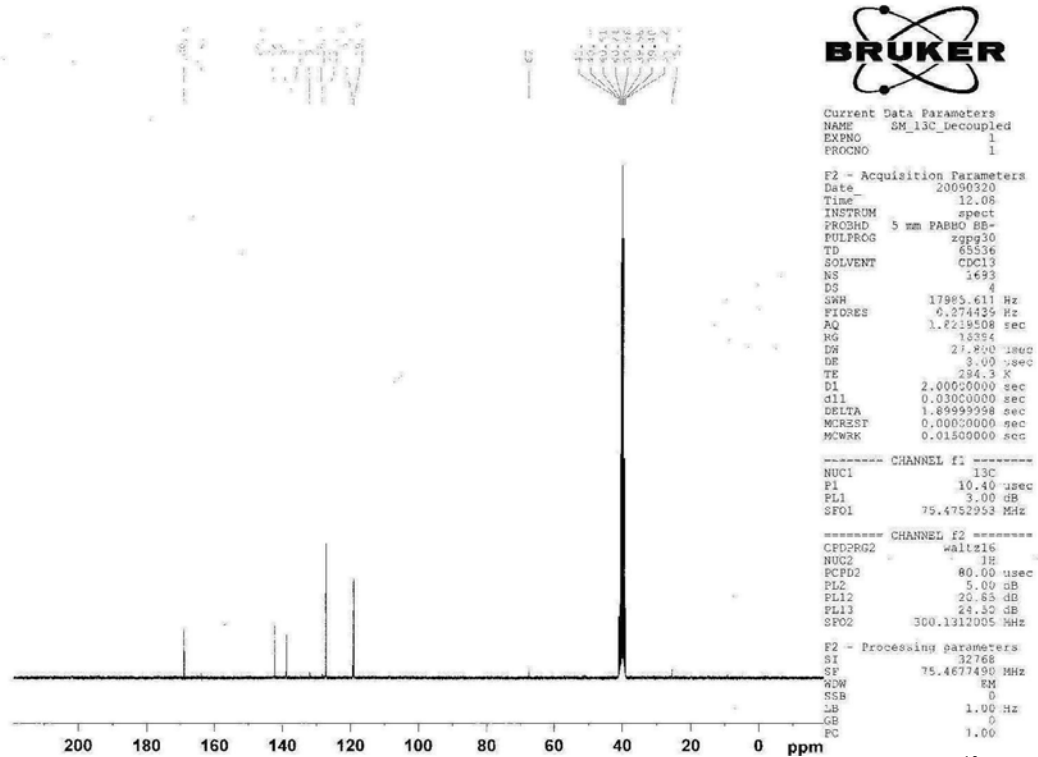


PI\_13C\_Decoupled



Ek Şekil 3.3. 4- (3-kloro 2,2 dimetilpropanoilamino) benzen sülfonamit (4) bileşiğinin CDCl<sub>3</sub> içerisinde <sup>13</sup>C NMR spekturumu

SM\_13C\_Decoupled



Ek Şekil 3.4. 4- (3-kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (5) bileşiğinin CDCl<sub>3</sub> içerisinde <sup>13</sup>C NMR spekturumu

## ÖZET

Glokom çağımızın en büyük göz hastalıklarından biri olan göz rahatsızlığıdır. Dünya’da en sık kalıcı görme kaybı nedenlerinden biridir. Sadece Türkiye’de risk altında olan yaklaşık 2 milyon kişinin olduğu sanılmaktadır. Körlüğe yol açan hastalıkların başında gelmesi nedeniyle önemli bir toplum sağlığı sorunu yaratmaktadır. 40 yaşın üzerindeki kişilerde yaklaşık olarak her 40 kişiden 1’inde görülür ve hastalığın ortaya çıktığı 20 kişiden 1’inde her iki gözde de kalıcı görme kaybına neden olur.

Bu çalışmanın amacı glokom tedavisi için kullanılabilir yeni sülfonamid ve asetazolamid türevleri sentezlenmesi ve bu bileşiklerin inhibitör aktivitelerinin *in vitro* incelenmesidir. Bu amaçla 2 yeni bileşik sentezlenmiştir. Bunlar 4-(2-oksopirolidinil) benzensülfonamid ve 2-(2' oksozetidinil) 1,3,4 – tiyadiazol 5-sülfonamid bileşikleridir.

Reaksiyon takibi için ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Sentezlenen maddelerin saflaştırılması için kristallendirme ve kolon kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra bu maddelerin yapısının aydınlatılması için Infrared Spektroskopisi (IR) ve Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (<sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR) sonuçları incelenmiştir.

Ayrıca sentezlenen bileşilerin inhibitör aktiviteleri (*in vitro*) (IC<sub>50</sub>) UV-VIS spektrofotometre ile ölçülmüştür. Bileşikler sülfanilamitten daha düşük aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin bölme katsayısı ölçümleri yapılmıştır. Aynı zamanda oda koşullarında saf sudaki çözünürlükleri ve erime noktaları saptanmıştır.

## SUMMARY

Glaucoma is an optical disease which is one of the most acute illness in this era. It is one of the most common reasons of losing optic sense. It is supposed that just in Turkey, there are almost 2 million people who are under risk. Due to being the most effective disease which can cause blindness, Glaucoma builds issue of society health. It is seen about 1 in 40, over 40 aged persons and the people 1 in 20 who is diseased, Glaucoma causes permanent losing of optic sense for the both two eyes.

The objective of this project is synthesis and investigation of biological activities of novel sulfonamide and acetazolamides for glaucoma therapy. Two new compounds, which are 4-(2-oxopyrrolidinyl) benzenesulfonamide and 2-(2'-oxoazetidinyl) 1,3,4-tiazol-5-sulfonamide, were synthesised for this purpose.

Thin layer chromatography method was used to understand whether the reaction completed or not. Crystallisation and column chromatography method was used for the purification of the synthesised compounds. After purification, the synthesised compounds were characterised by IR and NMR.

In addition, in vitro inhibitor activities ( $IC_{50}$ ) of the synthesised compounds were investigated by using UV-VIS spectrophotometer.  $IC_{50}$  results show that inhibitor activity of these compounds are lower than sulfanilamide. Partition coefficients of the synthesised compounds were studied. At the same time, water solubility and melting point of synthesised compounds were done.