

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YENİ KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİ SENTEZİ VE *İN VİTRO*
İNHİBİTÖR AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Mustafa GÜMÜŞ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2008**

Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKMEN danışmanlığında, Mustafa GÜMÜŞ'ün hazırladığı “Yeni Karbonik Anhidraz İnhibitörleri Sentezi ve *in vitro* İnhibitör Aktivitelerinin İncelenmesi” konulu bu çalışma 22/01/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKMEN

Üye: Doç. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZDEN

Bu Tezin Kimya Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof.Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No:781

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki Hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	3
2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı	5
2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	9
2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Metabolizmadaki Yeri	13
2.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	14
2.5.1. Etki mekanizması	14
2.5.2. Yan etkileri	15
2.6. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması	18
2.6.1. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri	18
2.6.1.1. Asetazolamit	18
2.6.1.2. Metazolamit	19
2.6.1.3. Diklorfenamit	19
2.6.2. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri	19
2.6.2.1. Dorzolamit	20
2.6.2.2. Brinzolamit	20
2.7. Karbonik Anhidraz İnhibisyonu	20
2.8. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Kullanım Alanları	21
2.9. Sülfonamidler ve Özellikleri	22
2.10. Glokom	26
2.10.1. Glokom hastalığı (göz tansiyonu) nedir?	26
2.10.2. Belirtileri	27
2.10.3. Glokomun sınıflandırılması	28
2.10.3.1. Primer glokom	28
2.10.3.2. Konjenital glokom	35
2.10.3.1. Sekonder glokomlar	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler	37
3.1.2. Kullanılan cihazlar	37
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	38
3.2. Yöntem	39
3.2.1. Sentez	39
3.2.1.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1)'in sentezi	39
3.2.1.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (2)'nin sentezi	40
3.2.1.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (3)'ün sentezi	41
3.2.1.4. 4-(metakriloilamino)-benzen sülfonamid (4)'ün sentezi	42
3.2.1.5. 4-(akriloilamino)-benzen sülfonamid (5)'in sentezi	43
3.2.1.6. 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid (6)'nın sentezi	44
3.2.1.7. 2-(akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid (7)'nin sentezi	45
3.2.2. Biyolojik çalışma	45
3.2.2.1. Bölme katsayısı ölçümü	46
3.2.2.1.1. Bölme katsayısının belirlenmesi	46
3.2.2.2. İnhibitörlerin sudaki çözünürlüklerinin hesaplanması	46
3.2.2.3. Sentezlenen bileşiklerin IC ₅₀ değerlerinin hesaplanması	47
3.2.2.4. Tampon çözeltinin hazırlanması	47

3.2.2.5. Substrat ve enzim solusyonunun hazırlanması	47
3.2.2.6. IC ₅₀ değerinin saptanması	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	49
4.1. Sentezlenen Maddelerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması	49
4.1.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1)	49
4.1.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (2).....	50
4.1.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (3).....	50
4.1.4. 4- (metakriloilamino)-benzen sülfonamid (4).....	51
4.1.5. 4- (akriloilamino)-benzen sülfonamid (5).....	52
4.1.6. 2- (metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid (6)	52
4.1.7. 2- (akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid (7)	53
4.2. Biyolojik Çalışma (in vitro) Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	53
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	64
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT IR Spektrumları	65
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin ¹ H NMR Spektrumları.....	69
ÖZET	72
SUMMARY	74

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi
YENİ KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİ SENTEZİ VE *İN VİTRO* İNHİBİTÖR
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Mustafa GÜMÜŞ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKMEN
Yıl: 2008, Sayfa: 75

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, ve ¹H NMR yöntemleriyle aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin sudaki çözünürlüğü, bölme katsayısı ve biyolojik aktiviteleri (*in vitro*) incelenmiştir. Bu bileşiklerin bir kısmının asetazolamit ve sülfanilamitten daha güçlü inhibitör oldukları tespit edilmiştir. Bileşiklerin bölme katsayısı, inhibitör aktivitesi ve sudaki çözünürlükleri arasındaki ilişki incelenmiş ve sudaki çözünürlük, bölme katsayısı ve aktivite arasında bir bağlantının olmadığı tespit edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerden en az birinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılabilmesini umuyoruz.

ANAHTAR KELİMELER: Karbonik Anhidraz İnhibitörleri, Asetazolamit, Sülfanilamit

ABSTRACT

MSc Thesis

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF *IN VITRO* INHIBITORY ACTIVITIES OF NOVEL CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS

Mustafa GÜMÜŞ

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hasan TURKMEN

Year: 2008, Page:75

The objective of this study is synthesis and investigation of biological activities of novel carbonic anhydrase inhibitors. Three novel carbonic anhydrase inhibitors have been synthesised in this study. Synthesised these compounds were identified by FT IR and ¹H NMR. The compounds made were evaluated for carbonic anhydrase inhibitory activity (*in vitro*), water solubility and ether partition coefficient. 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 found that there is no correlation between water solubility, partition coefficient and inhibitory activity (IC_{50}). 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 tezi olarak sunduğum bu çalışmamın, planlanmasından tez yazımına kadar değerli katkılarını benden esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsünden yararlandığım değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKMEN'e teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım esnasında benden destek ve yardımlarını esirgemeyen kimya bölümünün değerli hocaları Doç. Dr. Mustafa Deđerirmenci'ye, Doç. Dr. Hařim Yılmaz'a, Yrd. Doç. Dr. Fatih Aslan'a, Yrd. Doç. Dr. Ali İhsan Öztürk'e ve diğer hocalarıma teőekkürü bir borç bilirim. Çalışmam boyunca, sabır ve destekleri ile beni yalnız bırakmayan yüksek lisans arkadaşlarım Ramazan Tatsız'a, Serpil Yılmaztekin'e, şirin Hicri'ye ve değerli öğretmen arkadaşım İbrahim Cüre'ye sonsuz teşekkür ederim.

Bugüne kadar hep yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşime ve değerli aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Sülfanilamid	1
Şekil 1.2. Asetazolamid	1
Şekil 1.3. Metazolamid	1
Şekil 1.4. Diklorfenamid	1
Şekil 1.5. Dorzolamid	2
Şekil 2.1. Karbonik anhidraz KA(II) enziminin polipeptit yapısı	5
Şekil 2.2. HCA-II izoenziminin ligand yapısındaki metal merkezinin şematik olarak gösterilişi.....	6
Şekil 2.3. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -HCO ₃ ⁻ dönüşümü	7
Şekil 2.4. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması	12
Şekil 2.5. Kan, hücre ve lümende iyon transferi	14
Şekil 2.6. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması	17
Şekil 2.7. Anyonik inhibitörler ve sülfonamidler tarafından KA enziminin inhibisyonu mekanizması.....	17
Şekil 2.8. Asetazolamidin yapısı.....	18
Şekil 2.9. Metazolamidin yapısı.....	19
Şekil 2.10. Diklorfenamidin yapısı	19
Şekil 2.11. Dorzolamidin yapısı.....	20
Şekil 2.12. Brinzolamidin yapısı.....	20
Şekil 2.13. Karbonik anhidrazın inhibisyonu	21
Şekil 2.14. Prontosil molekülünün yapısı.....	22
Şekil 2.15. 4-aminobenzen sülfonamid molekülünün yapısı.....	22
Şekil 2.16. Antibiyotik özelliği olan bazı sülfonamid bileşikleri	23
Şekil 2.17. Sülfadiazin molekülünün yapısı	24
Şekil 2.18. Sülfatiazol molekülünün yapısı.....	24
Şekil 2.19. Glokom hastalığına yakalanmış farklı göz örnekleri.....	26
Şekil 2.20. Normal bir gözde aköz hümör sıvı akışı	27
Şekil 2.21. Primer açık açılı glokom	29
Şekil 2.22. Lazerle tedavi yöntemi	32
Şekil 2.23. Primer kapalı açılı glokom	33
Şekil 3.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1)'in sentezi	39
Şekil 3.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (2)'nin sentezi	40
Şekil 3.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (3)'ün sentezi	41
Şekil 3.4. 4-(metakriloilamino)-benzen sülfonamid (4)'ün sentezi	42
Şekil 3.5. 4-(akriloilamino)-benzen sülfonamid (5)'in sentezi.....	43
Şekil 3.6. 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid (6)'nın sentezi	44
Şekil 3.7. 2-(akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamid (7)'nin sentezi	45
Şekil 4.1. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı blank olarak, asetazolamidli ve sülfanilamidli ortamda absorbands değişimi	54
Şekil 4.2. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı asetazolamidli ve 2 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi.....	55
Şekil 4.3. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı asetazolamidli ve 3 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi.....	55
Şekil 4.4. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı asetazolamidli ve 4 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi.....	55
Şekil 4.5. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı asetazolamidli ve 5 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi.....	56
Şekil 4.6. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı asetazolamidli ve 6 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi.....	56
Şekil 4.7. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı asetazolamidli ve 7 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi.....	56
Ek Şekil 1.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1)'in KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu.....	65
Ek Şekil 1.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (2)'nin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu.....	65

Ek Şekil 1.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (3)'ün KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu	66
Ek Şekil 1.4. 4- metakriloil benzen sülfonamit (4)'ün KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu	66
Ek Şekil 1.5. 4- (metakriloilamino) benzen sülfonamit (5)'in KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu	67
Ek Şekil 1.6. 2- (metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)'nın KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu	67
Ek Şekil 1.7. 2- (akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (7)'nin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu	68
Ek Şekil 2.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (1)'ün DMSO-d ₆ içerisinde alınan ¹ H NMR spektrumu	69
Ek Şekil 2.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (2)'ün DMSO-d ₆ içerisinde alınan ¹ H NMR spektrumu	69
Ek Şekil 2.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (3)'ün DMSO-d ₆ içerisinde alınan ¹ H NMR spektrumu	70
Ek Şekil 2.4. 4- metakriloil benzen sülfonamit (4)'ün DMSO-d ₆ içerisinde alınan ¹ H NMR spektrumu	70
Ek Şekil 2.5. 2- (metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)'nın DMSO-d ₆ içerisinde alınan ¹ H NMR spektrumu	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

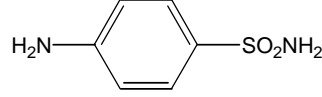
	Sayfa No
Çizelge 2.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	9
Çizelge 2.2. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri.....	10
Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayıları ve inhibitör aktiviteleri IC ₅₀ sonuçları.....	57

SİMGELER DİZİNİ

DCM	Diklormetan
GİB	Göz İçi Basıncı
HCl	Hidroklorikasit
IC ₅₀	Enzimin %50'sini İnhibe Eden İnhibitörün Molar Konsantrasyonu
IR	İnfraret Spektroskopisi
KA	Karbonik Anhidraz
KAE	Karbonik Anhidraz Enzimi
KAİ	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
K _i	İnhibisyon Katsayısı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PAAG	Primer Açık Açılı Glokom
PABA	<i>p</i> -aminobenzoikasit
PKAG	Primer Kapalı Açılı Glokom
TEA	Trietilamin
THF	Tetrahidrofuran
TLC	Thin Layer Chromatography
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan

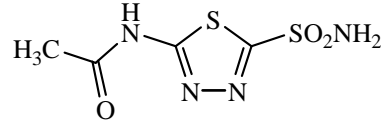
1. GİRİŞ

1940 yılında Mann ve Keilin karbonik anhidraz inhibitörü (KAİ) olan ilk Sülfanilamid bileşiğini sentezledi (Mann ve Keilin, 1940).



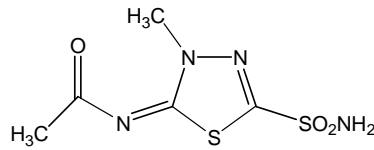
Şekil 1.1. Sülfanilamid

1944 yılında Friedenwald glokom tedavisi için gözdeki basıncın düşürülmesi gerektiğini ifade etti. Başlangıçta diüretik olarak kullanılan oral KAİ' nin göz içi basıncında (GİB) azalttığı 1954 yılında Becker tarafından bildirilmiştir. Yine aynı yıl glokom tedavisi için sistemik karbonik anhidraz inhibitörü olan Asetazolamid (Acetazolamide) sentezlenmiş olup, halen glokom tedavisi için tablet olarak kullanılmaktadır (Shields, 1987).

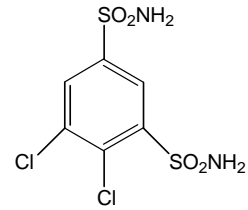


Şekil 1.2. Asetazolamid

Diğer sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri metazolamid ve diklorfenamittir.

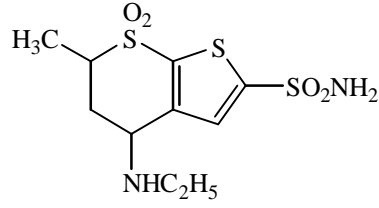


Şekil 1.3. Metazolamid



Şekil 1.4. Diklorfenamid

İlk topikal karbonik anhidraz inhibitörü olan Dorzolamid 1995 yılında Maren tarafından sentezlenmiştir (Maren, 1995).



Şekil 1.5. Dorzolamid

Ayrıca bu konu ile ilgili İngiltere’de çalışmalar yapılmış ve şu anda kullanılmakta olan ilaçlardan biyolojik aktivitesi yaklaşık (*in vitro*) on kat daha iyi olan ilaçlar sentezlenmiştir (Türkmen, 1998). Bu ilaçların *in vivo* ve *in vitro* çalışmaları yapılmaktadır.

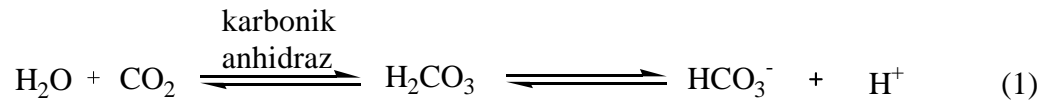
Bu çalışmada amacımız daha etkin, yan etkisi olmayan veya daha az yan etkisi olan karbonik anhidraz inhibitörleri sentezlemektir. Sentezlenecek bileşiklerin beklenen özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. Enzimlere karşı yüksek aktivitede olması,
2. Yağ içindeki çözünürlüğünün istenilen seviyede olması,
3. Su ve yağdaki çözünürlüklerin dengede olması,
4. Sudaki çözünürlüğünün en azından % 3g/ml seviyesinde olması,
5. Göze uyumlu olması,
6. Yan etkisinin olmaması ya da en azından minimum seviyede olması.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz, vücutta yaygın olarak bulunan CO₂'in hidrasyonu ve dehidratasyonunu sağlayan reaksiyonu katalize eden bir enzimdir (Dökmeci, 1992). 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 karbon dioksitin karbonik aside (H₂CO₃) 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 Zn⁺² iyonlu bir metaloenzimdir. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz, genel olarak metabolik CO₂ geçişini sağlamanın yanı sıra, birçok dokunun H⁺ ve HCO₃⁻'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 çözünmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak yer almaktadır (Polya ve Wirtz, 1965; Maren, 1967; Carter, 1972; Pocker ve Joan, 1974; Pocker ve Sarkanen, 1979).

Karbonik anhidrazın değişik izoenzimleri farklı bir şekilde dokulara dağılmıştır. Bazı izoenzimler aynı dokularda birlikte bulunduğu gibi, diğer bazı dokularda tek bir izoenzim bulunmaktadır. Eritrositlerde bol miktarda bulunan KA-I izoenzimi yanında, KA-II değişik dokulara H^+ ve HCO_3^- salgılamaktadır. Ayrıca böbrek kortekslerinden izole edilen KA-II'nin bütün özelliklerinin tamamen aynı olduğu bulunmuştur. Diğer dokularda ise KA-II izoenzimi eser miktarda bulunmaktadır. Membrana bağlı bir izoenzim olan KA-IV ise insan böbreği ve akciğerlerinden izole edilmiştir. Epitelyum hücrelerde KA-IV, KA-II ile birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar, KA-IV'ün yetişkin kişilerin dokularının büyük bir bölümünde ve bazı fetal dokularda bulunduğu belirlenmiştir. KA-V'in ise belirli dokuların mitokondrilerinde, KA-VI tükürük bezlerinde ve KA-VII ise sitozolde bulunan izoenzimleridir (Carter ve ark., 1981; Wistrand, 1981; Carter ve ark., 1982; Akiba ve ark., 1986; Sasaki ve Marumo, 1989).

Eritrosit KA'sının en önemli fonksiyonu ise, doku kılcıl damarlarında, metabolizma ürünü olan CO_2 'i H_2CO_3 'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3 'i CO_2 'ye dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır. Bu katalizlenme reaksiyonu 1 nolu reaksiyonda gösterilmiştir.

Böbrek tübüllerinde ise, aynı reaksiyonlarla, Na^+ ve H_2O geri emilimi sağlanmaktadır. Diğer dokularda da yine 1 nolu reaksiyonla ya CO_2 transferini, ya da H^+ iyonu birikimini temin ederek, hücre için gerekli ortamı meydana getirir. Nitekim omurgalıların kan ve hücreler arası sıvısındaki en önemli tampon bikarbonat tampon sistemidir (Carter ve ark., 1982; Dodgson ve ark., 1983; Keha ve Küfrevioğlu, 1993).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sülfonamid inhibitörlerinin üre sentezini azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, mitokondriyel KA enziminin (KA-IV), sitrulin sentezi için gerekli olan HCO_3^- iyonunu, sitrik asit devrinden gelen CO_2 'den sağlayarak üre devrinin ilerlemesinde büyük role sahip olmasıyla açıklanabilir.

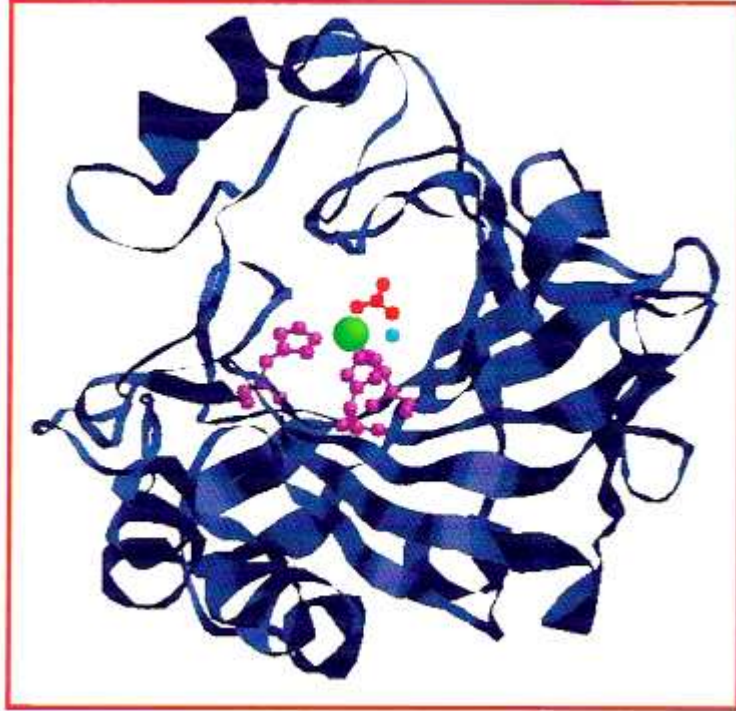
Yine iskelet kasında KA, laktik asit-laktat dengesinde çok önemli bir role sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Pocker ve Joan, 1973). Bitki kloroplastlarındaki KAE'nin rolü, atmosferden gelen CO_2 'nin yapraklarda HCO_3^- halinde taşınması ve daha sonra tekrar CO_2 'ye dönüştürülerek fotosentezde

kullanılması şeklinde ifade edilmektedir (Tobin, 1970; Botre ve ark., 1991). KA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan asetazolamitin (2-asetilamino-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit) fotosentez olayını inhibe etmesi bu ifadeyi doğrulamaktadır (Pocker ve ark., 1973).

2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Yapısı

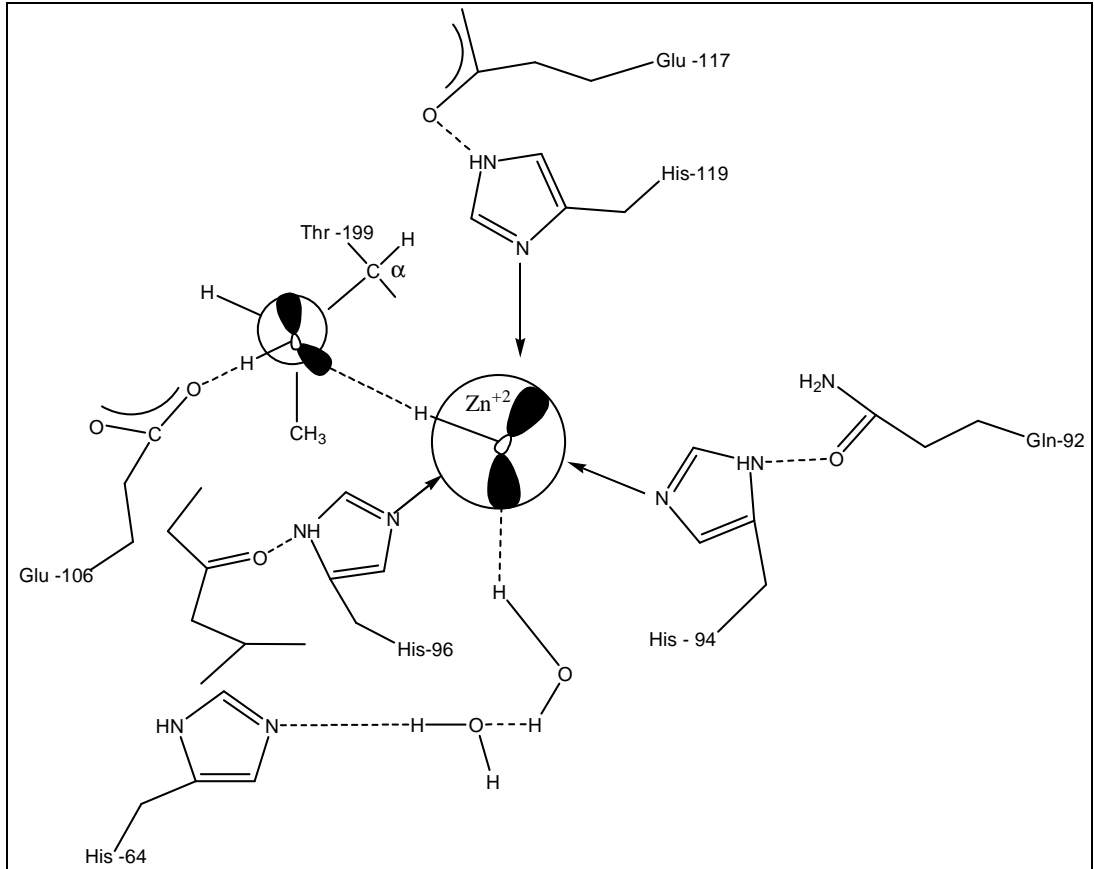
Karbonik anhidraz, 260 alt birimden (aminoasitler) oluşan doğal hali özel bir kürecik şeklinde kıvrılmış bir protein zinciridir. Yapısında, aktif taraf denilen, reaktantların orada ürünlere dönüştüğü bir yarık veya cep bulunmaktadır. Karbonik anhidrazın protein zinciri şekil 2.1.'de mavi bir şerit olarak gösterilmiştir.

Karbonik anhidrazın aktif tarafında bir su molekülü proton kaybederek hidroksit (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 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) bazı taraflar morumsu kırmızıdır (bu bazlar, histidin imidazol halkalarındaki azot atomlarıdır). Bu türlerin hiçbirinde hidrojen atomları gösterilmemiştir (Solomons ve Fryhle, 2002).



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

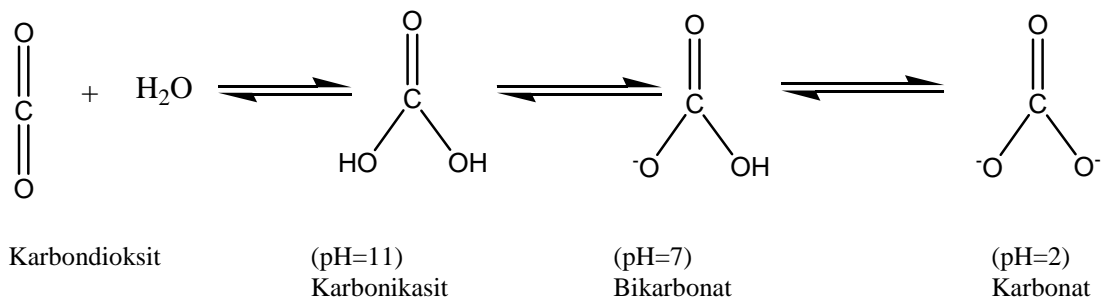
Enzimin aktif bölgesi oyuk şeklindedir ve geniş bir alana yerleşmiştir. Koni biçimindeki bu oyuk hemen hemen molekülün merkezine kadar uzanır. Çinko iyonu bu oyuğun alt kısmına bitişik durumdadır. Dört ligand gibi H_2O veya OH^- ile bir tetrahedral geometride His-94, His-96 ve His-119'daki üç azot atomuyla 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).

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin pernsiplerinin 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_2 ve H_2CO_3 veya ortamın pH'sına göre HCO_3^- veya CO_3^{2-} iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO_2 'nin farklı açılara sahip piramidal yapıda H_2CO_3 'e kendiliğinden dönüşümü çok yavaştır.



Şekil 2.3. Karbonik anhidraz enziminin CO_2 - HCO_3^- dönüşümü

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 CO₂ 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 iyonunun optimum aktif transportu için uygun bir pH ortamı sağlar (Maren, 1967; Dökmeçi, 1992).

KA-IV ayrıca hücre zarında vücutta sıvı üreten salgılayıcı dokularda bulunur, KA'nın önemli bir fonksiyonel formu olduğu düşünülmektedir (Maren ve ark., 1993). 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 izoenzimlerindedir 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 CO₂ atmosferden kullanır. CO₂ gazı bikarbonat iyonu olarak depolanır, hem kara hem de su bitkilerinde karbonik anhidraz bikarbonat iyonlarının CO₂'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).

2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

KA enzimi, HCO₃⁻ ve H⁺ oluşturarak hem CO₂'nin uzaklaştırılmasında hem de asit-baz dengesinin korunmasında önemli rol oynar. Karbonik anhidraz CO₂'nin hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamite, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir (Çizelge 2.1.) (Supuran ve Scozzafava, 2001).

Çizelge 2.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri

1	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
2	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
3	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
4	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
5	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
6	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
7	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$
8	$PhCH_2OCOCl + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
9	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$

(R=Me;Ph)

(Ar=2,4 dinitro fenil)

KA enziminin; hayvan dokularında, bitki hücrelerinde ve bakteriler gibi hemen hemen bütün organizmalarda bulunduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda

yapılan çalışmalarda çeşitli memeli dokularında 14 farklı KA enziminin olduğu bildirilmektedir (Çizelge 2.2.) (Solist ve ark., 1999; Chegwitten ve ark., 2000; Clare ve Supuran, 2000; Supuran ve Scozzafava, 2002). Belirlenen KA izoenzimleri arasında, KA-I, KA-II, KA-III ve KA-VII sitozolik form; KA-VI tükürük gibi çeşitli salgılarda mevcut olan karbonik anhidraz formlarıdır (Parkkila ve ark., 1998; Mori ve ark., 1999; Bülbül ve ark., 2003). Son yıllarda katalitik etkisi olmayan birkaç formu da (KA-VIII, KA-X ve KA-XI) canlılarda izole edilmiştir.

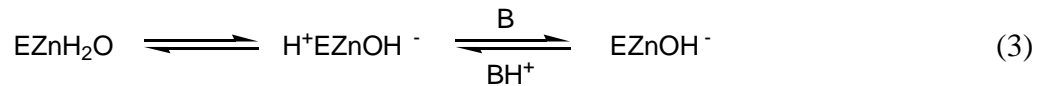
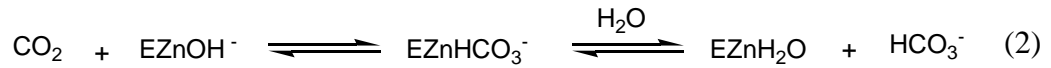
Çizelge 2.2. Karbonik anhidraz izoenzimleri, hidrataz aktiviteleri ve hücre içi yerleşimleri (Pastarekova ve ark., 2004)

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
KARP-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

KA ilk olarak memeli eritrositlerinde izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositlerinde, balık eritrositlerinde, sığan eritrositlerinde, sığan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein ve Silverman 1984; Krungkrai ve ark., 2001; Beydemir ve ark., 2002; Beydemir ve Gülçin, 2004).

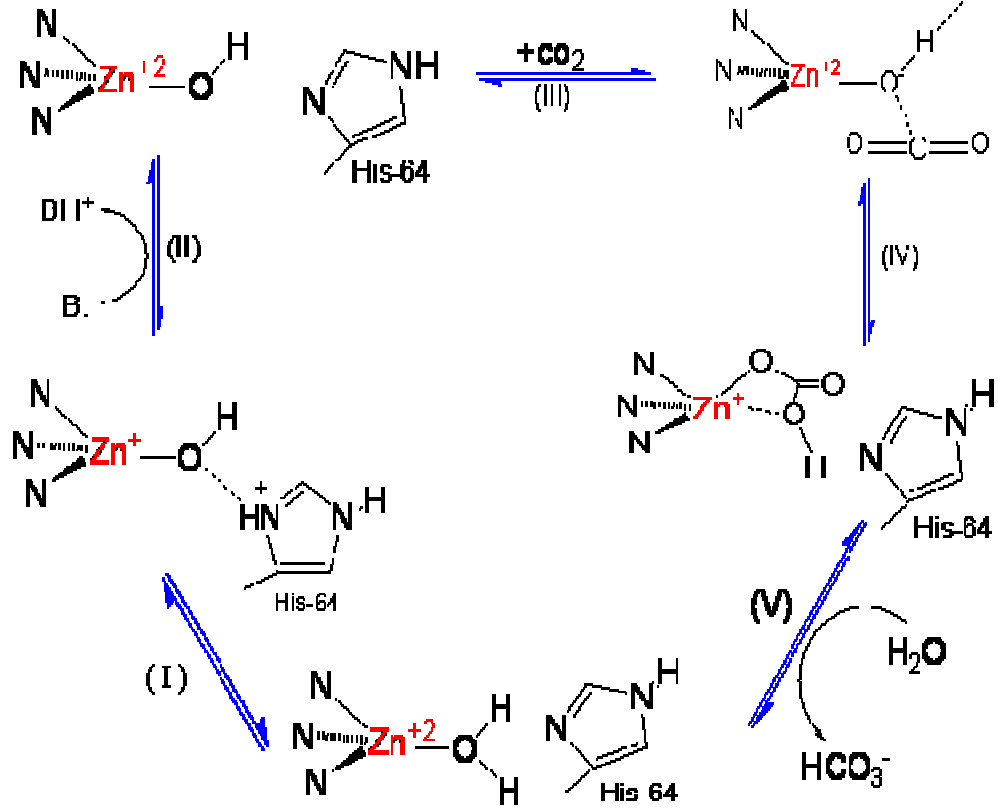
Karbonik anhidraz enzimlerinin üç boyutlu yapıları α -KA, β -KA ve γ -KA olmak üzere üç farklı familyada incelenmiştir. Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine onların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdadır (Hewett-Emmett, 2000).



Yukarıdaki mekanizmada gösterildiği gibi kataliz iki safha gerçekleşmektedir. Birinci safhada enzimin karbondioksidi bağlaması ve bikarbonat oluşması gözlenirken, ikinci safhada ise proton transferini ve enzimin tekrar başlangıçtaki haline dönmesi izler (Pocker ve Sarkanen, 1978).

Çinko iyonuna bağlı su molekülleri kolaylıkla proton verilir. Fakat çinko iyonuna bağlı imidazol veremez (Gary ve Tarr, 2002). Enzimin aktif formunu oluşturan EZnOH^- güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır. Bu da Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar. Daha sonra HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır (Denklem 2). Denklem 3'te katalizin 2. aşaması proton transfer adımlarından oluşur ve enzim çinko bağlı hidroksit formuna geri döner. Burada B bir proton akseptörü (tampon) veya belki de su, E enzimi ifade eder (Silverman ve Lindskog, 1988).

Karbonik anhidraz enziminde aktif bölgede üç tane histidin imidazol grubuna bağlı çinko iyonu olduğu bilinmektedir. Denel olarak enzim pH 7'nin altında aktifliğini kaybeder, bu durum pK'sı 7 olan iyonlaşabilen bir grubun aktif bölgenin bir parçası olduğunu gösterir. Ayrıca CO₂'nin hidrasyon ürününün HCO₃⁻ olduğu bilinmektedir (Gary ve Tarr, 2002). Önerilen karbonik anhidraz mekanizması Şekil 2.4.'te gösterildiği gibidir.



Şekil 2.4. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

İlk basamakta His-64 Zn'ye su molekülü üzerinden bağlanmaktadır. Zn'ye bağlı su molekülünde bulunan bir proton His-64 poteinine geçer (I). İkinci aşamada, ortamdaki kuvvetli baz His-64'de bulunan protonu koparmaktadır (II). Oluşan Zn(OH⁻) (hidroksit ligandı) CO₂'ye çok hızlı etki eder ve geçiş halini oluşturur (III). Bu geçiş halinden sonra ürün kompleksi oluşur (IV). Son olarak ürün kompleksinde bulunan HCO₃⁻ su ile çok hızlı bir şekilde yer değiştirir (V). Bu olay metabolizmada döngüsel bir şekilde devam etmektedir (Briganti ve ark., 1997).

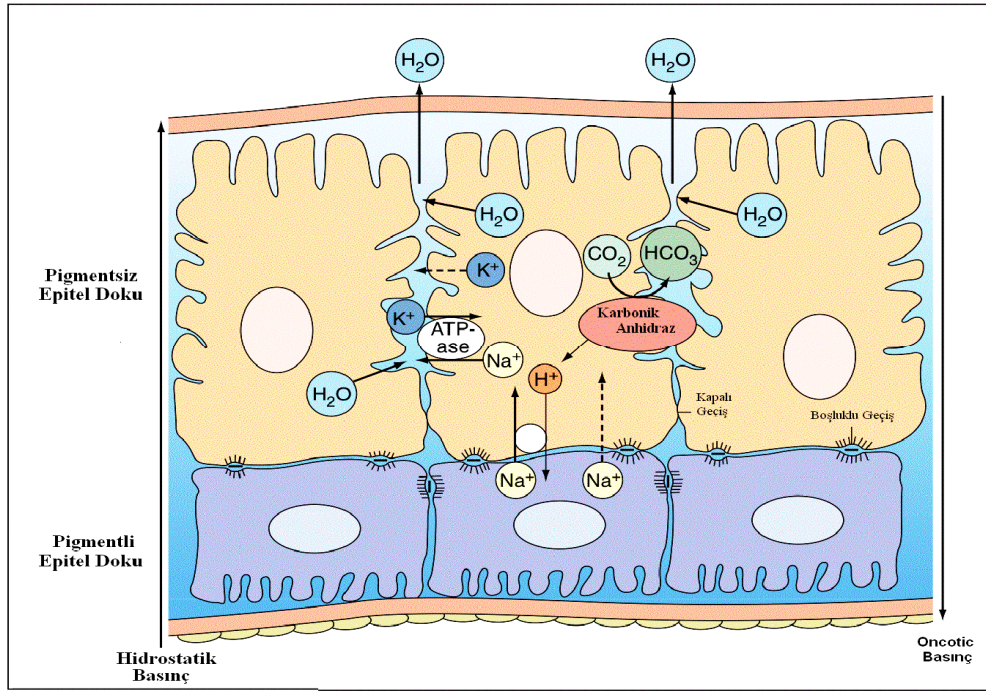
2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Metabolizmadaki Yeri

Karbonik anhidraz enzimi CO_2 'nin su ile birleşmesini katalize eden enzimdir (Maren, 1967). Oluşan H_2CO_3 kimyaca stabil bir bileşik olmadığından tamama yakın bir kısmı iyonize olur. Bu enzim böbrek korteksinde proksimal ve distal tübül hücrelerinin ve toplayıcı tübül hücrelerinin lümene bakan kısımlarında konsantre olmuştur. Ayrıca eritrositlerde, mide mukozasında, gözde korpus siliare ve beyinde bulunur. Karbonik anhidraz çok önemli bir enzimdir. Çünkü böbreğin alkalileri tasarruf etmesini, asidi, idrar çıkarmasını ve böylece ekstraselüler sıvının asit-baz dengesinin korunmasını sağlar. Gözde korpus siliare'de hümör aközün oluşumu karbonik anhidraz enzimi tarafından sağlanır. Enzimin inhibisyonu hümör aköz salgılanmasının azalmasına neden olur. Midede salgı hücrelerinde H^+ meydana gelmesi 1 nolu reaksiyonla olmasıdır. Fakat mide salgı hücrelerindeki karbonik anhidraz izoenzim türü, asetazolamit ve benzeri ilaçlar tarafından belirgin derecede inhibe edilemez (Maren, 1967).

Enzim, H^+ ve ün HCO_3^- böbrekte, midede, kırmızı kan hücrelerinde, akciğerde pankreasta geçişini gerçekleştirir. Vücudun bazı bölgelerinde gerçekleşen bu olay göz içinde retinada, göz hücrelerinde, iristeki epitel dokularda da gerçekleşir. Aynı proses göz içindeki korpus siliare cisminde görülmektedir. Gözdeki hücrelerden Na, HCO_3^- iyonlarıyla hümör aköze taşınır. Bu olay ozmotik basınçla olmaktadır. Ozmotik basıncın dengesini sağlamak için su molekülleri de hücrelerden hümör aköze geçerler. Bu iki bölge arasında hümör aköz tarafında üretime dayalı yükselişten kaynaklanan dengesizlik olursa (yaklaşık $0.2 \text{ mikrolitre min}^{-1} \text{ mmHg}$) göz içi basıncında (GİB) bir yükselme olmaktadır (Maren, 1967).

Bu enzimlerin işleyişi tam olarak bilinmemektedir. Hala enzimin etkisi anlaşılması güç bir hal içinde belirsizliğini korumaktadır. Sistemin basitleştirilmiş uyarlaması aşağıdaki şekilde verilmiştir. Bu sistem beyin ve omurilikteki sıvıda ve pankreasta gerçekleşen olaya oldukça benzemektedir (Drance ve Neufeld, 1984).

Şekil 2.5.'te görüldüğü üzere kan, hücre ve lümende gerçekleşen olaya değinilmiştir. Burada iyonların hücre zarları arasında bir dengeden kaynaklanabilecek bir geçişleri olduğu açıkça görülmektedir. Karbonik anhidraz enzimi tarafından oluşan H^+ nin bir kısmı lümene, bir kısmı da kanda bulunan bazlar tarafından tutulurlar. Burada proton NH_3 tarafından bağlanırlar. Böylece ortamda amonyum (NH_4), H_3PO_4 ve benzeri protonlanmış zayıf asitler oluşturabilirler (Drance ve Neufeld, 1984).



Şekil 2.5. Kan, hücre ve lümende iyon transferi

2.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

2.5.1. Etki mekanizması

Karbonik anhidraz inhibitörleri Sülfonamidlerden elde edilen sistemik etkili ilaçlardır. Karbonik anhidraz inhibisyonu vasıtasıyla GİB'i azaltırlar. Bu ilaçlar sodyum tutar potasyum atar, bu durumda korpus siliarede asit ortam oluşur. Asidik ortamda hümeör aköz yapımı azalmaktadır. Karbonik anhidraz inhibitörleri akut glokomda kısa süreli tedavi için faydalıdır. Fakat uzun süreli kullanım görme kaybı riski taşıyan hastalara uygulanmaktadır (Özçetin, 2001).

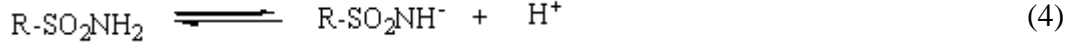
2.5.2. Yan Etkileri

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 taşlar, steven jhonsen sendromu, kemik iliği depresyonu, geçici miyopiyi kapsar.
- 5- Kanda CO₂ birikimini artırdığından dolayı çok risklidir kullanılmaz.

Karbonik anhidraz inhibitörleri, sülfonamidlerin değişik türevlerini oluşturan ajanlardır. Doğrudan karbonik anhidraz enzimini inhibe ederek ve daha küçük bir oranda asidoz olusturarak hümor aköz salgılanmasını azaltmak suretiyle göz içi basıncını düşürürler. Karbonik anhidraz inhibitörleri, sistematik olarak verildiklerinde akut glokomların kısa süreli tedavisinde fayda sağlarlar da, uzun süreli kullanımlarda genellikle yüksek görme kaybı riski taşıyan hastalar için rezerve edilmistir. Miyotiklerle kombine edildiklerinde gayet iyi ilave etki oluştururlar (Orağlı, 2001).

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri, aromatik ve heteroaromatik Sülfonamidlerdir. Sülfonamioler kimyasal R-SO₂NH₂ yapısına sahiptir. Burada R, genellikle aromatik ve heteroaromatik halka sistemidir. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi,

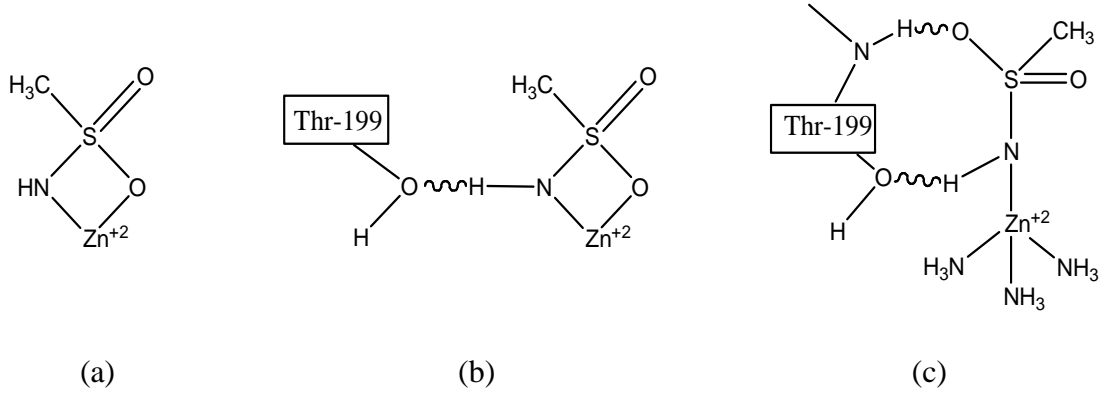


denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanımlarıdır. Bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidler içerdikleri bu hidrofilik bölgeye ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere de sahiptirler. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle $\text{R-SO}_2\text{NH}^-$ bileşiğindeki N atomunun karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} ile iyonik olarak bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur (Maren, 1987; Arslan, 2001).

Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzime güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Nitekim, süstitüe ya da alkil Sülfonamidlerin enzime bağlanmasında yalnızca hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heteroaromatik yan grubu taşıyanlara göre daha zayıf inhibitörlerdir. İnorganik anyonlar ise yalnızca hidrofilik bağlanma sonucu, KA için Sülfonamidler kadar güçlü inhibitör görevi üstlenemezler (Maren ve ark., 1983).

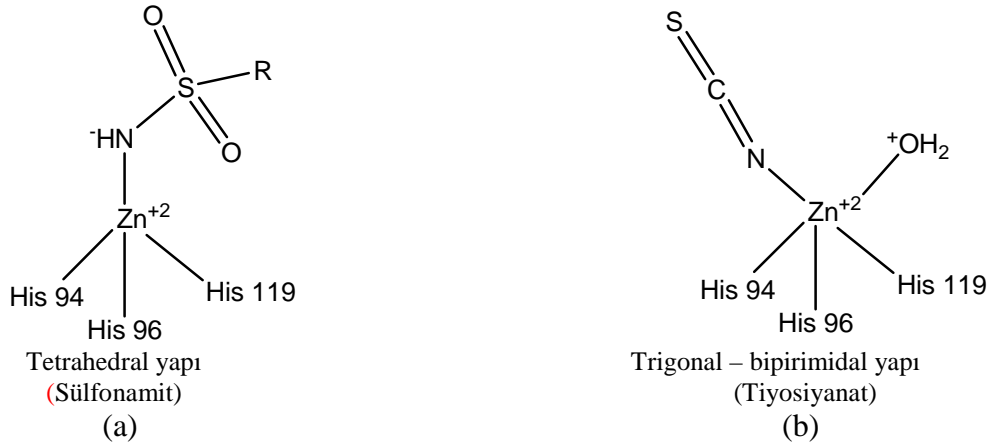
Sülfonamidlerin KA enzime bağlanması konusundaki teorik bir çalışma da, ilk olarak Zn^{+2} tek başına düşünüldüğü zaman, metal iyonuna azot ve oksijen atomlarından koordine olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.6a.). İkinci olarak, bu bağlanmaya aktif bölgede bulunan triozin(Thr-199)'de düşünüldüğünde Sülfonamid molekülündeki $-\text{NH}$ grubu ile Thr-199 arasında bir hidrojen bağı oluşarak daha kararlı bir yapı meydana gelmektedir (Şekil 2.6b.). Son olarak, KA enziminin aktif bölgesindeki bağlanmada rol alan Thr-199'un yanında, üç histidin grubu da düşünülerek yapılan çalışmalarda, Zn-OH bağı kararsız hale geçerek, tetra koordinasyon metal kompleksi oluşur. Bunun sonucu olarak Sülfonamid oksijen Thr-199'un NH grubu ile bir hidrojen bağı yaparak en kararlı konformasyonu meydana getirmektedir (Şekil 2.6c.). Bu teorik hesaplamalar, enzim-inhibitör kompleksinin (HCA-II-asetazolamid) X-ray yapı analizi ile uyum halindedir. Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını ortaya koymak için yapı aktivite ilişkileri ve enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı şekilde Van-der Waals etkileşmelerinden

dolayı K_1 değerlerinde önemli fark olduğunu göstermiştir (Roughtan ve Booth, 1946).



Şekil 2.6. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması

Zn(II) iyonuna koordine olmuş Sülfonamid bileşiğinin N atomuyla, protonu ayrılmış Zn(II) iyonunun bir tetrahedral yapıda bağlanması Sülfonamidler için çok önemlidir (Şekil 2.7a.). Anyonlar ise Şekil 2.7b.'de görüldüğü gibi, hem metal iyonun tetrahedral geometrisinde, hem de tiyosiyanat örneğinde görüldüğü gibi trigonal-bipirimidal yapıda bağlanabilirler (Briganti ve ark., 1996).



Şekil 2.7. Anyonik inhibitörler ve sülfonamidler tarafından KA enziminin inhibisyonu mekanizması

Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, KA inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için KA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, KA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış bunun sonucunda KA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli KA

enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron, emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple KA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001).

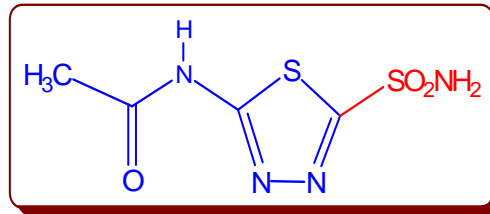
2.6. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sınıflandırılması

Karbonik anhidraz inhibitörlerini yapılarına ve etki mekanizmalarına göre ayırmak mümkündür. Sülfonamidlerden elde edilen bu ilaçlar sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri ve topikal karbonik anhidraz inhibitörleri olarak iki sınıfta incelenir.

2.6.1. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri

- Asetazolamit
- Metazolamit
- Diklorfenamit

2.6.1.1. Asetazolamit



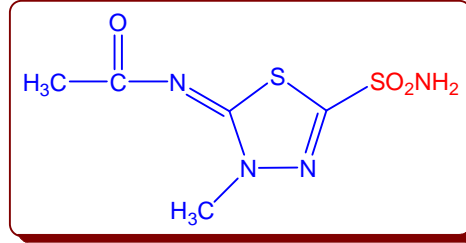
Şekil 2.8. Asetazolamitin yapısı

Açık açılı glokom, sekonder glokom ve kapalı açılı glokomda ameliyattan önce ya da sonra göz içi basıncını düşürmek için kullanılır. Asetazolamit ağızdan yada intravenöz enjeksiyon ile verilir. Solüsyonun pH'sının alkali olması nedeniyle intramusküler uygulanımı ağırlıdır. Asetazolamit sulfanomid grubundan bir ilaçtır; bazen hematolojik bozukluklar ,döküntü ve sulfanomidlere bağlı başka yan etkiler ortaya çıkar. Genellikle uzun süre kullanılması tavsiye edilmese de meydana

gelen elektrolit bozuklukları ve metabolik asidoz potasyum bikarbonat (efervesan tablet) verilerek düzeltilebilir. Enjeksiyon şekli Türkiye’de bulunmamaktadır.

- 1- 250 mgr’lık tabletler 250-1000 mgr olarak bölünmüş dozlar halinde verilir. Etkisi 1 saat içinde başlar, 4 saatte pik yapar ve 6-12 saat sürer.
- 2- 250 mgr’lık yavaş salınımlı tabletler (diamox SR) günde 1 veya 2 kez verilir; etki süresi 24 saattir.
- 3- 500mgr lık flakonlardır (diamox parenteral) intravenöz kullanım içindir. Etkisi kısa sürede başlar, 30 dakikada pik yapar ve 4 saat sürer (Alward, 1998; Sloan, 1999; Schuman, 2000).

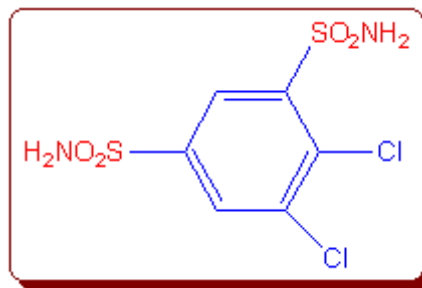
2.6.1.2. Metazolomit



Şekil 2.9. Metazolamitin yapısı

Böbrek taşları ve kan diskrazilerine neden olabilir. Doz, 50-100 mgr günde 2 kez olarak kullanılır. Etkisi 3 saatte başlar, 6 saatte pik yapar ve 10-18 saat sürer. Bu ajan, asetozolamite iyi bir alternatiftir ve daha uzun etki süresine sahiptir.

2.6.1.3. Diklorfenamit



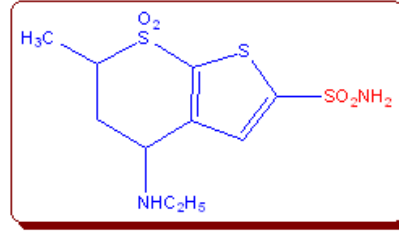
Şekil 2.10. Diklorfenamitin yapısı

Dozu 50-100 mgr dır ve günde 2 yada üç kez kullanılır. Etkisi 1 saat içinde başlar 3 saatte pik yapar ve 6-12 saat sürer.

2.6.2. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri

- Dorzolamit
- Brinzolamit

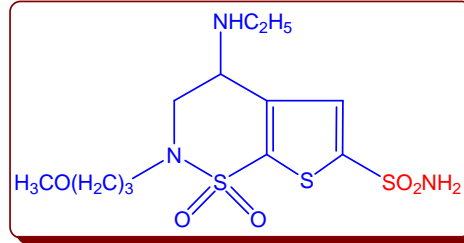
2.6.2.1. Dorzolamit



Şekil 2.11. Dorzolamitin yapısı

Topikal bir karbonik anhidraz inhibitörü olan dorzolamit beta blokerlere dirençli ya da beta blokerlerin kontraendike olduğu hastalarda kullanılmak üzere onaylanmıştır. Tek başına veya topikal bir blokerin yanında kullanılır. Karaciğer bozukluğu olanlarda dikkatli kullanılmalıdır. Ağır böbrek yetmezliği, gebelik, emzirenlerde ve hiperkloremik asidozu olanlarda kontreendikedir. Gözde yanma, batma, kaşıntı, ağızda acı tad, bulanık görme, gözlerde yaşarma, konjonktivit, yüzesel punktat keratit, blefarit, anterior üveit, geçici miyopi; baş ağrısı , sersemlik, parestezi, asteni, bulantı, döküntü ve allerjik reaksiyonlar (ürtiker, anjio ödem, bronkospazm dahil), üriner sistem taşları yapma gibi yan etkilere sahiptir. Tek başına uygulanırsa günde üç kez, beta blokerle uygulanırsa günde iki kez damlatılır.

2.6.2.2. Brinzolamit



Şekil 2.12. Brinzolamitin yapısı

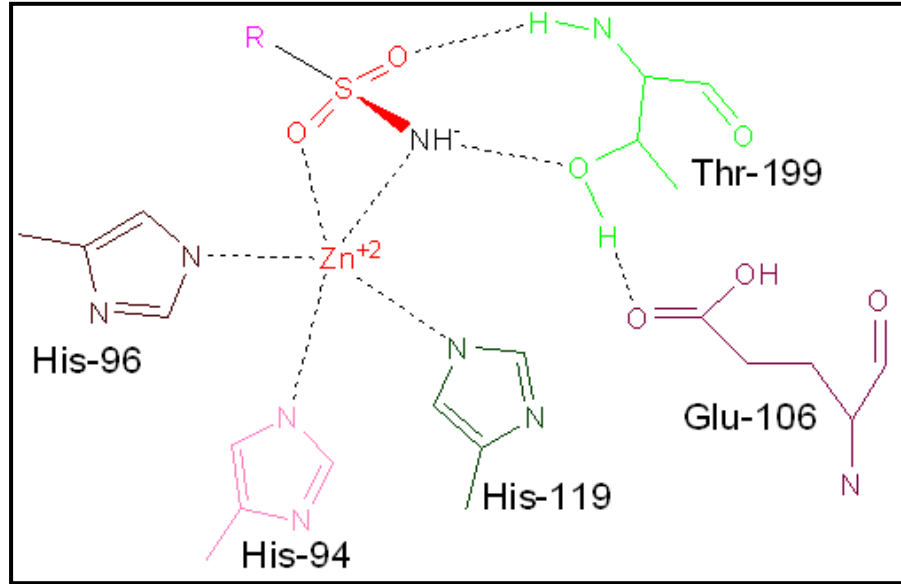
Azopt ticari adıyla %1 konsantrasyonda tedaviye sunulmuş diğer bir topikal karbonik anhidraz inhibitörüdür. Dorzolamit gibi KA-II izoenzimi bloke ederek hümeör aköz yapımını azaltan Sülfonamit türevi bir ilaçtır (Rosenberg, 1998).

2.7. Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

Aşağıdaki şekil karbonik anhidrazın inhibisyonunu göstermektedir. Sülfonamitin R-SO₂NH⁻ anyonu enzimde hidroksit anyonu yerine Zn(II)'ye koordine olur. İnhibitörün sülfonamit azotuna bağlı proton Thr-199'un hidroksil

grubuyla bir hidrojen bağı yapar ve sırayla Glu-106'nın karboksilik grubu Thr-199'un yan zincir hidrojeni ile hidrojen bağı yapar. Zn'ya koordine olan sülfonamid oksijenlerinden biri Thr-199'un -NH grubu ile bir hidrojen bağı verirken diğeri Zn(II) iyonuyla kısmi koordinasyonda bulunur. Bu etkileşimler KA-II ile tüm sülfonamidler arasında görülür.

Sülfonamidin R-SO₂NH₂ parçası aktif bölge yarığının hidrofobik parçası içinde kalır. Yan zincir ile Ile-91, Val-121, Val-143, Leu-198, Pro-202 ile van der waals etkileşimi yaparken metoksi grubunun hidrofilik parçasına yönelmiş olarak Gln-92, Ser-197 ve Thr-200 ile van der waals bağlantıları yapar (Abbate ve ark., 2004).



Şekil 2.13. Karbonik anhidrazın inhibisyonu

2.8. Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Kullanım Alanları

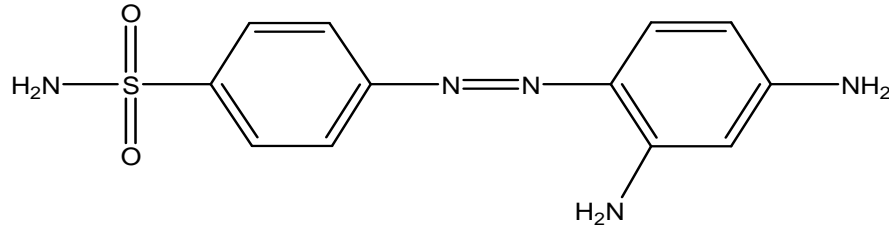
Karbonik anhidraz inhibitörlerinin kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

- 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_4 atılımını sağlarlar.
- Sirozda kullanılmamalıdır (kontrendikasyon) (Dökmeci, 1992).

2.9. Sülfonamidler ve Özellikleri

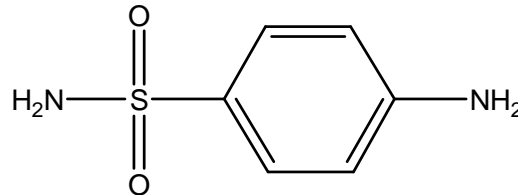
1932'de Alman kimyacıları Klarer ve Mietzch, yün polenleri üzerine güçlü bir şekilde bağlanan prontosil (para-Sülfonamid okrizodin) adlı azot türevi bir kırmızı boya keşfettiler.



Şekil 2.14. Prontosil molekülünün yapısı

1935'te G. Domark ve arkadaşlarının, farelerde oluşturdukları hemolitik streptokoklardan (bir bakteri türü) ileri gelen enfeksiyonları prontosille tedavi etmelerinden sonra antifeksiyöz kemoterapide ilk adım atılmış oldu (Dökmeci, 1996). İnsanlardaki bakteriyel hastalıkların sistematik olarak tedavisi ve önlenmesinde ilk kullanılan ilaçlar sülfonamidlerdir. Bulunmaları ve hemen geniş şekilde kullanılmaya başlanmalarını takiben etkili oldukları bakterilerin yol açtığı hastalıklarda önemli azalma olmuştur (Dural, 2002).

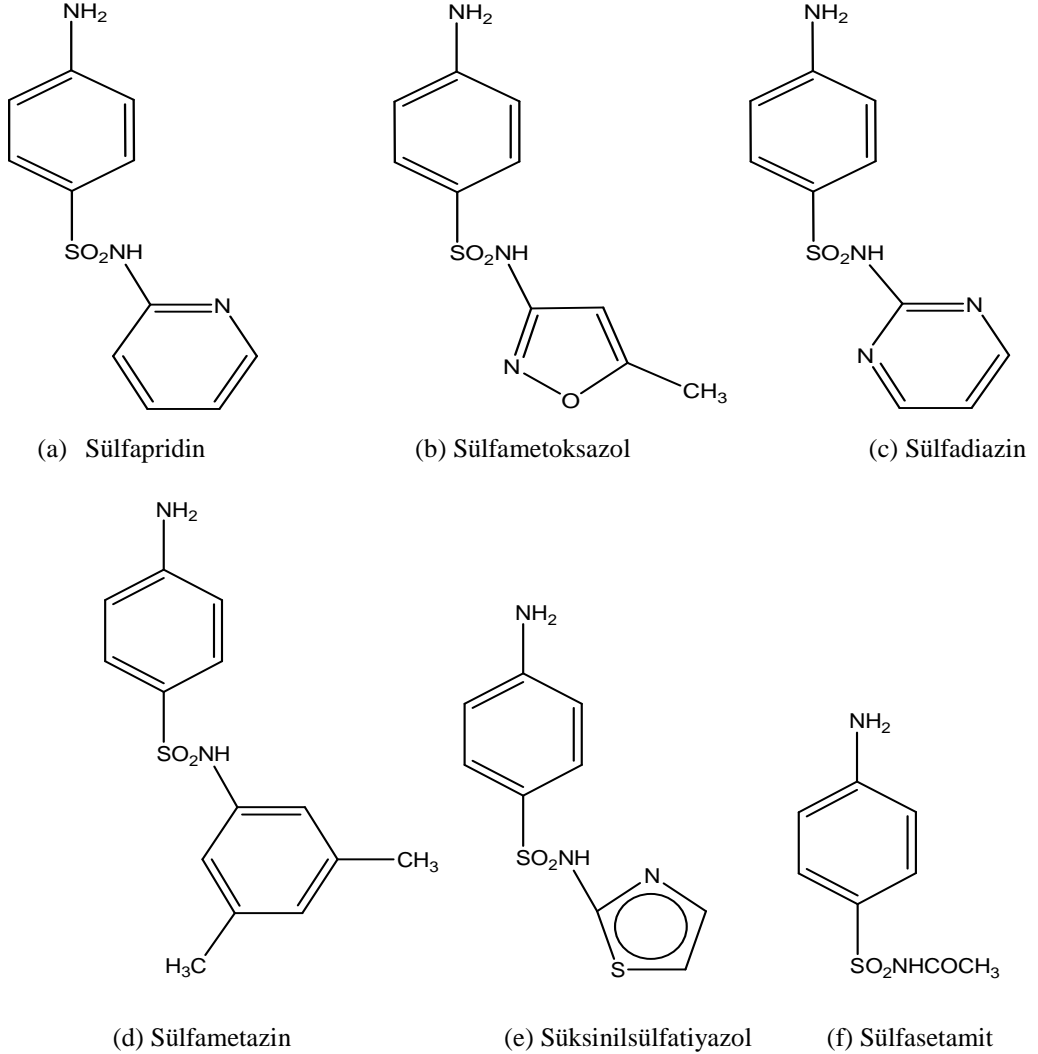
1936'da 4-aminobenzensülfonamid sentez edildi. Bu tarihten sonra otuz yıl içerisinde sülfonamid grubunun ($-SO_2NH_2$) yüzlerce türevi elde edilmiştir.



Şekil 2.15. 4-aminobenzensülfonamid molekülünün yapısı

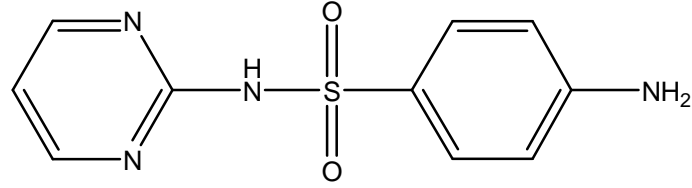
Günümüze kadar sayıları binleri aşan sülfonamid türevi sentezlenmiş ancak bunlardan sadece 25–30 kadarı uygulama alanı bulmuştur. Tüm sülfonamidler aynı yapıya sahiptir. Bakteriler üzerinde etkinlik için molekülde para konumunda amino grubunun bulunması esastır. Para konumuna vücutta amino grubuna çevrilebilen yapılar da bağlanabilir (Solomons ve Fryhle, 2004).

Antibakteriyel etkili sülfonamidler geniş spektumları nedeniyle tek başlarına çok sayıda endikasyonda uzun yıllar kullanılmışlardır. Daha sonra trimetoprim, tetoksoprim ya da primetmin (diaminoprimidinler) gibi dihidrofolat redüktaz inhibitörleriyle kombine edilerek günümüzde de çok sayıda enfeksiyona karşı kullanılmaktadır. Antibiyotik özelliği olan bazı sülfonamid yapıları aşağıda verilmiştir (Solomons ve Fryhle, 2004).



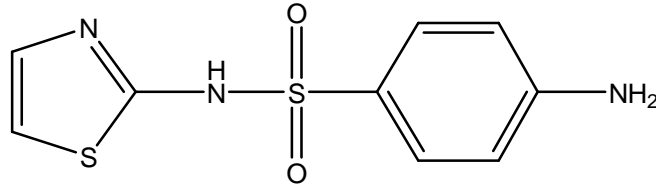
Şekil 2.16. Antibiyotik özelliği olan bazı sülfonamid bileşikleri

Bakteriler üzerinde etkinlik için sülfonamid grubunun (-SO₂NH₂) pek önemi yoktur ama taşıdığı gruplar yönünden bakıldığında molekülün en önemli kısmını oluşturur. Amit azotuna bağlanan gruplar bileşiğin etki gücünü değiştirir. Buraya heterosiklik aromatik bir grubun geçmesi en etkili sülfonamid türevlerini oluşturur; bu yönde en güçlü etkinlik sülfadiazinle elde edilir. Benzen halkasına herhangi bir grubun bağlanması genellikle etki kaybıyla sonuçlanır (Solomons ve Fryhle, 2004).



Şekil 2.17. Sülfadiazin molekülünün yapısı

Sülfonamidler grup olarak suda hemen hemen hiç çözünmeyen ve ışıktan kararan, beyaz renkte, kokusuz, kristalize toz halinde bulunurlar. Işığa duyarlı olmaları dışında genellikle dayanıklıdırlar. Toz ve çözelti halinde ısıtılarak mikropsuzlaştırılabilirler. Amfoterik özellik taşıyan sülfonamidler asidik ve bazik maddelerle tuzları verirler. Sodyumlu tuzları ana bileşiklere göre suda daha iyi çözünürler. Örneğin sülfotiyazolün sudaki çözünürlüğü 3 mg/mL iken sülfotiyazolün sodyum tuzunun 400 mg/mL'dir.



Şekil 2.18. Sülfatiazol molekülünün yapısı

Sülfonamidler bakteri ve parazitlerin folinik asit (tetrahidrofolat) biyosentezini bozarlar. Bu mikroorganizmaların hücre membranları insanlarınkinden farklı olarak folinik asit öncüsü olan folik aside karşı geçirgen değildir. Bakteri hücresi, önce hücre dışından aldığı p-aminobenzoik asit (PABA) ile pteridini dihidropteroat aracılığında birleştirerek dihidropteroik asit daha sonra da dihidrofolat sentetaz aracılığı ile folik asit sentezi yapmak zorundadır. Sülfonamidler dihidropteroat enzimini inhibe ederek folik asidin dolayısıyla folinik asidin sentez reaksiyonunu inhibe ederler.

Bakteri hücrelerinde folik asit sentezi tamamlandıktan sonra dihidrofolat redüktaz (trimetoprim ve protiminle inhibe edilir) enzimi aracılığı ile pürinlerin ve timidinin sentezinde gerekli kofaktör olan folonik aside dönüşmektedir (Dökmeci, 1996).

Gelişmeleri için folik aside gerek duymayan veya önceden şekillenmiş folik asidi kullanan bakteriler sülfonamitlere doğal olarak dirençlidir.

Sülfonamitler oral yada parenteral (deri altı) yoldan uygulanırlar. Sistemik etki oluşturmak için oral yoldan uygulanan sülfonamitlerin absorpsiyonları yani biyoyararlanımları oldukça iyidir. Bu nedenle tedavide oral yol tercih edilmelidir. Absorpsiyon genellikle ince bağırsakta olmaktadır. Sülfonamitlerin plazma proteinlerine bağlanmaları %50–93 arasında değişiklik göstermektedir.

Sülfonamitlerin oluşturduğu çeşitli yan etkilerin sıklığı ve şiddeti büyük ölçüde verilen dozla ilgilidir. Bazı sülfonamitler bulantı, kusma gibi yan etkiler oluştururlar, bazıları da az çözünen (asetilli) metabolitler şeklinde elimine olduklarından bir kristalüriye bağlı böbrek bozukluklarına neden olmaktadır. Bu gibi sülfonamitler bol su ile alınmaları ve idrarın alkileştirilmesi, üriner yollarda meydana gelebilecek rahatsızlıkları azaltabilmektedir.

Sülfonamitlerin vücudu özellikle idrarla terk etmeleri ve idrar pH'sının düşmesi tübüllerde çökmelerini kolaylaştırır. Ozmotik basınç sebebiyle, su tübüllerden basit geçişle geri emildiğinden, tübül boşluğundaki ilaç yoğunluğu giderek yükselir. Vücuttan hızla atılan sülfonamitler (sülfatiazol, sülfametoksazol) böbrek tübüllerinde kısa süre içinde yüksek yoğunluklarda bulunacaklarından, yavaş atılanlara göre daha fazla çökme tehlikesi doğururlar.

Böbreklerde sülfonamit kristallerinin şekillenmesi sülfizoksazol ve pirimidin türevleri gibi gerek kendileri gerekse asetilli türevleri gibi suda kolay çözünen sülfonamitlerin kullanılması, üçlü sülfonamit karışımlarının kullanılması, idrardaki ilaç yoğunluğunun azaltılması, sülfonamit tedavisi sırasında su, sulu besinler ve içecekler ile idrarı alkileştirici maddelerin (sodyum bikarbonat, maden suları) kullanılmasıyla azaltılabilir.

Böbrek yetmezliği olan hastalarda sülfonamidlerin kullanılmasından kaçınılması tavsiye edilir. Ama kullanılmaları zorunlu ise, gerekli tedbirler alınarak ve ilaç seçimi yapılarak uygulanabilir (Dökmeci, 1996).

2.10. Glokom

2.10.1. Glokom hastalığı (göz tansiyonu) nedir?

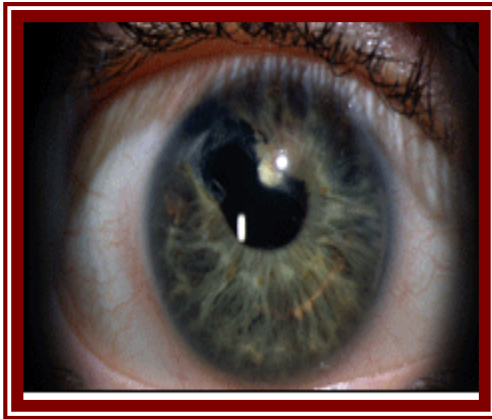
Halk arasında göz tansiyonu adıyla bilinen glokom, milyonlarca insanı etkileyen yaygın bir göz hastalığıdır. Tedavi edilmezse görme kaybına neden olabilir. Glokomda, göz içindeki sıvı basıncı, görme yeteneği için gerekli olan göz sinirine zarar verecek düzeyde yüksektir.



(a)



(b)



(c)



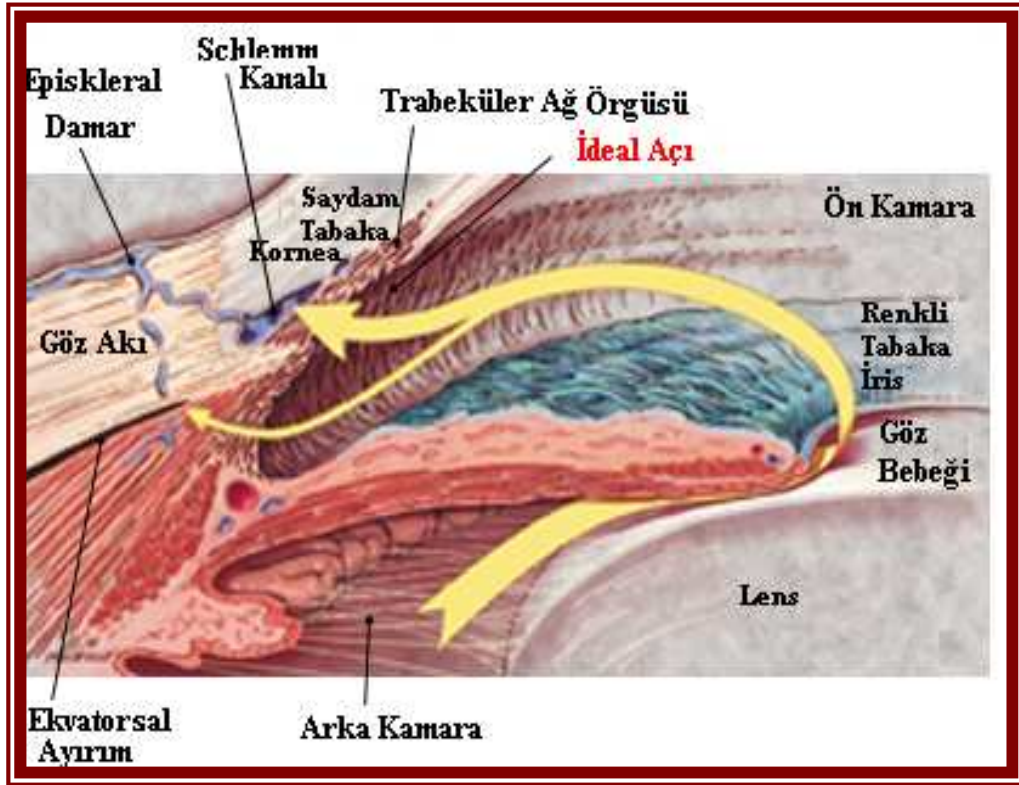
(d)

Şekil 2.19. Glokom hastalığına yakalanmış farklı göz örnekleri

Glokom, orta veya daha ileri yaş gruplarında görülen bir göz rahatsızlığıdır. Dünyada glokom, önlenabilir körlük nedenlerinin başında gelir. Sinsi bir hastalık olan Glokom (göz tansiyonu), belirtilerinin zor tespit edilmesi nedeniyle genellikle geç teşhisi ile ünlüdür. Hastalığın erken dönemlerinde yaşanan rahatsızlıklar kişi tarafından anlaşılamayabilir bu da geç teşhisin diğer önemli bir etkenidir. Yapılan araştırmalar Glokom'un geç teşhisini kanıtlar nitelikte sonuçlara sahiptir.

2.10.2. Belirtileri

Başlangıçta genellikle belirti görülmez, görmeye bozukluk ve ağrı yoktur. Hastalık teşhis edilmezse ilerler ve görme sinirindeki hasara bağlı olarak görme alanı gittikçe daralır. Bir borudan bakıyormuş gibi etraftaki cisimler görülmez olur. Daha da ilerlediğinde bu boru görüşü de kaybolur.



Şekil 2.20. Normal bir gözde aköz hümör sıvı akışı

2.10.3. Glokomun sınıflandırılması

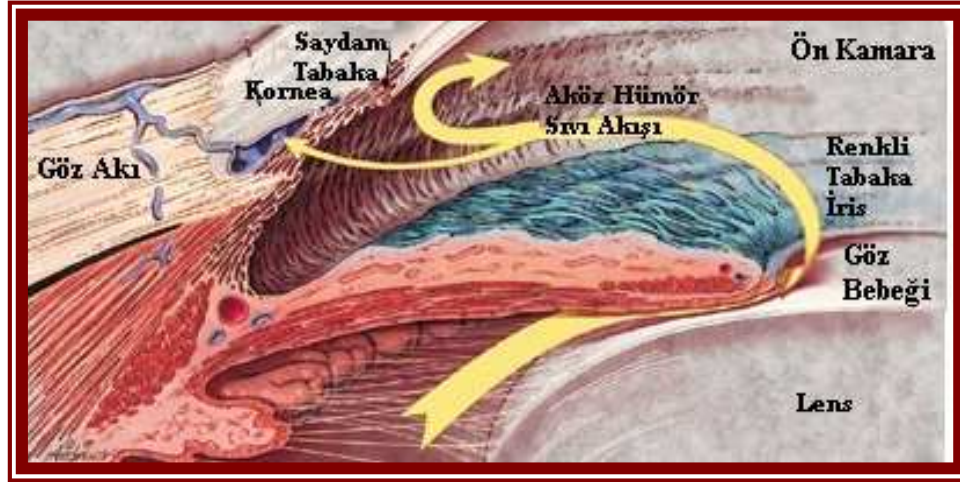
Glokom türleri; Yapısal ve vücuttaki fizyolojik etkileri göz önünde tutularak Primer, Konjenital ve Sekonder olmak üzere üç ana başlık altında toplanmıştır. Primer Glokom; açık açılı ve kapalı açılı olarak iki kısımda incelenmiştir.

2.10.3.1. Primer glokom

Humör aközün yapımı, gözdeki sirkülasyonu ve gözü terk etmesindeki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan göz içi basıncı (GİB) artışıdır. Humör aköz, aktif metabolik bir olay sonucu korpus siliare epitelinde yapılır. Bu formasyonda siliyer kapillerlerdeki kan basıncı düzeyinin, plazma onkotik basıncının rolü vardır. Burada yapılan humör aköz arka kamaraya gelir, pupilla açıklığından ön kamaraya geçer. Humör aközün % 80'i açıda trabekülüm yolu ile Schlemm kanalı'na, buradan da aköz venler ile venöz dolaşıma katılır. % 20 oranında ise dışa akım uveo-skleral yol ile olur, koroidea, sklera ve korpus siliaredeki venöz dolaşım ile suprakoroideal aralığa geçer. GİB'in sınırları 10–21 mmHg arasındadır. GİB gün boyu siklik değişiklikler gösterir. Basınç farkı 3–6 mmHg arasında gün içi farklılıkları gösterebilir. Glokomatöz optik sinir hasarının patogeneğinde mekanik teori, iskemik teori ve nöronal korunmanın rolü olduğu kabul edilmektedir. Basınç değişikliklerinin aplanasyon (düzleştirme) tonometrisi, indentasyon tonometrisi, pnömatik tonometri gibi yöntemlerle gösterilmesi, fundus muayenesinde optik sinirde tipik çanaklaşmanın izlenmesi ve görme alanı muayenelerinde tipik skotomların saptanmasıyla tanı konur. Ayrıca gonyoskopi ile iridokorneal açı bölgesinin değerlendirilmesi de büyük önem taşır (Gürelık, 1995).

Primer açık açılı glokom (PAAG): PAAG (Primer Açık Açılı Glokom)'da ya humör aközün yapımında fazlalık ya da dış akımında bir direnç söz konusudur. Dış akıma olan bu direnç de ya trabekulumda, "Schlemm Kanalı"na geçiştir veya venöz sisteme geçişte bir direnç vardır. Ön kamara açısı daima geniştir. Sinsi seyrettiğinden görmede bozulma, görme alanında defektler oluncaya kadar asemptomatik kalabilir. Bu yüzden rutin muayenelerde, özellikle 40 yaş üstündeki hastalarda mutlaka GİB'i ölçülmelidir. Klinik tanı için GİB, optik sinir başı ve görme

alanı titizlikle değerlendirilmelidir. PAAG progresif bir hastalık olduğundan, erken tanı önem taşır (Gürelık, 1995).



Şekil 2.21. Primer açık açılı glokom

Göz içi basıncı (GİB): İki göz arasındaki belirgin farklar ve 21mmHg'dan yüksek düzeyler glokomu düşündürmelidir. Diurnal basınç değişiklikleri olduğunda mutlaka hem sabah, hem de öğleden sonra GİB ölçümleri yapılmalıdır. Aplanasyon tonometrisi en hassas yöntemdir. Pnömatik ya da çökertme tonometreleri de GİB ölçümünde kullanılabilir (Gürelık, 1995).

Optik disk bulguları: PAAG'da optik diskin fizyolojik çukurluğunda artma (çanaklaşma) görülür. Çukurluk ile çap arasındaki oran (cup/disc, C/D) normalde 0.3 veya daha düşüktür, fakat bazen daha fazla olabilir. C/D oranındaki artış glokom tanısı için tek başına bir değer taşımaz. Glokom ilerledikçe diskin kan damarları azalır ve rengi solar. Bu bulgu daha çok önem taşır. Disk çukurluğunun tabanı nazale doğru itili olduğundan santral retinal arter ve ven nazale itilmiş görülür (Gürelık, 1995).

Görme alanı defektleri: En erken görme alanı defekti fiksasyon alanında, 10-20 dereceler arasında uzanan bir skotom, daha da sık olarak fizyolojik kör noktada uzamadır. Bu iki skotom zamanla ilerleyerek iğ şeklinde "Seidel Skotom"u yapar. Sonra bu skotom ilerler, "Bjerrium" alanında yay şeklinde bir skotom ortaya çıkar. Bu bulguların yanında periferik görme alanı bölgesinde bir nazal depresyon görülür, buna "Roénné'nin nazal stepi" denir. Olay ilerledikçe diğer retina sinir lifleri de

etkilenir ve yer yer periferik defektler belirir. Bundan sonra artık görme alanı konsantrik olarak daralmaya başlar. Terminal dönemde santralde ve temporalde görme fonksiyonlarına sahip iki küçük adacık kalır. Önce temporal adacık kaybolur, sonra santral adacık da kaybolunca hasta absölu glokoma ile görmesini tamamen kaybeder. Görme alanı muayenesinde en çok bilgisayarlı statik perimetreler kullanılmaktadır (Gürelık, 1995).

PAAG tedavisinde amaç görme fonksiyonlarını korumak, hasarları önlemektir. Medikal tedaviye dirençli olgularda Argon Laser Trabeküloplastidir ve Trabekülektomi gibi fistülizan cerrahilere başvurulabilir (Gürelık, 1995).

İlaç tedavisinde topikal beta blokerler: Humör aköz yapımını azaltarak GİB' da düşme sağlarlar. Korpus siliyarede beta reseptörlerini bloke ederek kapiller perfüzyonu ve ultrafiltrasyonu azaltırlar veya silier prosesuslara direkt etki ederek yapımı azaltırlar. Humör aközün dış akımına bir etkileri yoktur. Günümüzde PAAG tedavisinde ilk tercih edilen gruptur. Etkisi 2 saat sonra maksimuma ulaşır, 12–24 saat sürer. Günde 2 kez damlatılır. Günlük basınç fark pikleri olmaz, optik diski korur. Yan etkileri nisbeten azdır. Bradikardi ve kardiyopulmoner hastalarda dikkatli olunmalıdır. A-V Blok geçirenlerde kullanılmamalıdır. Timolol maleat % 0.25 - % 0.5, Levobunolol % 0.5, Carteolol % 1-2, Betaxolol % 0.5, Metipranolol % 0.1 - % 0.3 bu gruptandır. 'Carteolol', intrinsek sempatomimetik aktiviteye sahip non-selektif bir beta blokerdir. 'Betaxolol' kardiyoselektif bir beta blokerdir ve diğer beta blokerlere oranla daha az kardiyovasküler yan etkilere sahiptir. Betaxolol molekülleri diğer beta blokerlere oranla serumda daha az serbest dolaşırlar. Astımlı ve solunum sistemi problemi olan glockomlularda daha iyi tolere edilirler (Gürelık, 1995).

Karbonik anhidraz inhibitörleri: Bu grupta sistemik ya da topikal olarak kullanılan Asetazolamit bulunmaktadır. Sülfonamid grubu ilaçlardandır. Sodyum tutulumunu artırıp potasyum atarak, korpus siliyarede asit ortam oluşturur, bu da humör aköz yapımını azaltır. Parmak uçlarında uyuşukluk, halsizlik, iştahsızlık, empotans, bulantı, kusma gibi sistemik yan etkileri vardır. Yanında bir K⁺ preparatı ve potasyumdan zengin gıdalar vermek bu etkileri azaltır. Oral formu 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. Kanda karbondioksit birikimini arttırdığından çok risklidir, kullanılmaz. Bugün topikal formları tedavide kullanılmaktadır. İyi tolere edildiği, GİB düşürmede etkili olduğu görülmüştür. % 0.5–1–2 dozlarda 8 saat etkilidir (Gürelık, 1995).

Prostaglandinler: Latanoprost % 0.005 günde 1 defa damlatıldığında humör aköz yapımına etki etmeden dış akıma etki ettiği, özellikle uveoskleral dış akımı arttırarak GİB’i düşürmektedir. Uzun süre kullanıldığında iris rengini koyulaştırmaktadır (Gürelık, 1995).

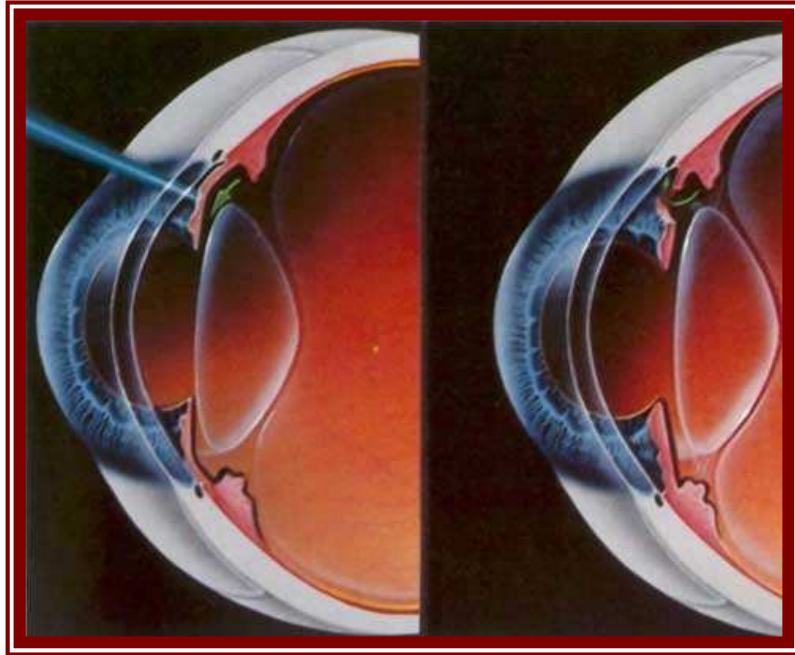
Sempatomimetikler: Alfa ve beta reseptörlere etkili sempatomimetik agonistler olup, bu grupta Epinefrin ve Dipivefrin HCl % 0.1 damlaları vardır. Dipivefrin, Epinefrinden 17 kat daha fazla kornea penetrasyonuna sahiptir. Humör aköz yapımını azalttığına inanılmaktayken son yıllarda uzun süre kullanıldığında dış akımı da düzelttiği ortaya konmuştur. Bu gurup ilaçlar lokal allerji, iritasyon, pigmentasyon, madarozis gibi yan etkilere sahiptir. Dipivefrin HCl antioksidan koruyucu madde olarak sodyum metabisülfıt içerir ve bu madde astımlı kimselerde atak yapmaktadır. Sistemik olarak, yüzde solukluk, çarpıntı, senkop, ve kan basıncında yükselme yapar. Kalp hastalarında kullanılmamalıdır (Gürelık, 1995).

Miyotikler: Tedavide fazla tercih edilmezler. Pilocarpin, asetil kolin gibi etki eden bir kolinerjiktir. Silier kasa ve iris sifinkterinde direkt stimülasyon yapar. GİB maksimal düşmesi 2–4 saat arası başlar. Total etki 4–8 saattir. En sık kullanılan doz % 2’liktir. Ön kamara açısını genişletir. Histamin benzeri madde açığa çıkartarak humör aköz geçirgenliğini arttırır. Schlem kanalı endotelinde vakuolleri arttırarak humör aközün Schlem kanalına geçmesini kolaylaştırır. İleride katarakt ameliyatı yapılacağı zaman ameliyatı güçleştirir. Bulantı, kusma, karın ağrısı, bradikardi, bronkospazm gibi yan etkileri vardır. Beta blokerlerle birlikte kullanıldığında kardiyopulmoner sisteme etkinin artacağı göz önüne alınmalıdır. Carbachol, bu grupta biraz daha uzun etkili olan bir başka ilaçtır (Gürelık, 1995).

Aproklonidin: Selektif lokal alfa 2 adrenerjik agonisttir. Humör aköz yapımını ve akımını azaltmaktadır.

Kalsiyum kanal blokerleri: Bu ilaçlar vasküler rezistansı azaltır, vasospazmı önlemeye yardımcıdır. Bu gruptan en popüler ilaçlar Diltiazem, Nifedipine ve Verapamildir. PAAG'da vasküler faktörlerin rolü ortaya çıktıkça, tedavide bu yöne ilgi başlamıştır. GİB düşürmesinin yanında, sistemik vasküler tonusu ve rezistansı azaltarak, dokuların oksijen gereksinimini düşürür ve optik siniri korur. Dış akımı arttırdığına inanılmaktadır. Çok yaygın kullanımı yoktur (Gürelık, 1995).

Lazerle tedavi: PAAG da en yaygın lazer uygulaması Argon Lazer Trabeküloplastidir. Trabekülumun ön bölümüne argon lazer ile koagulasyon yapılmaktadır. Koagulasyon odakları trabekulumda kollajen yapısını bozar, aralarında gevşeme olunca intertrabeküler aralık açılarak humör aköz dışa akımı artar. Ameliyatı kabul etmeyen, uygun ilaç tedavisine cevap alınamayan, yaşlı ve görme alanı çok dar olan PAAG'lı hastalarda yapılmaktadır. Birçok olguda GİB düşürme etkisi birkaç yıl sonra kaybolmaktadır.



Şekil 2.22. Lazerle tedavi yöntemi

Primer kapalı açılı glokom (PKAG): Ön kamara açısının kapalı olmasına bağlı ortaya çıkan bir glokom türüdür. Açık kapalı olduğu için humör aközün, mekanik bir blokaj sonucu dışa akımı zorlaşmaktadır. PKAG, kornea kurvatürünün az olması veya lensin öne doğru itili olduğu, ön-arka ekseni küçük gözlerde daha sık görülür. Hastaların çoğu hipermetroptur (Gürelık, 1995).

I) İntermittan açı kapanması glokomu

II) Kronik açı kapanması glokomu

III) Akut açı kapanması glokomu (akut glokom krizi): Ön kamara açısının tamamen kapanmasıyla akut olarak ortaya çıkar (Gürelık, 1995).



Şekil 2.23. Primer kapalı açılı glokom

Midriazise bağlı açı kapanması: Predispoze uzun süre karanlık ortamlarda bulunmak, aşırı heyecan, midriatik göz damlaları nedendir. Fundus muayenesi yapılacağı zaman midriatik damlatılmadan önce hastanın dar açılı olup olmadığından emin olunmalıdır. Aksi halde midriazis sonucu iris kökü, zaten dar olan ön kamara açısının kapanmasına yol açar (Gürelık, 1995).

Pupiller blok: Lensin şişmesi ve öne doğru gelmesi ile humör aköz arka kamaradan ön kamaraya geçerken bir direnç ile karşılaşır ve arka kamarada basınç ön kamaraya oranla yükselir. İris kökü açığı daha da daraltacak şekilde öne doğru kabarıp ve ön kamara daralır. Okumak, dikmiş dikmek gibi uzun süren yakın mesafe çalışmalar, midriyazise ve lensin öne doğru gelmesine ve pupiller bloğa yol açar. Ayrıca sıcak banyolar neden teşkil eder (Gürelık, 1995).

50–60 yaş kadınlarda daha sıktır. GİB 60–80 mmHg gibi çok yüksek değerlere çıkmıştır. Parmakla tonometri yapıldığında bu yüksek basınç nedeniyle göz taş gibi serttir. Konjonktivada derin hiperemi vardır. Kornea bulanık ve ödemlidir (buzlu cam görünümü). Ön kamara derinliği azalmış olup pupilla middilate görünümündedir

ve ışık refleksine yanıt yoktur ya da çok hafiftir. Hastalarda görme ciddi derecede azalmıştır. Gökkuşuğu tarzında ışık haloları görülebilir. Şiddetli ağrı vardır. Ayrıca mide bulantısı, kusma gibi sistemik bulgular tabloya eşlik edebilir. Akut açı kapanması glokomu acil tedavi gerektirir. Tedavi edilmediği takdirde göz ışık hissini kaybedebilir (Gürelık, 1995).

Hiperosmotik ilaçlar: GİB'ini düşürmede en etkili olan, hiperosmotik ilaçlardır. Birinci basamakta kullanılması gereken ilaçlardır. Kanın osmotik basıncını artırarak humör aközün dışa akımını artırır. Ayrıca vitreus volümünü azaltarak, lensi geriye çekerler. Böylece, pupiller blok ortadan kalkar, iris diyaframı geri çekilir, ön kamara açısı açılır. Oküler kan akımının tekrar başlaması ve iskemik durumun ortadan kalkmasıyla dokular fizyolojik koşullarda çalışabilecek hale gelir. Bu amaçla mannitol veya gliserin kullanılır. % 20'lik Mannitol 1mg/kg olmak üzere intravenöz olarak verilir. 45 dakikada gidecek şekilde verilmelidir. 200 ml verilmesi yeterli olmaktadır. Etki yarım saat içinde başlar, 4-5 saat sürer. Yaşlı erkek hastalarda prostat hipertrofisi bulunabileceği dikkate alınarak, 50-60 ml. verildikten sonra diürez olmuyorsa verilmemelidir. Gliserin 0.5-1 g/kg olmak üzere içine meyva suyu da katılarak bir defada verilir. Kusma, bulantı yaparsa ve hasta diabetikse verilmez (Gürelık, 1995).

Pilokarpine göz damlası: Hiperosmolar ajanlar kullanılıp GİB oküler kan akımı tekrar başlayıp, iskeminin azalmasıyla birlikte etkili olabilir. Miyozis yaparak ön kamara açısının düzelmesini sağlar (Gürelık, 1995).

Asetazolamit tablet : Humör aköz yapımını azalttırarak etki eder. 4x1 kullanılabilir (Gürelık, 1995).

Akut açı kapanması glokomunda medikal tedavi ile kriz atlatıldıktan sonra proflaksi amacıyla hastaya ya cerrahiyle periferik iridektomi, ya da lazer ile periferik bir iridotomi yapılmalıdır (Gürelık, 1995).

2.10.3.2. Konjenital glokom

En sık neden ön kamara açısındaki mezodermal doku kalıntısıdır (Barkan membranı). İlk 6 ay içinde semptom ve bulgu verir. En erken belirtisi lakrimasyon ve fotofobidir. Daha sonra yavaş yavaş göz büyümeye başlar. Bebekte 10–10.5 mm olan kornea çapı 12–14 mm'ye kadar ulaşır. Buna “buftalmus” denir. Olayın intrauterin hayatta sonlandığı durumlarda buftalmus doğumda belirgindir. Bebekte göz duvarları elastikiyetini devam ettirdiği için içerdeki basıncın etkisiyle göz büyümektedir ancak lens bu büyümeye katılamaz. Bu durumda iris diaframı sallanır (iridodonesis) . Ön kamara derinliği normalden geniştir. GİB yüksek olduğundan humör aköz kornea endotelinden, bozulan bariyerlerden sızar ve kornea ödemeine yolaçabilir. Konjenital glokomun tedavisi cerrahidir. Özel bıçaklarla ön kamaraya girilerek açığı örten mezodermal doku parçalanır. Bu ameliyata “gonyotomi” denir. Gerektiğinde “trabekülektomi” ameliyatı yapılır (Gürelık, 1995).

2.10.3.3. Sekonder glokomlar

Gözde bir başka patoloji sonucu ortaya çıkan GİB artışıdır. Tedavisi nedene yöneliktir (Gürelık, 1995).

İnflamasyonlara bağlı sekonder glokom: Özellikle ön üveitlerde görülen bir komplikasyondur. Akut dönemde hücre, protein ve debrisin açı bölgesini tıkaması, trabekülit gibi nedenlerle göziçi basıncı artarken geç dönemde lens ile iris arasındaki yapışıklıklar pupiller blokaja yol açar. Aynı şekilde ön kamara açısında iris kökü trabekuluma yapışır, bu periferik ön yapışıklıklarda humör aközün dış akımını engeller. Ayrıca humör aközün yapısına karışan iltihap hücreleri, geçirgenliği bozarak dış akımı engeller (Gürelık, 1995).

Neovasküler glokom: Genellikle ileri proliferatif diabetik retinopati veya santral retinal ven tıkanıklıklarında neovaskülarizasyonun irise ve ön kamara açısına yayılmasıyla dışa akım güçleşir ve medikal tedaviye dirençli, ciddi bir glokom tablosu ortaya çıkar. Fundusun görülebildiği ve retinanın yatışık olduğu durumlarda panretinal lazer uygulaması ya da krioterapi ile iskemik alanlar yok edilerek

neovaskularizasyon yok edilebilir. Bu yapılamazsa cerrahi olarak drenaj implantları ile dış akımın sağlanması yoluna gidilebilir (Gürelık, 1995).

Travmalara bağlı sekonder glokom: Özellikle künt travma sonucu ön kamaraya yoğun kanama (hifema) olur ve bunun humor aköz drenajını engellemesiyle GİB yükselir (Gürelık, 1995).

Tümörlere bağlı sekonder glokom: Göz içi tümörleri yine açđ bölgesine basıyla humor aközün dolaşımını ve dış akımını engelleyerek GİB yükselmesine neden olur (Gürelık, 1995).

Steroid glokomu: Özellikle lokal olarak kullanılan steroidli damlaların, 1–1.5 ay gibi uzun süre kullanılmasıyla trabekülumda ara madde kompozisyonunu değiştirerek aközün dışı akımına karşı direnç oluşturur. İlaç kesilse bile GİB düşmeyebilir, trabeküektomi gibi fistülizan bir cerrahi gerekebilir (Gürelık, 1995).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

- Cam malzeme olarak; tek, iki ve üç boyunlu çeşitli ebatlarda balon, geri soğutucu, huni, adaptör, erlen, beher, büret, deney tüpü, kılcal boru ve mezürler.
- Manyetik karıştırıcı, manyetik balık.
- Spor, kısıkaç.
- Yağ banyosu, su banyosu.
- Termometre.
- Buzdolabı.
- Baget, piset, puvar, pipet.
- İnce tabaka kromatografisi (TLC) için TLC alüminyum plakalar DC-Alufohlen 60 F 254 TLC (Merck).
- UV spektroskopisi için Quartz küvetler.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- **UV Lambası:** Camag UV-Lamb (254-366 nm).
- **Hassas Terazî:** 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:** Shimadzu UV Mini 1240 UV-Vis Spektrometre.
- **¹H NMR:** BRUKER DPX-400, 400 MHz Dijital FT–NMR Spektrometre.
- **Manyetik Karıştırıcı:** Heidolph MR 3001.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

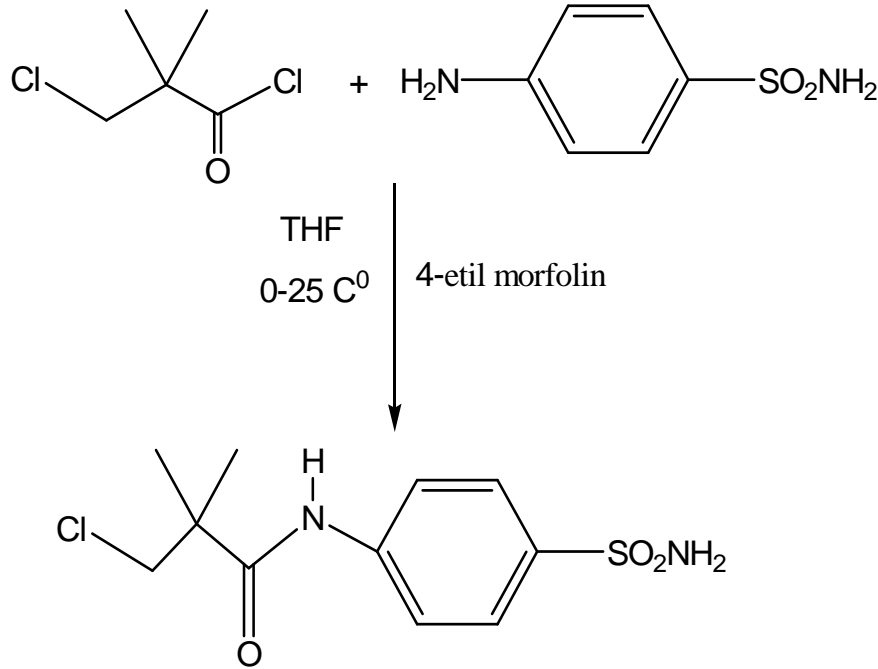
- **Asetazolamit ve Sülfanilamit:** Yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezinde ilk basamakta başlangıç maddesi olarak kullanıldı (Merck, Aldrich).
- **3-kloropivaloiklorür:** 4-(3-kloro-2,2-dimetil propanoil amino) - benzen sülfonamit, 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit ve 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit sentezlerinde kullanıldı(Merck).
- **3-kloroakriloiklorür:** 4- (akriloilamino) benzen sülfonamit ve 2-(akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit sentezlerinde kullanıldı(Merck).
- **3-klorometakriloiklorür:** 4- (metakriloilamino) benzen sülfonamit ve 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit sentezlerinde kullanıldı (Merck).
- **Morfolin:** Karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezinde son basamakta kullanıldı (Merck).
- **Pirrolidin:** Karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezinde son basamakta kullanıldı (Merck).
- **HCl:** Asetazolamitin asidik ortamda hidroliz basamağında ve tampon çözelti hazırlanmasında pH ayarında kullanıldı (Fluka).
- **Etil alkol:** Hidroliz basamağında ve ürünü kristallendirme aşamalarında kullanıldı (Merck).
- **Tetrahidrofur (THF):** Sentez basamaklarında çözücü olarak kullanıldı (Merck).
- **Etilasetat:** TLC analizlerinde ve ürünlerin saflaştırılmasında kullanıldı (Merck).
- **Dietileter:** Bölme katsayısı ölçümlerinde (P_{eter}) ve sentezlenen maddelerin kristallendirilmesinde kullanıldı (Birpa).
- **Trietilamin (TEA):** Baz olarak kullanıldı (Aldrich).
- **Metil alkol:** TLC analizlerinde çözücü olarak kullanıldı (Ak Kimya).
- **Diklormetan (DCM):** TLC analizlerinde çözücü olarak kullanıldı (Merck).
- **Hekzan:** TLC analizlerinde çözücü olarak kullanıldı (Ak Kimya).
- **Aseton:** Cam malzemelerin temizliğinde kullanıldı.

- **Kalsiyumklorür (CaCl₂):** Nem tutucu olarak kullanıldı.
- ***p*-nitrofenilasetat:** Biyolojik çalışmada substrat çözeltisi hazırlamak için kullanıldı (Aldrich).
- **Tris(hidroksimetil)aminometan:** TRIS tamponunun hazırlanmasında kullanıldı (Aldrich).

3.2. Yöntem

3.2.1. Sentez

3.2.1.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino) - benzen sülfonamid (1)'in sentezi

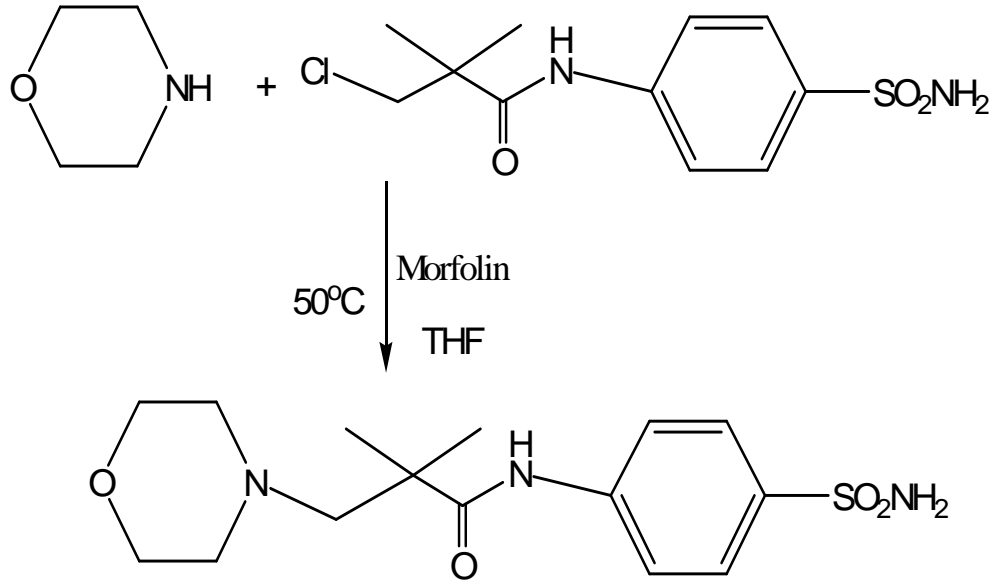


Şekil 3.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1)'in sentezi

4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1) bileşiğini sentezlemek amacıyla 250 ml lik çift boyunlu balona alınan sülfanilamid (8 g, 0.0465 mol) 100 ml THF'de çözüldü. Balona 4-etil morfolin bileşiği (4.82 g, 0.056 mol), ilave edildi ve 3-kloro pivaloilklorür (6.5 g, 0.056 mol) 20 ml THF de çözümlenerek reaksiyon balonuna damla damla ilave edildi. Reaksiyon manyetik karıştırıcıda devamlı karıştırmak suretiyle ilk 24 saat oda sıcaklığında devam etti. Reaksiyon gidişatı TLC analizleri (etilasetat) ile kontrol edildi. TLC analizi ile reaksiyonun bittiği gözlemlendi. Süzülerek tuz ayrıldı. Çözücü evaporatör ile uzaklaştırıldı ama

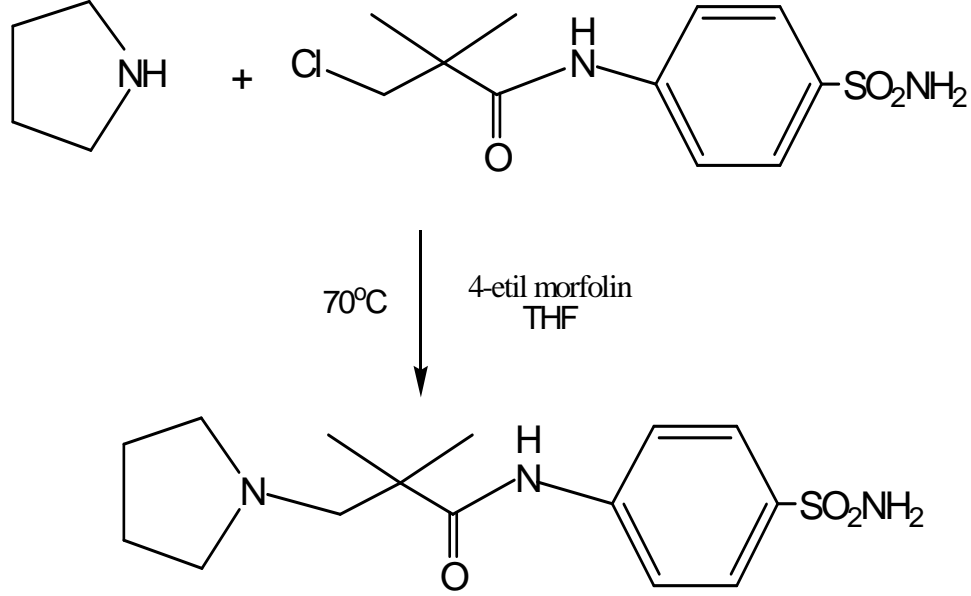
yoğun sarımsı bir sıvı kaldı. Üzerine DCM çözücüsü ilave edilince beyaz bir çökelek oluştu. Safsızlık süzülerek uzaklaştırıldı. Eser miktarda safsızlık ihtiva ettiği için Et-OH'ta çözüldü ve kristallendirildi. Ürün saf olarak % 80 verimle elde edildi. Erime noktası: 178-183.

3.2.1.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (2)'nin sentezi



Şekil 3. 2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (2)'nin sentezi

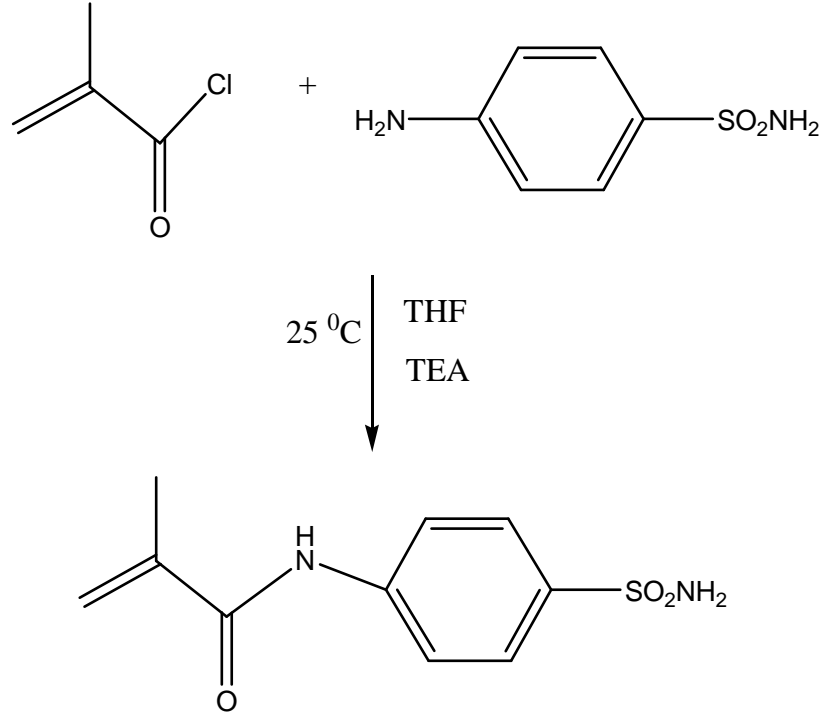
250 ml'lik şilifli bir balona 0.5 g 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1) eklendi ve üzerine 60 ml THF eklenerek manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak çözüldü, daha sonra 40 ml THF'de çözülen 0.1 ml morfolin oda sıcaklığında damla damla eklendi. Bir gün sonra TLC'ye (DCM : etilaseta / 5 : 1) bakıldı çok az ürün oluştuğu gözlenince sıcaklık 50 °C'ye çıkarıldı. 2 hafta sonra TLC'de aynı çözücüyle yapılan yürütmede çok az bir başlangıç maddesi gözlemlendi. Reaksiyonun çok yavaş ilerlediği gözlemlendi. 0.05 ml daha morfolin eklendi. Belirli aralıklarla reaksiyonun gidişatı TLC ile gözlemlendi. 6 hafta sonra reaksiyonun tamamen bittiği gözlemlendi. Çözücü buharlaştırıldı. Kalan madde etil alkolde kristallendirilmeye bırakıldı. Verim % 60, erime noktası 230–235 °C ve kapalı formülü C₁₅H₂₃N₃O₄S'tir.

3.2.1.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino) - benzen sülfonamit (3)'ün sentezi

Şekil 3.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (3)'ün sentezi

4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (3) bileşiğini sentezlemeyi amaçladığımız bu reaksiyonda 250 ml lik çift boyunlu balona (1 g; 0.0035 mol) 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (1) 35 ml THF de çözülerek üzerine 4-Etil morfolin (0.4 g; 0.004 mol) eklenerek karıştırıcıda karıştırıldı. Tamamen çözülmüş olan maddenin üzerine ayrı bir balonda 15 ml THF'de çözülmüş pirrolidin (0.3 g; 0,004 mol) reaksiyon balonuna damla damla ilave edildi. Reaksiyon manyetik karıştırıcıda devamlı karışmak suretiyle ilk 24 saat oda sıcaklığında ikinci 24 saat 50°C de devam ettirildi. Reaksiyon gidişatı sürekli TLC analizleriyle (DCM : metanol / 5:1) ile kontrol edildi reaksiyon tamamıyla oluşmadığından tekrar pirrolidin (0.06 g, 0.0008 mol) THF de çözülerek reaksiyon balonuna damla damla ilave edildi. Reaksiyonun TLC analizinde (DCM:metanol/5:1) reaksiyonun yavaş ilerlediği gözlemlendi ve sıcaklık 70 °C ye çıkarıldı. Beşinci haftanın sonunda reaksiyonun tamamlandığı gözlemlendi. Tuz süzülerek ayrıldı. Çözücü evaporatör ile uzaklaştırıldı. Sentezlenen madde etilalkolde kristallendirildi. % 63 verimle ürün elde edildi. Erime noktası: 232–236 °C.

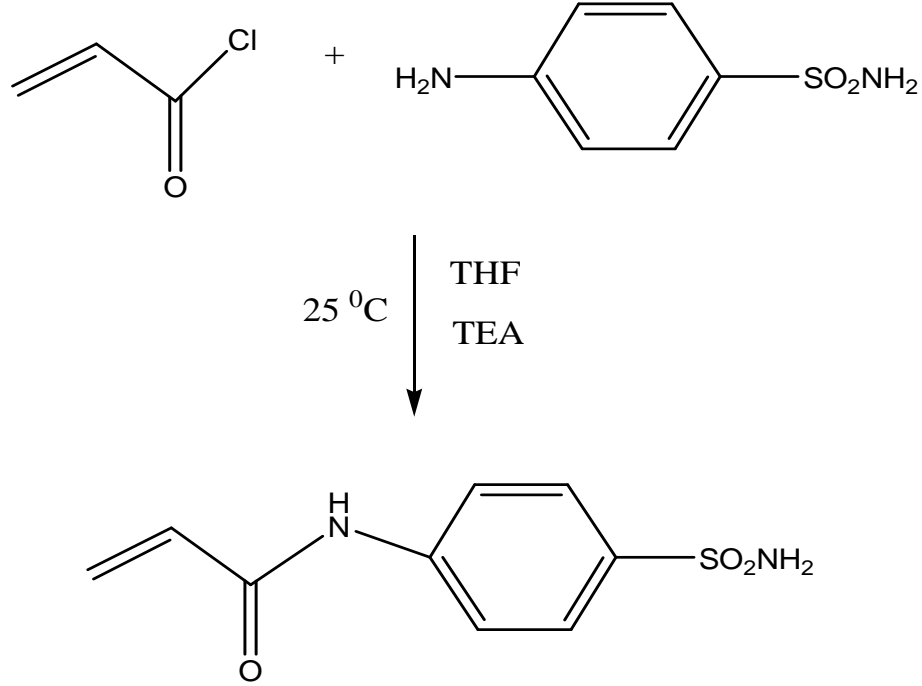
3.2.1.4. 4-(metakriloilamino)-benzen sülfonamit (4)'ün sentezi



Şekil 3.4. 4- (metakriloilamino)-benzen sülfonamit (4)'ün sentezi

5 g sülfonamit bileşiğinden alındı. Yeterince (50 ml) THF'de çözüldü. Üzerine TEA'dan 4.88 ml eklendi. Daha sonra 15 ml THF'de hazırlanmış Metakroil klörür (4.55 g) çözeltisinden ilave edildi. Oda koşullarında başlatılan reaksiyon hızlı bir şekilde tamamlandı. Reaksiyonun gidişatı TLC analizleriyle gözlemlendi. Tamamlanan reaksiyonun tuzu ayrıştırıldı. Çözücüsü buharlaştırılarak kristallendirildi. Madde % 79 verimle elde edildi. Erime noktası: 228–232 °C.

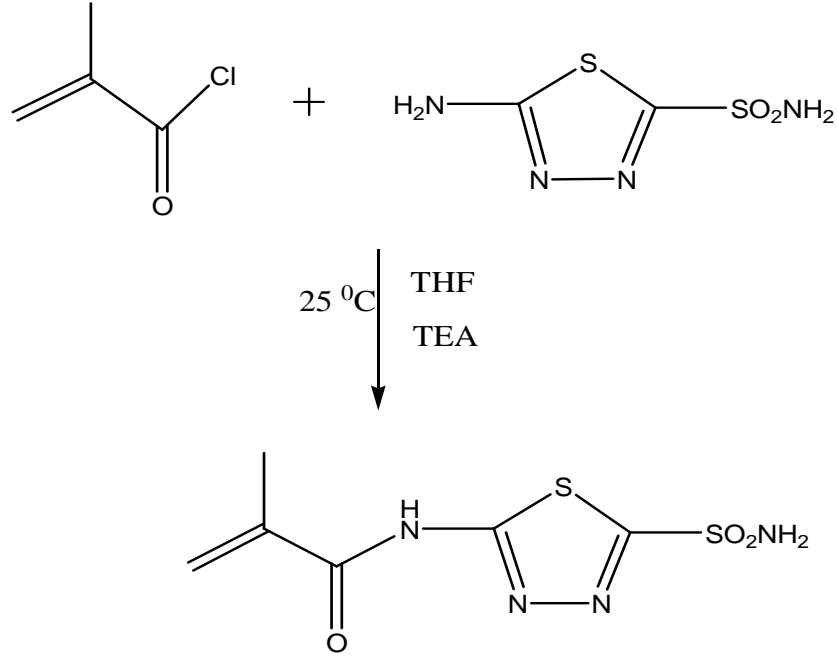
3.2.1.5. 4- (akriloilamino)-benzen sülfonamit (5)'in sentezi



Şekil 3.5. 4- (akriloilamino)-benzen sülfonamit (5)'in sentezi

2 g sülfanilamit bileşiği tartıldı. Çift boyunlu balonda 50 ml THF'de çözülerek 1.4 ml TEA maddesi ilave edildi. 15 ml THF'de çözelti haline getirilmiş Akriloil klörür (1.945 ml) çözeltisinden damla damla ilave edildi. Oda sıcaklığında başlatılan reaksiyon belli araklıklarla TLC analizleriyle gözlemlendi. 48 saat sonra reaksiyonun tamamen bittiği gözlemlendi. Elde edilen maddenin tuzu ayrıştırılarak çözücüsü buharlaştırıldı. Madde etil alkol (5 ml), DCM (15 ml) karışımında kristallendirildi. Kristallendirme sonucu % 65 verimle madde elde edildi. Erime noktası: 226–229 °C.

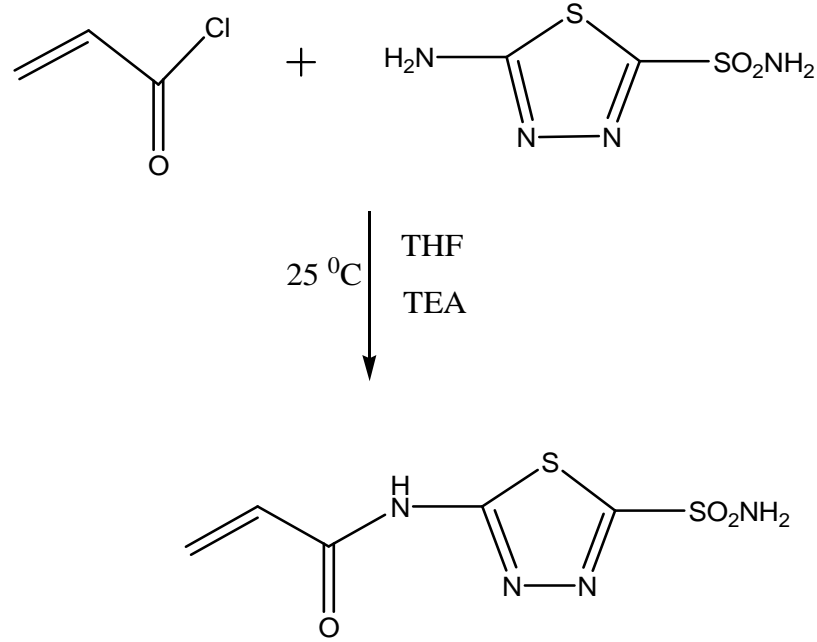
3.2.1.6. 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)'nın sentezi



Şekil 3.6. 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)'nın sentezi

0.5 g asetazolamit bileşiğinden alındı. Yeterince (50 ml) THF'de çözüldü. Üzerine TEA den 0.46 ml eklendi. Daha sonra 15 ml THF'de hazırlanmış metakriloil klörür (4.55 g) çözeltisinden ilave edildi. Oda koşullarında başlatılan reaksiyon 24 saat sonra tamamlandı. Reaksiyonun gidişatı TLC analizleriyle gözlendi. Tamamlanan reaksiyonun tuzu ayrıştırıldı. Çözücüsü buharlaştırılarak kristallendirildi. Madde % 70 verimle elde edildi. Erime noktası: 252–256 °C.

3.2.1.7. 2-(akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (7)'nin sentezi



Şekil 3.7. 2- (akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (7)'nin sentezi

1 g asetazolamit bileşiğinden alındı. Yeterince (50 ml) THF'de çözüldü. Üzerine TEA çözeltisinden eklendi. Daha sonra 15 ml THF'de hazırlanmış akriloil klörür (0.5 g) çözeltisinden ilave edildi. Reaksiyon başlatıldı. Oda koşullarında başlatılan reaksiyon hızlı bir şekilde tamamlandı. Tamamlanan reaksiyonun tuzu ayrıştırıldı. Çözücüsü buharlaştırılarak kristallendirildi. Madde % 83 verimle elde edildi. Erime noktası: 220–230 °C.

3.2.2. Biyolojik çalışma

Biyolojik çalışmalar sentezlenen maddelerin aktivitesini değerlendirmek için yapılan incelemelerdir. Genelde inhibitörlerin birbiriyle kıyaslanmasında iki sabit vardır bunlar; inhibitör enzim ayrışma sabiti olan K_i ve inhibitör enzim bağlanma sabiti olan IC_{50} 'dir. Glokom tedavisinde göz içi basıncının düşürülmesinde kullanılan sülfonamidlerden asetazolamitin, sülfanilamitin ve yeni sentezlenen bileşiklerin in vitro inhibitör etkileri incelenmiştir. Elde edilen yeni bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayısı ve inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. İnhibitör aktivitesi IC_{50} , bölme katsayısı P_{eter}/P_{su} , sudaki çözünürlüğü ise g/100 ml olarak verilmiştir.

3.2.2.1. Bölme katsayısı ölçümü

Bölme katsayısı ölçümünde asetazolamit sülfanilamit ve sentezlenen maddelerin eter-su çözücü sistemi kullanılarak Hansch (1964) tekniği ile ölçülmüştür. Bölme sayısı aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$P = C_o/C_w(1-\alpha) \quad (3.1)$$

Burada P: bölme katsayısı C_o : bileşiğin eter fazındaki konsantrasyonu C_w : bileşiğin su fazındaki konsantrasyonu α : bileşiğin sudaki dissosiyasyon derecesi. Göz içi dokulara iyi dağılım olması için bölme katsayısı değeri en az 0.01 olmalıdır. Asetazolamitin bölme katsayısı 0.14'dür. Sentezlenen bileşiklerden beklenen sonuç daha yüksek bölme katsayısı değerleridir.

3.2.2.1.1. Bölme katsayısının belirlenmesi

Sentezlenen bileşiklerin eter ve su fazlarındaki bölme katsayılarının belirlenmesi için öncelikle bileşiklerin mM konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı. İlk aşamada hazırlanan çözeltilerin bir kısmıyla UV-VIS spektrometrede bileşiklerin devamlı seyreltilen konsantrasyonlarında 200-400 nm aralıkta spektrum taraması yapıldı. Elde edilen konsantrasyon, absorpsiyon değerleri Excel de grafiğe döküldü ve standart grafikler çizildi. Bu işlem sonucunda grafiğin doğrusal olduğu gözlemlendi. İkinci aşamada bileşiklerin çözeltilerine eşit hacimde dietileter ilave edilerek 5 dakikadan az olmamak koşuluyla devamlı çalkalanarak ekstraksiyon yapıldı. Faz ayrımı yapılarak su ve eter fazları ayrıldı. Su fazının spektrum taraması yapıldı, eter fazında dietileter uçurularak ihtiva ettiği maddenin eşit hacimde su ile çözünmesi sağlandı ve spektrum taraması yapıldı. Elde edilen absorpsiyon sonuçlarının grafiğe yerleştirilmesi ile bölme katsayısı sonuçları formül 3.2. ile hesaplandı.

$$P = P_{eter}/P_{su} = (Eter)/(Su) \quad (3.2)$$

3.2.2.2. İnhibitörlerin sudaki çözünürlüklerinin hesaplanması

KAI'leri suda iyi çözülmelidir. Etkili bir inhibitörün %1'lik çözeltide iyi çözünmesi gerekmektedir. Sudaki çözünürlüğün hesaplanmasında, sentezlenen

maddeler tartılarak tüplere alındı. 24.5 °C'de 30 dakikadan az olmamak şartıyla su banyolu çalkalayıcıda çözünmesi sağlandı, çözünmeyen madde miktarı hesaplandı ve çözünürlük değeri g/100 ml su şeklinde verildi.

3.2.2.3. Sentezlenen bileşiklerin IC₅₀ değerlerinin saptanması

İnhibitörlerin aktivitesi IC₅₀ değeri ile ifade edilir. IC₅₀ değeri enzimin % 50'sinin inhibe olması için gerekli olan inhibitörün konsantrasyonudur. Bu değer saptanması için Aldrich Company'den sağlanan Bovine Karbonik Anhidraz Enzimi kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalara uygun olarak inhibitör aktivitelerinin ölçümünde 348 nm dalga boyunda enzimin etkisiyle *p*-nitro fenilasetatın hidrolizi incelenmiştir. Burada hidroliz sonunda *p*-nitrofenol oluşmaktadır (Pocker ve ark., 1967). Erel ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmalarda *p*-nitrofenolün pH 7.7 ile 9.1 arasında 400 nm dalga boyundaki maksimum absorpsiyonunun 348 nm dalga boyundakinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle bizim yaptığımız çalışmalarda, sentezlenen bileşiklerin inhibitör aktivite ölçümleri, ideal pH olan 8.3 de 348 nm yerine 400 nm dalga boyunda Erel yöntemi kullanılarak yapıldı.

3.2.2.4. Tampon çözeltinin hazırlanması

İnhibitör aktivitelerinin ölçülmesinde pH 8.3 olan 0.5 mol/L konsantrasyonunda TRIS tamponu kullanılmıştır. Bunun için Tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) tamponu 6.06 g 0.05 mol 100 ml deiyonize suda çözüldü HCl damla damla ilave edilerek pH metre yardımıyla pH 8.3'e ayarlandı.

3.2.2.5. Substrat ve enzim solusyonunun hazırlanması

p-nitrofenil asetat (0.0275 g, 0.1518 mol) 1ml asetonda çözüldü ve deiyonize su ile karıştırılarak 50 ml'ye tamamlandı. Son konsantrasyon 3.0 mmol/L oldu. Enzim solusyonu 5 mg bovine karbonik anhidraz enzimi, pH 8.3 olan 10 ml tris tamponunda çözülerek hazırlandı.

3.2.2.6. IC₅₀ değerinin saptanması

Asetazolamit, sülfanilamit ve sentezlenen yeni bileşiklerin inhibitör aktiviteleri Bovine Karbonik Anhidraz enzimi üzerinde araştırılmıştır. Bunun için; standart (1000 µg/ml, Sigma) olan Bovine Karbonik Anhidraz Enzimi, Substrat olarak 3.0 mmol/L *p*-nitrofenil asetat kullanıldı, asetazolamit, sülfanilamit ve sentezlenen yeni bileşiklerin saf su içerisinde 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mM konsantrasyonları hazırlandı.

Blank için bir tane 400 nm de absorbans vermeyen küvet alındı bu küvet içerisine 1000 µl tris tamponundan + 100 µl saf su + 100 µl enzim kaynağından konuldu. Hazırlanan blank küveti UV-VIS'e konuldu ve 75. saniyede üzerine karbonik anhidraz enziminin substratı 100 µl *p*-nitrofenilasetat solusyonu eklendi 100. sn den sonra her 50 saniyede bir 400 nm'de absorbans ölçüldü. 600. saniyeye kadar reaksiyon kinetiği gözlemlendi.

İnhibitörlerin enzime karşı absorbansı etkilemesi incelendi bunun için: küvet içerisine 1000 µl tris tamponundan + 100 µl inhibitör + 100 µl enzim kaynağından konuldu. Hazırlanan çözelti küveti UV-VIS' e konuldu ve 75. saniyede üzerine karbonik anhidraz enziminin substratı 100 µl *p*-nitrofenilasetat solusyonu eklendi. 100. sn den sonra her 50 saniyede bir 400 nm'de absorbans ölçüldü. 600. saniyeye kadar reaksiyon kinetiği gözlemlendi. Bu çalışma maddelerin 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mM konsantrasyonları için ayrı ayrı uygulandı ve ortalamaları alındı. Excelde inhibitör aktiviteleri regresyon analiz metoduyla hesaplandı ve sonuçlar IC₅₀ olarak verildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sentezlenen Maddelerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması

4.1.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamid (1)

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.1.'de anlatılmıştır. Sentezlenen bu madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözeltili karışımlarında yürütülmüştür. Reaksiyonun tamamlandığı başlangıç maddesinin tamamen kaybolmasıyla anlaşılmıştır.

Elde edilen 1 nolu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri ile alınmıştır. Ek Şekil 1.1.'de maddenin IR spektrumu verilmiştir. Spektrumda 3351 ve 3319 cm^{-1} SO_2NH_2 grubu ($-\text{NH}_2$) piklerinden kaynaklanmaktadır. 3265 cm^{-1} de (N-H) piki görülmektedir. Aromatik (C-H) pikleri 2980 cm^{-1} de, alifatik (C-H) 2933 cm^{-1} de gözlenmektedir 1661 cm^{-1} de gözlenen keskin pik (C=O) aittir. (C=N) 1593 cm^{-1} de keskin bir pik vermiştir. 1525 cm^{-1} de gözlenen pik aromatik (C=C) pikleridir. 1319 cm^{-1} (C-N) gerilmesi, 1158 - 1094 cm^{-1} aromatik (C-H) düzlem içi eğilmeleridir. Ayrıca 729 cm^{-1} de (C-Cl) piki gözlenmektedir. Gözlenen bu pikler Şekil 3.1.'de önerilen yapıyı desteklemektedir.

(1) nolu bileşiğin DMSO- d_6 içerisindeki ^1H NMR spektrumu Ek şekil 2.1.'de verilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde 9.67 ppm'deki singlet pikin $-\text{CONH}-$ protonundan kaynaklandığı görülür. 7.74 - 7.81 ppm'deki multipllet pikler aromatik protonlardan kaynaklanmıştır. Ayrıca $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grubundan dolayı 7.28 ppm'de singlet pik ortaya çıkmıştır. 3.87 ppm'deki pik $-\text{CH}_2\text{Cl}$ protonlarından kaynaklanmaktadır. $-\text{CH}_3$ gruplarından kaynaklanan pik ise 1.31 ppm'de çıkmaktadır. Çıkan pikler Şekil 3.1.'de verilen yapıyı desteklemektedir.

4.1.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (2)

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.2.'de anlatılmıştır. Madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözeltileri karışımlarında yürütülmüştür. Reaksiyonun tamamlandığı başlangıç maddesinin tamamen kaybolmasıyla anlaşılmıştır.

Bu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleriyle alınmıştır. 2 nolu bileşiğin spektrumu Ek Şekil 1.2.'de verilmiştir. Yapıyı aydınlatan pikler şunlardır: 3379 ve 3242 cm^{-1} 'deki amin N-H pikleridir. 1729 cm^{-1} (C=O) grubuna ait pik gerilmesidir. 1596 cm^{-1} 'deki gerilme ise N-H gerilmesine aittir. 1503 cm^{-1} de çıkan pik aromatik C-C gerilmesinden kaynaklanan piklerdir. 1157 cm^{-1} 'deki gerilme ise siklik eterden kaynaklanan alifatik düzlem içi gerilmesine ait piktir. 1338 cm^{-1} 'deki pik SO_2 grubuna ait asimetrik gerilmedir. Gözlenen bu pikler şekil 3.2.'de önerilen yapıyı desteklemektedir.

(2) nolu bileşiğin DMSO-d_6 içerisindeki ^1H NMR spektrumu Ek şekil 2.2.'de verilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde 7.31 ppm'deki $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ protonundan kaynaklandığı görülür. 7.82-7.42 ppm'deki multiplet pikler aromatik protonlardan kaynaklanmıştır. Yapıdaki $-\text{CONH}-$ protonundan kaynaklanan pik DMSO-d_6 çözücüsünün pikinden dolayı görünmemektedir. 3.58-3.48 ppm'deki pikler morfolindeki $-\text{CH}_2-$ protonlarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca $-\text{NOCH}_2-$ protonlarından dolayı 2.53 ppm'de pik ortaya çıkmıştır. 1.32 ppm'de çıkan pik ise $-\text{CH}_3$ protonlarından kaynaklanmaktadır.

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

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.3.'te anlatılmıştır. Madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözeltileri karışımlarında yürütülmüştür. Reaksiyonun tamamlandığı başlangıç maddesinin tamamen kaybolmasıyla anlaşılmıştır.

(3) maddesinin IR spektrumu KBr tableleri içerisinde alındı. Bu bileşiğin IR spektrumu Ek Şekil 1.3.'te verilmiştir. Gözlenen spektrum değerleri yapıyı desteklemektedir. 3306, 3218 ve 3129 cm^{-1} 'deki pikler N-H gerilmelerinden kaynaklanan piklerdir. 2963, 2920 ve 2868 cm^{-1} 'deki pikler alifatik C-H

gerilmelerinden kaynaklanır. 1721 cm^{-1} 'deki pik C=O gerilmesinden gelir. 1592 ve 1502 cm^{-1} 'deki pikler aromatik C=C gerilmelerinden kaynaklanır. 1396 ve 1333 cm^{-1} 'deki pikler alifatik C-H simetrik ve asimetrik düzlem içi eğilmelerinden kaynaklanan piklerdir. 1094 cm^{-1} 'deki pik SO_2 asimetrik gerilim pikidir. 1155 cm^{-1} 'deki pik SO_2 simetrik gerilmesinden kaynaklanır. Gözlenen bu pikler şekil 3.3.'te önerilen yapıyı desteklemektedir.

(3) nolu bileşiğin DMSO- d_6 içerisindeki ^1H NMR spektrumu Ek şekil 2.3.'te verilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde 7.30 ppm'deki pik $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ protonundan kaynaklanmaktadır. 7.82-7.42 ppm'deki pikler aromatik protonlardan dolayı çıkmıştır. Yapıdaki $-\text{CONH}-$ protonundan kaynaklanan pik DMSO- d_6 çözücüsünün pikinden dolayı görünmemektedir. 3.56-3.36 ppm'deki pikler $-\text{CH}_2\text{N}-$ protonlarından kaynaklanmaktadır. 2.55 ppm'de $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ grubundan pik ortaya çıkmıştır. 1.32 ppm'de çıkan pik ise $-\text{CH}_3$ protonlarından kaynaklanmaktadır.

4.1.4. 4-(metakriloilamino)-benzen sülfonamit (4)

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.4.'te anlatılmıştır. Sentezlenen bileşiğin yapısı çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözelti karışımlarında yürütülmüştür. Başlangıç maddesinin tamamen tükenmesiyle reaksiyonun tamamlandığı anlaşılmıştır.

Bu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleriyle alınmıştır. (4) nolu bileşiğin spektrumu Ek Şekil 1.4.'te verilmiştir. Spektrumda 3335 cm^{-1} deki geniş pik $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grubundaki ($-\text{NH}_2$) piklerinden kaynaklanmaktadır. 2966-2931 cm^{-1} deki pikler alifatik (C-H) grubundan kaynaklanır. 1520 cm^{-1} de aromatik (C-H) pikleri gözlenmektedir 1733 cm^{-1} de gözlenen pik (C=O) aittir. 1472-1398 cm^{-1} de gözlenen pikler aromatik (C=C) pikleridir. 1338 cm^{-1} (C-N) gerilmesi, 1142-1036 cm^{-1} aromatik (C-H) düzlem içi eğilmeleridir. Gözlenen bu pikler Şekil 3.4.'te önerilen yapıyı desteklemektedir.

(4) nolu bileşiğin DMSO- d_6 içerisindeki ^1H NMR spektrumu Ek Şekil 2.4.'te verilmiştir. Spektrum incelendiğinde 10.04 ppm'de $\text{C}=\text{ONH}$ protonundan kaynaklanan singlet pik görülmektedir. 7.84-7.74 ppm de görülen multipllet pik

aromatik $-\underline{\text{C}}\text{H}-$ lardan kaynaklanan 4H'i göstermektedir. 7.29 ppm de $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ yapısındaki protonlardan kaynaklanan pikler görülmektedir. 5-6 ppm arasında çıkan pik ise $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ yapısındaki protondan kaynaklanmaktadır. $-\text{CH}_3$ 'deki protonlardan kaynaklanan pikler 1.51 ppm'de çıkmıştır.

4.1.5. 4-(akriloilamino)-benzen sülfonamit (5)

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.5.'te anlatılmıştır. Sentezlenen bileşiğin (5) yapısı çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözeltili karışımlarında yürütülmüştür. Reaksiyonun tamamlandığı başlangıç maddesinin tamamen kaybolmasıyla anlaşılmıştır.

Bu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleriyle alınmıştır. Bu bileşiğin IR spektrumu şekil 3.5'teki yapıyı desteklemektedir. Yapıyı destekleyen titreşim bandları şunlardır: 3262-3168 cm^{-1} deki pikler $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grubundaki ($-\text{NH}_2$) piklerinden kaynaklanmaktadır. 2920-3020 cm^{-1} deki pikler alifatik (C-H) grubundan kaynaklanır. 1665-1625 cm^{-1} de gözlenen pikler alifatik (C=O) aittir. 1521-1456 cm^{-1} de gözlenen pikler aromatik (C=C) pikleridir. 1356 cm^{-1} (C-N) gerilmesi, 1168-1087 cm^{-1} aromatik (C-H) düzlem içi eğilmeleridir. Gözlenen bu pikler Şekil 3.5.'te önerilen yapıyı desteklemektedir.

4.1.6. 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.6.'da anlatılmıştır. Sentezlenen bileşiğin (6) yapısı çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözeltili karışımlarında yürütülmüştür. Reaksiyonun tamamlandığı başlangıç maddesinin tamamen kaybolmasıyla anlaşılmıştır.

Elde edilen 6 nolu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri ile alınmış ve Ek Şekil 1.6.'da gösterilmiştir. Bu maddenin IR spektrumu Şekil 3.6.'da verilen yapıyı desteklemektedir. Spektrumda tiyadiazol halkasına bağlı ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$) grubu ($-\text{NH}_2$) den kaynaklanan 3339 ve 3191 cm^{-1} keskin iki pik ve (N-H) dan kaynaklanan 3113 cm^{-1} de bir pik görülmektedir. 2361-2317 cm^{-1} alifatik (C-H) gerilme pikleridir. 1678 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$) dan kaynaklanan gerilim bandı şiddetli keskin pik verir. ($-\text{C}=\text{C}-$) 1628

cm^{-1} de pik verir. ($-\text{S}=\text{O}$) 1162 cm^{-1} de, ($-\text{C}=\text{N}$) 1537 cm^{-1} de şiddetli gerilme piki verir. 1410 cm^{-1} alifatik ($-\text{CH}$) düzlem içi eğilmeleri görülür. 1314 cm^{-1} de ($\text{C}-\text{N}$) gerilmesi gözlenir. 832 cm^{-1} de SO_2NH_2 grubu ($-\text{SO}_2$) asimetrik gerilmesi gözlenmektedir. Gözlenen bu pikler Şekil 3.6.'da önerilen yapıyı desteklemektedir. Açıklanan bu spektroskopik sonuçlar sentezlenen bileşiğin doğruluğunun kanıtıdır.

(6) nolu bileşiğin DMSO- d_6 içerisinde ^1H NMR spektrumu Ek Şekil 2.5.'te verilmiştir. Spektrum incelendiğinde 8.37 ppm 'de $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ piki görülmektedir. $5.6-6.3 \text{ ppm}$ de görülen pikler $-\text{C}=\text{CH}_2$ kaynaklanan 2H 'i göstermektedir. 2.52 ppm 'de görülen pik ise $-\text{CONH}-$ protonundan kaynaklanmaktadır. 1.99 ppm de görülen pik $-\text{CH}_3$ 'deki protonlardan kaynaklanmaktadır.

4.1.7. 2-(akriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (7)

Bileşiğin sentezlenme aşaması bölüm 3.2.1.7.'de anlatılmıştır. Sentezlenen bileşiğin yapısı çeşitli teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Madde ince tabaka kromatografisinde çeşitli çözelti karışımlarında yürütülmüştür, gözlenen tek spot maddenin olduğunu göstermektedir.

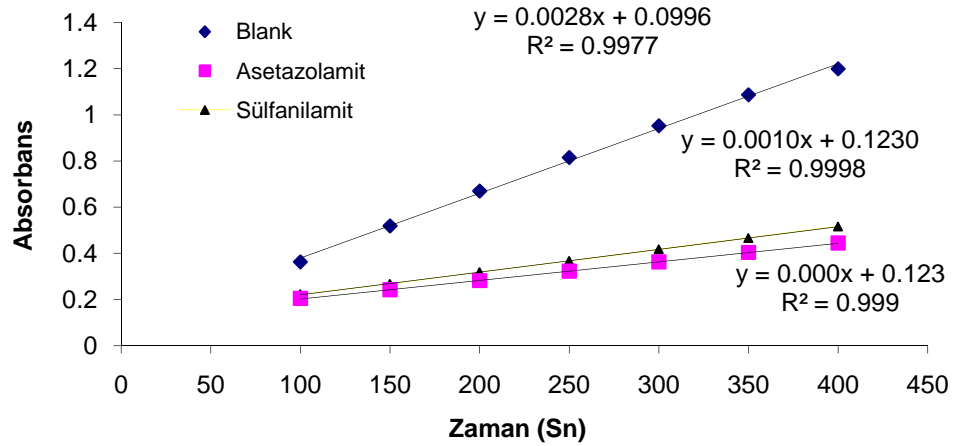
Sentezlenen 7 nolu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri ile alınmış ve Ek Şekil 1.7.'de gösterilmiştir. Spektrumda tiyadiazol halkasına bağlı ($-\text{SO}_2\text{NH}_2$) grubu ($-\text{NH}_2$) den kaynaklanan 3347 ve 3245 cm^{-1} keskin iki pik ve ($\text{N}-\text{H}$) dan kaynaklanan 3146 cm^{-1} de bir pik görülmektedir. $2337-2361 \text{ cm}^{-1}$ alifatik ($\text{C}-\text{H}$) gerilme pikleridir. 1695 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$) dan kaynaklanan gerilim bandı şiddetli keskin pik verir. ($-\text{C}=\text{C}-$) $1556-1489 \text{ cm}^{-1}$ de pik verir. ($-\text{S}=\text{O}$) 1174 cm^{-1} de, ($-\text{C}=\text{N}$) 1344 cm^{-1} de şiddetli gerilme piki verir. Gözlenen bu pikler Şekil 3.7.'de önerilen yapıyı desteklemektedir. Açıklanan bu spektroskopik sonuçlar sentezlenen bileşiğin doğruluğunun kanıtıdır.

4.2. Biyolojik Çalışma (*in vitro*) Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Genellikle sentezlenen bileşiklerin veya ilaçların aktiviteleri K_1 ya da IC_{50} değerleri ile ifade edilir. K_1 değeri bileşiğin inhibisyon katsayısıdır. IC_{50} değeri enzimin % 50 sini inhibe eden inhibitörün molar konsantrasyonu olarak ifade edilir. IC_{50} değerinin saptanmasında Bovine karbonik anhidraz enzimi kullanılmıştır.

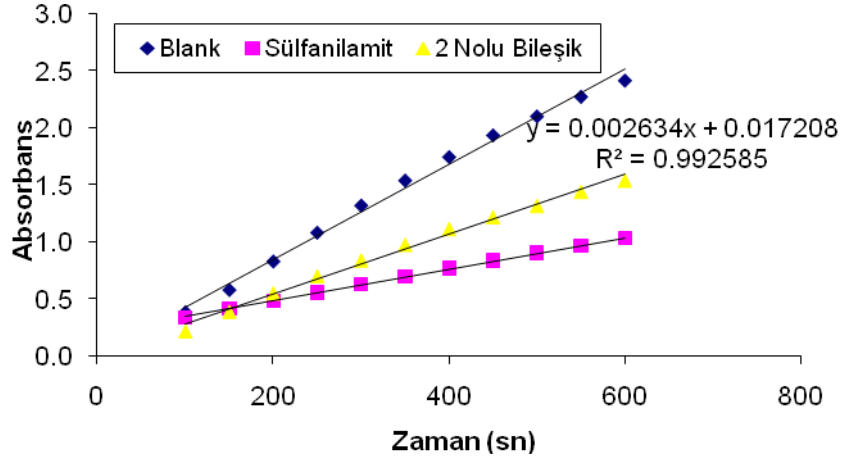
Materyal ve yöntem kısmında anlatılan şekliyle IC₅₀ değerleri saptanmıştır. Bilgisayarda % inhibitör değeri kullanılarak regresyon analiz eğrisi çizilmiş ve sonuçlar IC₅₀ şeklinde verilmiştir.

Elde ettiğimiz inhibitörlerin aktivitelerini görmek amacıyla, inhibitörsüz ortamda (blank), enzimin *p*-nitrofenilasetatı hidrolize uğratarak *p*-nitrofenol'e dönüştürmesinde yani enzimin etkisiyle *p*-nitrofenilasetatın hidrolizi sonucu *p*-nitrofenol konsantrasyonunun artması ve bunun zamanla değişimi incelenmiştir. Daha sonra inhibitörlü ortamda inhibitörün enzime bağlanması ile enzimin aktivitesini yitirmesi ve zamanla hidroliz olayını gerçekleştirememesi ortamdaki *p*-nitrofenol konsantrasyonunun zamanla Blank'e göre az olması inhibitörlerin aktifliğini gösterir.

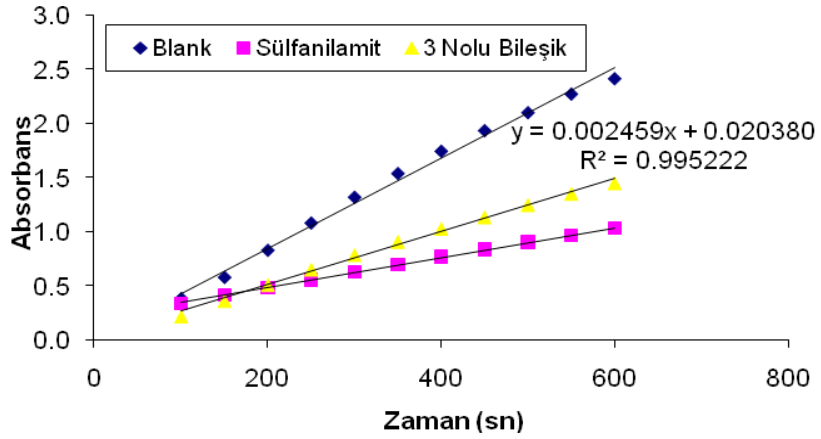


Şekil 4.1. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı blank olarak, astazolamitli ve sülfanilamitli ortamda absorbands değişimi

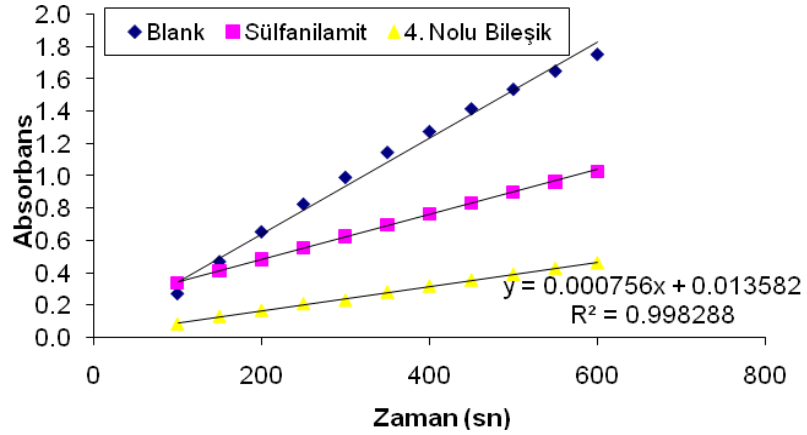
Şekil 4.1.'de görüldüğü gibi Blank ortamında zamanla enzimin etkisiyle 400 nm de *p*-nitrofenol konsantrasyonu artarken; astazolamit ve sülfanilamitli ortamda aynı süre içerisinde absorbandsının düştüğü, dolayısıyla konsantrasyonunun düştüğünü söyleyebiliriz. Bu da ilave edilen inhibitörlerin enzimle bağlanması sonucu, enzimi inhibe ettiğinin bir göstergesidir.



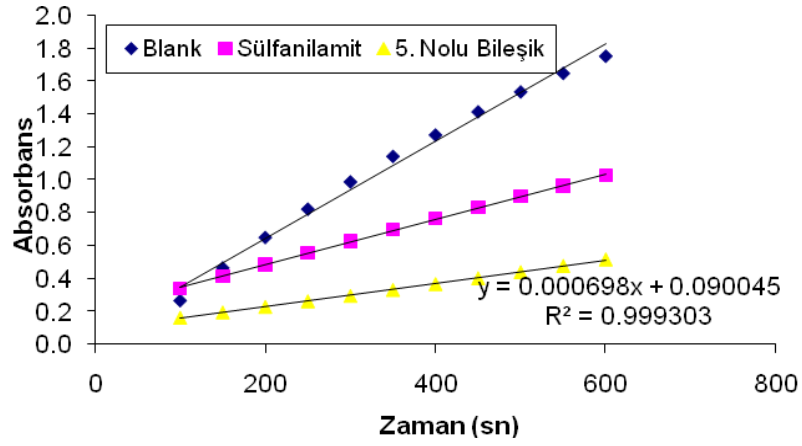
Şekil 4.2. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı sülfanilamitli ve 2 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi



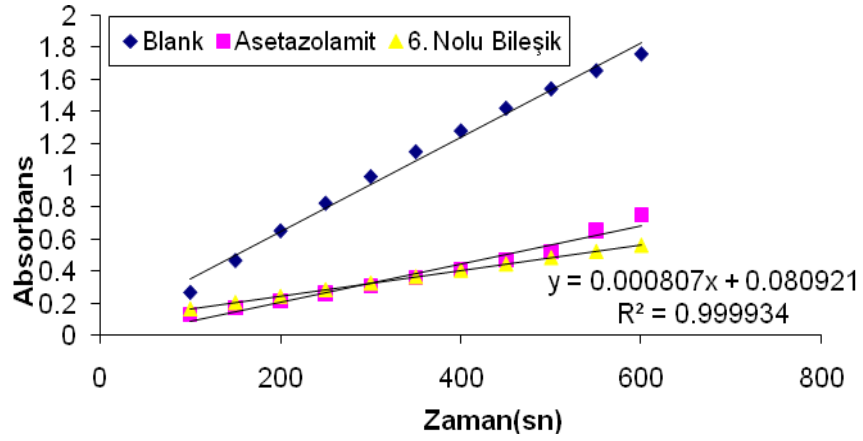
Şekil 4.3. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı sülfanilamitli ve 3 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi



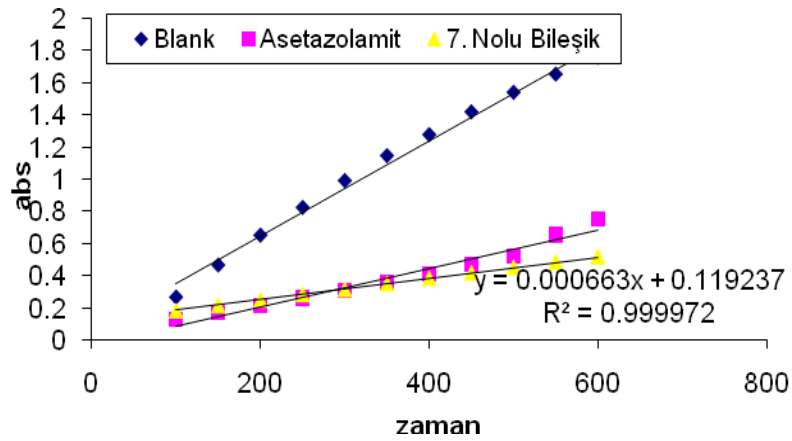
Şekil 4.4. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı sülfanilamitli ve 4 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi



Şekil 4.5. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı sülfanilamitli ve 5 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi



Şekil 4.6. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı sülfanilamitli ve 6 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi



Şekil 4.7. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana karşı sülfanilamitli ve 7 numaralı bileşik ortamda absorbands değişimi

Sentezlenen tüm bu bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayısı ve inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. İnhibitör aktivitesi IC_{50} , bölme katsayısı P_{eter}/P_{su} , sudaki çözünürlüğü ise g/100ml olarak verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayıları ve inhibitör aktiviteleri IC_{50} sonuçları

Bileşikler	Sudaki Çözünürlükleri (g/100 cm ³)	Bölme Katsayıları (P) pH=7.2	İnhibitör Aktivitesi IC_{50} (nM)
Sülfanilamit	0.75±0.05	0.08	75
Asetazolamit	0.085	0.13	70
2	0.067	0.87	135
3	0.078	0.30	121
4	0.121	1.15	67
5	0.119	0.72	65
6	0.076	1.14	64
7	0.091	0.20	69

İnhibitör aktivite sonuçları gösteriyor ki bir bileşiğin düşük IC_{50} değerine sahip olması onun güçlü inhibe etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar ile sentezlenen bileşiklerin tümünün (*in vitro* olarak) iyi inhibitör olduğu görülmektedir. 4, 5, 6, 7 nolu bileşikler asetazolamit ve sülfanilamitten daha iyi inhibitörlerdir. 2 ve 3 nolu bileşiklerin ise IC_{50} değerlerinin asetazolamit ve sülfanilamiten çok yüksek olmadığı, iyi birer inhibitör olduğu görülmüştür. Klinik olarak kullanılan ve satılan ilaçlardan daha iyi etkiye sahip inhibitörlerin ortaya çıkması bu tür bileşiklerin önemini daha da arttırmaktadır.

Sentezlenen bileşiklerin bölme katsayısı ölçümleri Hansch (1964) tekniği kullanılarak su-eter çözücü sisteminde incelenmiştir. Bu ölçüm sonuçlarına göre sentezlenen bileşiklerin bölme katsayısı değerleri 0.20-1.15 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_{50}

değerleri karşılaştırılır. Sentezlenen bileşiklerin hesaplanan değerleri açıkça göstermektedir ki inhibitörler için IC_{50} ve P arasında doğrusal bir korelasyon yoktur. Örneğin bölme katsayısı en büyük olan (1.15) 4 nolu bileşiğin IC_{50} değeri 67 nM iken bölme katsayısı düşük olan (0.20) 7 nolu bileşiğin IC_{50} değeri 69 nM dır ki bu değerler bu iki eşleşmede yüksek bölme katsayısına sahip olan bileşiğin yüksek aktivite gösterdiği anlamına gelir ki farklı bir durum 2 ve 3 nolu bileşikler arasında gözlenir; 2 nolu bileşiğin bölme katsayısı 0.87 ve IC_{50} değeri 135 nM iken 3 nolu bileşiğin bölme katsayısı 0.30 ve IC_{50} değeri 121 nM dır. Bu eşleşmede ise yüksek bölme katsayısına sahip bileşiğin düşük aktivite gösterdiğini ifade eder. Bu tezat sonuçlar bölme katsayısı ile IC_{50} değerlerini karşılaştırarak bileşiğin inhibe gücünün yorumlanamayacağı sonucunu verir. Benzer karşılaştırmalar asetazolamit ile Sülfanilamit arasında da yapılabilir; asetazolamitin bölme katsayısı 0.13, IC_{50} değeri 69 nM dır. Sülfanilamitin bölme katsayısı 0.08 IC_{50} değeri 75 nM dır. Sülfanilamitin bölme katsayısı asetazolamitten daha düşük ve daha az aktiftir. Farklı bir durum ise 3 ve 7 nolu bileşikler arasında gözlenir. 3 nolu bileşiğin bölme katsayısı 0.30 iken IC_{50} değeri 121 nM'dır. Buna karşın 7 nolu bileşiğin bölme katsayısı 0.20 iken IC_{50} değeri 69 nM'dır. Bu durum gösteriyor ki iyi bir bölme katsayısına sahip bileşik iyi bir IC_{50} değerine sahip anlamına gelmez.

Bileşiklerin inhibitör aktivitesi ve sudaki çözünürlükleri arasında doğrusal bir ilişki bulunmamaktadır. Suda daha iyi veya daha az çözünen bir bileşiğin daha iyi inhibitör olduğuna dair yorum yapılamaz. Örneğin 2, 6 ve 7 numaralı bileşikler arasında bir kıyaslama yapılırsa; 2 nolu bileşiğin sudaki çözünürlüğü 0.067, IC_{50} değeri 135 nM; 6 nolu bileşiğin sudaki çözünürlüğü 0.076, IC_{50} değeri 64 nM ve 7 nolu bileşiğin sudaki çözünürlüğü 0.091, IC_{50} değeri 69 nM'dır. Bu değerler karşılaştırıldığında yüksek çözünürlüğe sahip 7 nolu bileşiğin 6 nolu bileşiğe göre inhibitör aktivitesi düşük iken, 2 numaralı bileşiğe göre inhibitör aktivitesi daha yüksektir. Bu sonuçlar inhibitör aktivitesi ile sudaki çözünürlük arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

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. Aromatik ve hetero halkalı sülfonamidlerin güçlü karbonik anhidraz inhibitörü olduğu bilinmektedir. Bu amaçla yeni asetazolamit ve sülfanilamit türevi bileşikler sentezlenmiş ve yapıları FT IR ve ¹H NMR yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin inhibitör aktiviteleri (*in vitro*) ölçülerek, biyolojik aktiviteleri tartışılmıştır. Sentezlenen bileşiklerden 2 ve 3 nolu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri sülfanilamit ve asetazolamite yakın değerler verirken, diğer bileşiklerin (4, 5, 6 ve 7 nolu bileşikler) biyolojik aktivitesi hem asetazolamitten hem de sülfanilamitten (*in vitro* olarak) daha güçlü olduğu tesbit edilmiştir. Bileşiklerin bölme katsayısı ve sudaki çözünürlükleri incelenmiş sentezlenen 3, 6, ve 7 nolu bileşiklerin sudaki çözünürlüğünün asetazolamitten, 4 ve 5 numaralı bileşiklerin sudaki çözünürlükleri ise hem asetazolamit hem de sülfanilamitten yüksek çıkmıştır. Sentezlenen tüm bileşiklerin (2, 3, 4, 5, 6 ve 7) bölme katsayıları asetazolamit ve sülfanilamitten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sentezlenen bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri (*in vitro*) ölçülmüştür. Ayrıca bu bileşiklerin *in vivo* çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Şu an sülfanilamit ve asetazolamitten türetilen bileşiklerin, antibakteriyel, karbonik anhidraz inhibitörü, antikanser ajanlar ve antiAIDS ajanlar olarak önemli ilaç sınıflarını oluşturduğu düşünülürse bu çalışmaların ne derece önemli olduğu anlaşılacaktır.

Sentezlenen bu bileşiklerin *in vivo* çalışmalarının yapılması ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- ABBATE, F., COETZEE, A., CASINI, A., CIATTINI, S., SCOZZAFAVA, A., and SUPURAN, C. T., 2004. Carbonic Anhydrase Inhibitors: X-ray Crystallographic Structure of the Adduct of Human Isozyme II with the Antipsychotic Drug Sulpiride. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 14:337-341.
- AKIBA, T., ALRERN, R.J., EVELOFF, J., and WARNOCK, D.G., 1986. Elektronik Sodium/Bicarbonate Cotransport In Rabbit Renal Cortical Basolateral Membrane Vesicles. *J. Clin. Invest.*, 78:1472-1478.
- ALWARD, W.L., 1998. Medical Management of Glaucoma. *The New England Journal of Medicine*, 339(18):1298-1307.
- ARSLAN, O., 2001. Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds. *Biochemistry*, 66:1206-1208.
- 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.
- BEYDEMİR, S., CİFTÇİ, M., KUFREVİOĞLU, O. I., and BUYUKOKUROĞLU, M. E., 2002. Effects of gentamisin Sulfate on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase From Human Erythrocytes in vitro and From Rat Erythrocytes in vivo. *Biol. Pharm. Bull.*, 25:966-969.
- BEYDEMİR, Ş., and GULCİN, I., 2004. Effect of Melatonin on Carbonic Anhydrase From Human Erythrocyte in vitro and From Rat Erythrocyte in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19:193-197.
- BOTRE, F., GROS, G., and STOREY, B.T., 1991. Carbonic Anhydrase From Biochemistry and Genetics To Physiology and Clinical Medicine, VCH Publisher Inc. New York, pp.95-110.
- BRIGANTI, F., PIETATTELLI, A., SCOZZAFAVA, A., and SUPURAN, C. T., 1996. Novel Classes of Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Interaction With The Native and Cobalt-Substituted Enzyme: Kinetic and Spectroscopic Investigations. *Eur. J. Med. Chem.*, 31:1001-1010.
- BRIGANTI, F., MANGANI, S., ORIOLI, P., SCOZZAFAVA, A., VERNAGLIONE, G., and SUPURAN, C. T., 1997. Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations for the Interaction of Isozymes I and II with Histamine. *Biochemistry*, 36:10384–10392.
- BULBUL, M., HISAR, O., BEYDEMİR, S., CİFTÇİ, M., and KUFREVİOĞLU, O. I., 2003. The *In Vitro* and *In Vivo* Inhibitory Effects of Some Sulfonamide Derivatives on Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Erythrocyte Carbonic Anhydrase Activity. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 18:371-375.
- CARTER, M. J., 1972. Carbonic Anhydrase: Isoenzymes, Properties, Distribution and Functional Significance. *Biol. Rev.*, 42:465-513.
- CARTER, N. D., JEFFERY, S. and SHIELS, A., 1982. Immunoassay Carbonic Anhydrase-III In Rat Tissues. *FEBS Lett.*, 139:265-266.
- CARTER, N. D., HEWETT-EMMETT, D., JEFFERY, S., and TASHIAN, R. E., 1981. Testosterone-Induced, Sulfonamide Resistant Carbonic Anhydrase Isozyme Of Rat Liver Is Indistinguishable From Skeletal Muscle Carbonic Anhydrase-III, *FEBS Lett.*, 128:114-118.

- CHEGWIDDEN, W. R., EDWARDS, Y., and CARTER, N., 2000. The Carbonic Anhydrase-New Horizons. Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C.R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds) 8th Ed., McGraw-Hill, Inc., New York, pp.2165-2204.
- CLARE, B. W., and SUPURAN, C. T., 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Part 86. A QSAR Study On Some Sulfonamide Drugs Which Lower Intra-Ocular Pressure, Using The ACE Non-linear Statistical Method. *Eur. J. Med. Chem.*, 35:859-865.
- DOGSON, S. J., FORSTER, R. E., SCHWED, D. A., and STOREY, B. T., 1983. Contribution Of Matrix Carbonic Anhydrase To Citrulline Synthesis In Isolated Puinea Pig Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 258:7696-7701.
- 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.
- DÖKMECİ, İ., 1985. Farmakoloji. Beta Basım ve Yayım, 2. Baskı, 1136s, İstanbul
- DÖKMECİ, İ., 1992. Farmakoloji. Saray Kitabevleri, İstanbul, 925s.
- DÖKMECİ, İ., 1996. Farmakoloji İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitabevi, 1. Baskı, İstanbul, 976s.
- DRANCE, J.E., and NEUFELD, A.H., 1984. Glaucoma: Applied Pharmacology in Medical Treatment. Grune&Stratton, Orlando, 17:395-428.
- DURAL, E., 2002. Farmakoloji. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 798s.
- FELDSTEIN, J. B., and SILVERMAN, D. N., 1984. Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase From The Saliva of The Rat. *J. Biol. Chem.*, 259:5447-5453.
- GARY, L. M., and TARR, D. A., 2002. İnorganik Kimya. Palme Yayıncılık, Ankara, 642s.
- GOODSELL, D. S., and DUTTA, S., 2004. PDP Molecule of the Month: Carbonic Anhydrase, www.rcsb.org/pdp/molecules/pdp49_1.html.
- GROS, G., and DODGSON, S. J., 1988. Velocity of CO₂ Exchange in Muscle and River, *Annu. Rev. Physiol.*, 50:669-694.
- GÜRELİK, G., 1995. [www.med.gazi.edu.tr /akademik / goz /notlar /gozkitabi_TUS.doc](http://www.med.gazi.edu.tr/akademik/goz/notlar/gozkitabi_TUS.doc)., Ankara , 67s.
- HEWETT-EMMETT, D., 2000. In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, pp.29-78.
- KEHA, E. E., ve KUFREVIOGLU, I. O., 1993. Biyokimya. Derya Kitabevi, Trabzon, 34s.
- KRUNGKRAI, S. R., SURAVERTUM, N., ROCHANAKIJ, S., and KRUNGKRAI, J., 2001. Characterization of Carbonic Anhydrase in Plasmodium Falciparum. *Int. J. Parasitol*, 31:661-668.
- 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.
- 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 Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion. *Exp. Eye. Res.*, 36:457-480.
- MAREN, T. H., 1987. Carbonic Anhydrase: General Perspectives and Advances in Glaucoma Research. *Drug Dev. Res.*, 10:255-276.
- MORI, K., OGAWA, Y., EBIHARA, K., TAMURA, N., TASHIRO, K., KUWAHARA, T., MUKOYAMA, M., SUGAWARA, A., OZAKI, S., TANAKA, I., and NAKAO, K., 1999. Isolation and Characterization of CA XIV, a Novel Membrane-Bound Carbonic Anhydrase From Mouse Kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 274:15701-15705.
- OKAY, G., ve YILDIRIR, Y., 2002. *Organik Kimya, Yedinci Basımdan Çeviri. Literatür Yayıncılık, İstanbul, 121s.*
- ORAĞLI, K. M., 2001. *Klinik Oftamoloji. Nobel Tıp Kitap Evi, İstanbul, 65s.*
- ÖZÇETİN, H., 2001. *Göz Tansiyonu ve Glokomlar, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 127s.*
- PARKKILA, A.K., SCARIM, A. L., PARKKILA, S., WAHEED, A., CORBETT, J.A., and SLY, W.S., 1998. Expression Of Carbonic Anhydrase V in Pancreatic Beta Cells Suggests Role For Mitochondrial Carbonic Anhydrase in Insulin Secretion. *Journal Of Biologica Chemistry*, 273:24620-24623.
- PASTAREKOVA, S., PARKKILA, S., PASTOREK, J., and SUPURAN T. C., 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, 119(3):199-229.
- POCKER, Y., and JANJIC, N., 1989. Molecularity of Water In Enzymic Catalysis. Application To Carbonic Anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111:731-733.
- POCKER, Y., and JOAN, S.Y., 1973. Plant Carbonic Anhydrase. Properties and Carbondioxide Hydration Kinetics. *Biochem.*, 12:5127-5134.
- POCKER, Y., and JOAN, S. Y., 1974. Plant Carbonic Anhydrase, Hydrase Activity 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.
- POLYA, J.B., and WIRTZ, A.J., 1965. Studies On Carbonic Anhydrase-II. Occurrence 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.
- ROUGHTAN, F. J. W., and BOOTH, V. H., 1946. The Effect of Substrate Concentration, pH and Other Factors Upon the Activity of Carbonic Anhydrase. *J. Biochem.*, 40:319-330.
- ROSENBERG, L.F.; KRUPIN, T; TANG L.Q.; HONG P.H., and RUDERMAN J.M., 1998. Combination of Systemic Acetazolamide and Topical Dorzolamide in Reducing Intraocular Pressure and Aqueous Humor Formation, 105(9):1581-1594.
- ROWLETT, R. S. CHANCE, M. R., and WIRT, M. R., 1994. Kinetic and Structural Characterization of Spinach Carbonic Anhydrase. *Biochemistry*, 33:13967-13976.

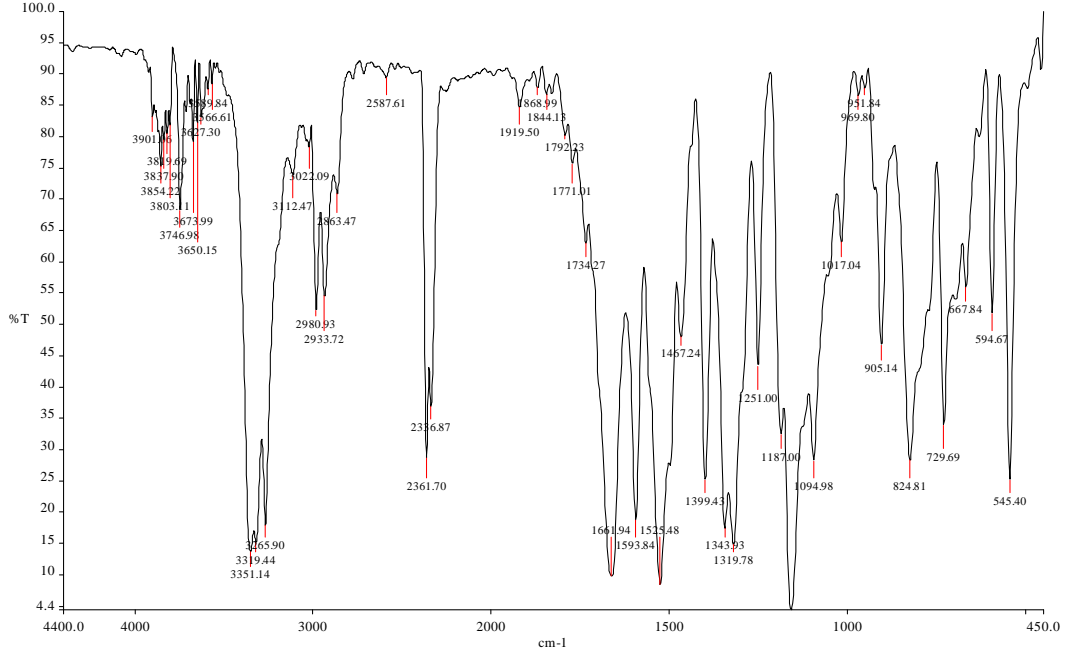
- SASAKI, S., and MARUMO, F., 1989. Effects Of Carbonic Anhydrase Inhibitors on Basolateral Base Transport Of Rabbitproximal Straight Tubule. *Am. Physiol. Soc.*, pp.947-951.
- SCHUMAN, J. S., 2000. Antiglaucoma Medications. *Clinical Therapeutics*, 2(22):167-208.
- SILVERMAN, D. N., and LINDSKOG S., 1988. The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase Implications of a Rate-Limiting Proteolysis of Water. *Acc. Chem. Res.*, 21:30-36.
- SOLIS, C., OLIVERA, A., ANDRADE, E., RUVALCABA-SIL, J.L., ROMERO, I., and CELIS, H., 1999. Pixe Analysis of Zn Enzymes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 150:222-225.
- SOLOMONS, J.W., and FRYHLE, C.B., 2004. *Organic Chemistry*. John Willey & Sons, USA, 1344p.
- SUPURAN, C. T., and SCOZZAFAVA, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 1:61-97.
- SUPURAN, C.T., and SCOZZAFAVA, A., 2002. Applications of Carbonic Anhydrase inhibitors and Activators in Therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 12:217-242.
- SUPURAN, C. T., 2003. Indisulam: An Anticancer Sulfonamide in Clinical Development. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12:283-287.
- TOBIN, A.J., 1970. Carbonic Anhydrase From Parsley Leaves. *J. Biol. Chem.*, 245:2656-2666.
- WISTAND, P.J., 1981. The Importance of Carbonic Anhydrase B and C For The Unloading of CO₂ By The Human Erythrocyte, *Acta Physiol Scand.*, pp.113-417.

ÖZGEÇMİŞ

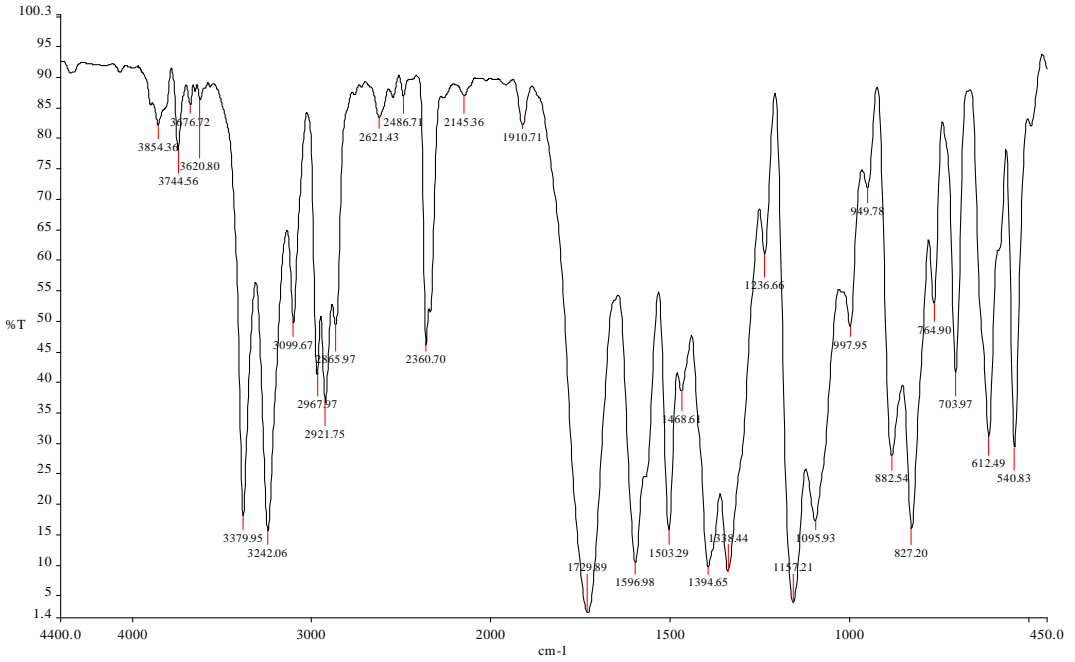
1980 yılında Adıyaman ilinde doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Adıyaman ilinde tamamladı. 1997 yılında Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünü kazandı. 2001 yılında mezun oldu. 2005 yılı güz döneminde Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında açılan yüksek lisans sınavını kazandı ve Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. Halen Milli Eğitim Bakanlığına bağlı bir okulda sınıf öğretmenliği yapmaktadır.

EKLER

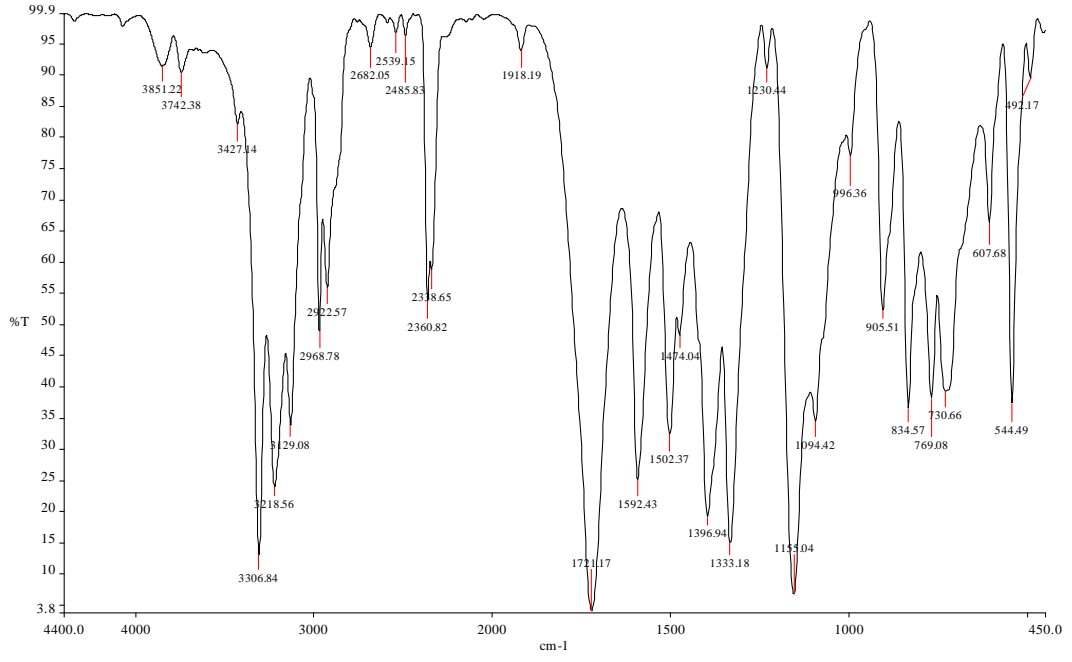
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT IR Spektrumları



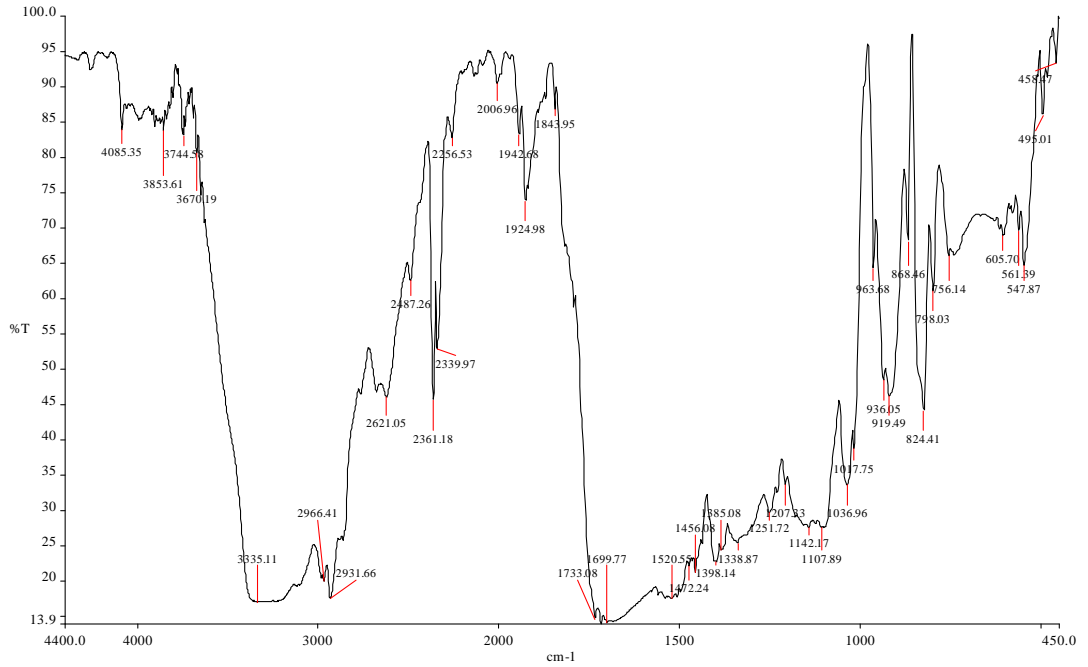
Ek Şekil 1.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (1)'in KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu



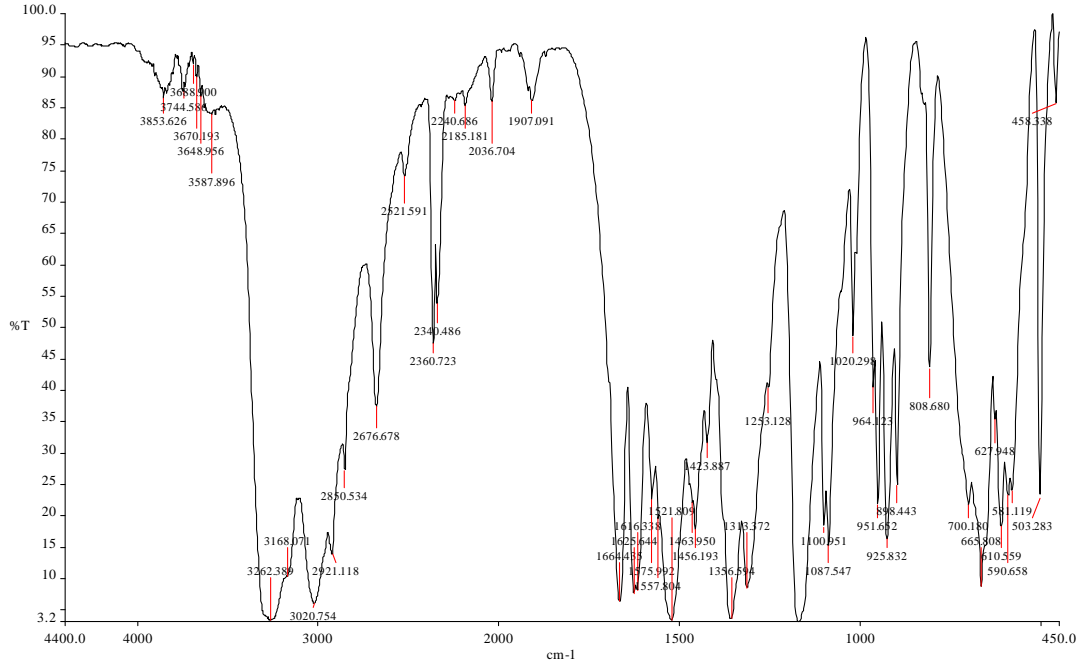
Ek Şekil 1.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (2)'nin KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu



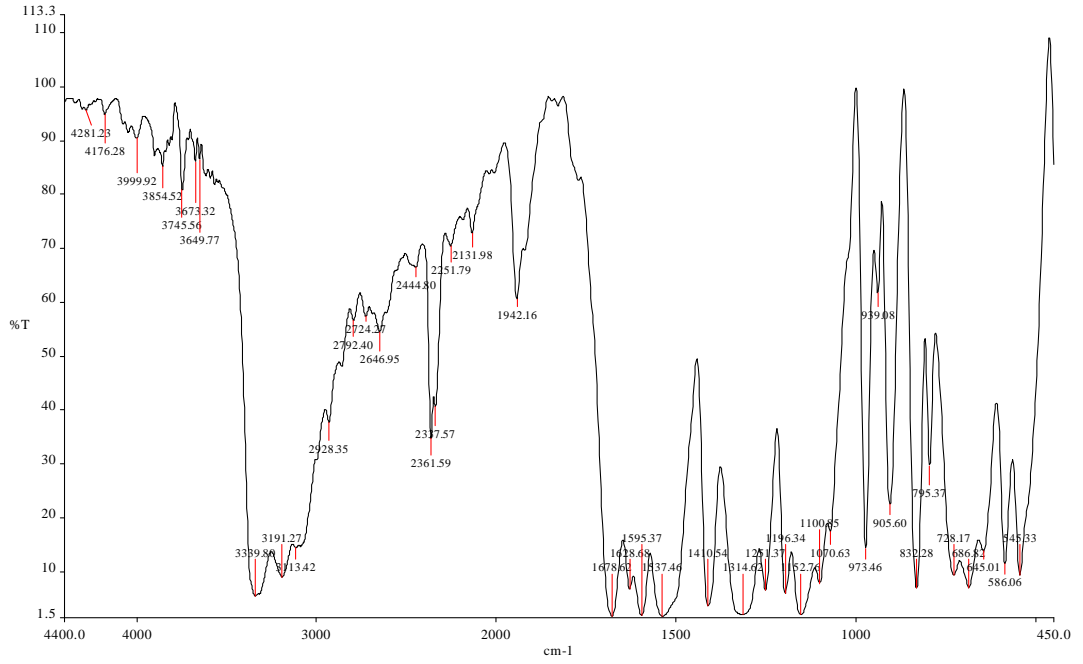
Ek Şekil 1.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (3)'ün KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu



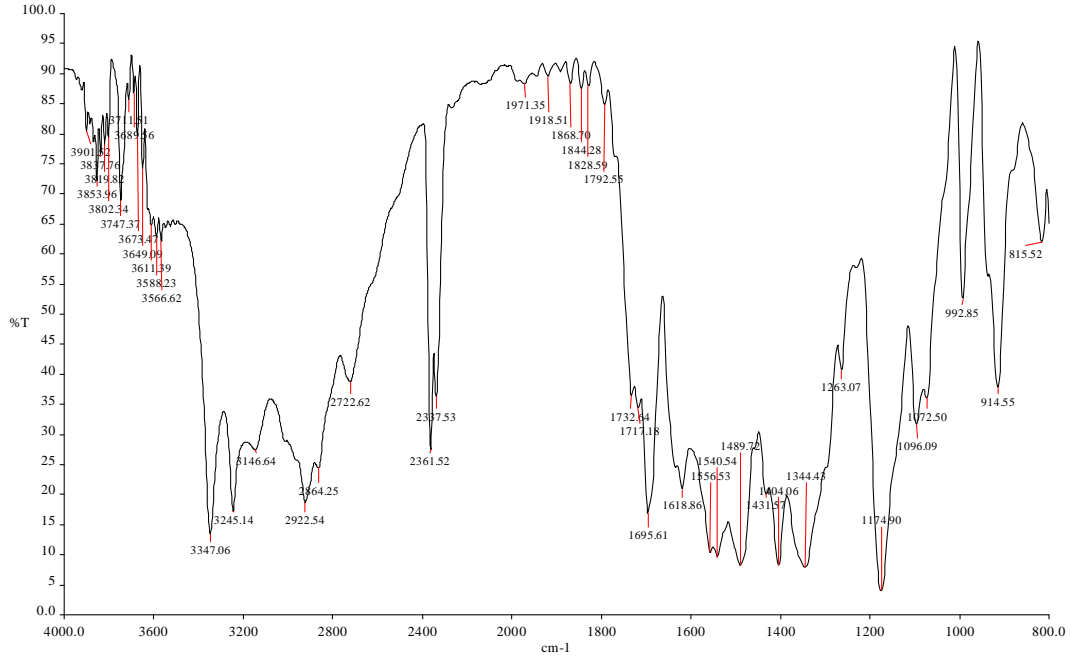
Ek Şekil 1.4. 4-(metakriloilamino)-benzen sülfonamit (4)'ün KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu



Ek Şekil 1.5. 4-(akrioloilamino)-benzen sülfonamit (5)'in KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu

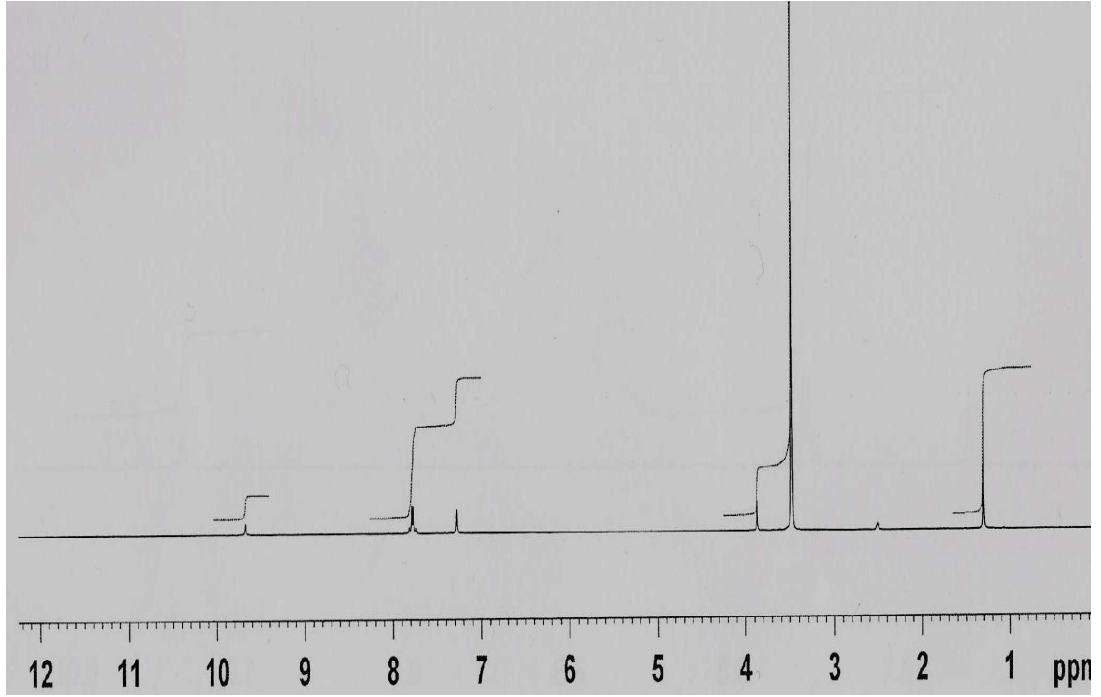


Ek Şekil 1.6. 2-(metakrioloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)'nın KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu

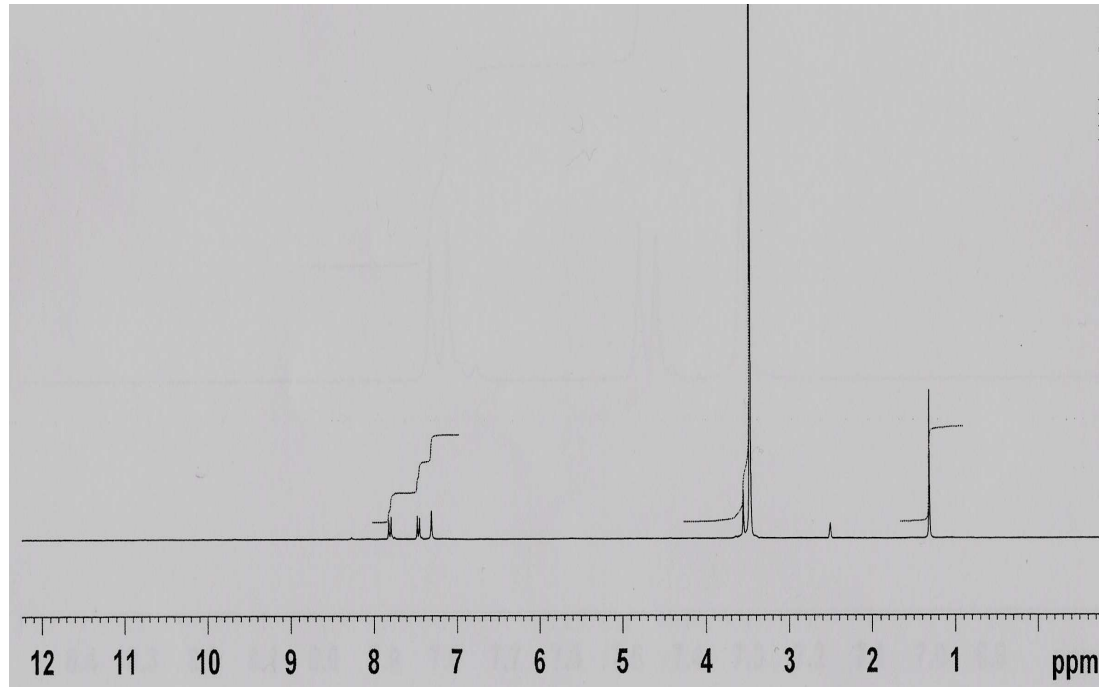


Ek Şekil 1.7. 2-(akroilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (7)'in KBr tabletleri ile hazırlanmış IR spektrumu

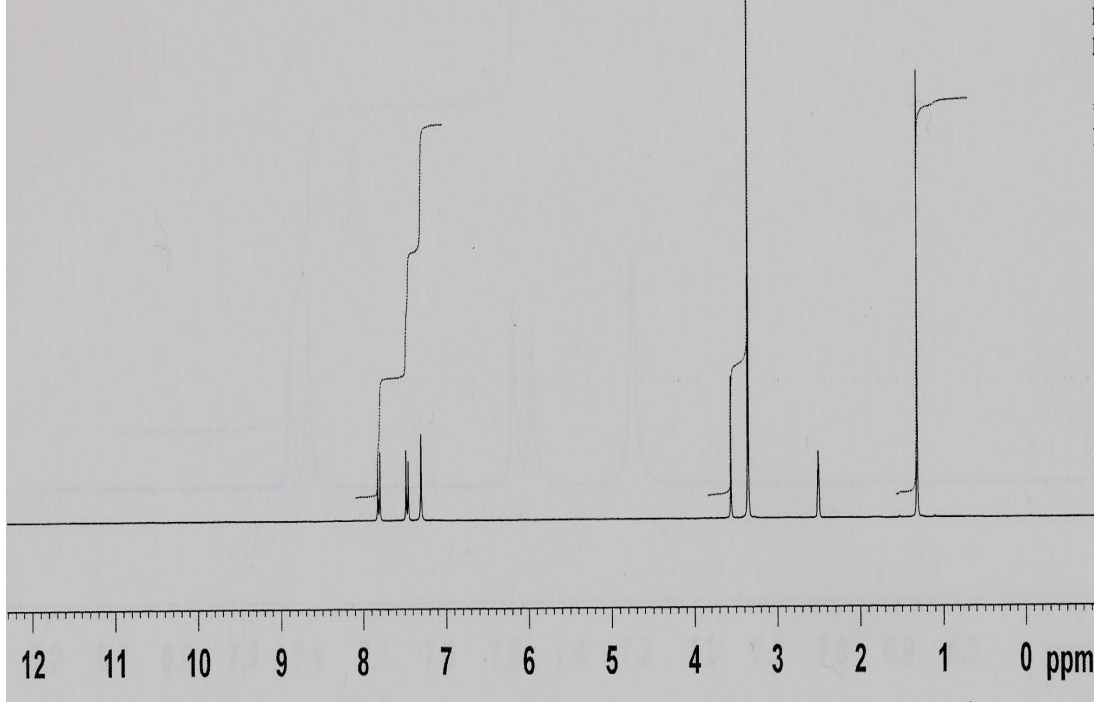
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin ^1H NMR Spektrumları



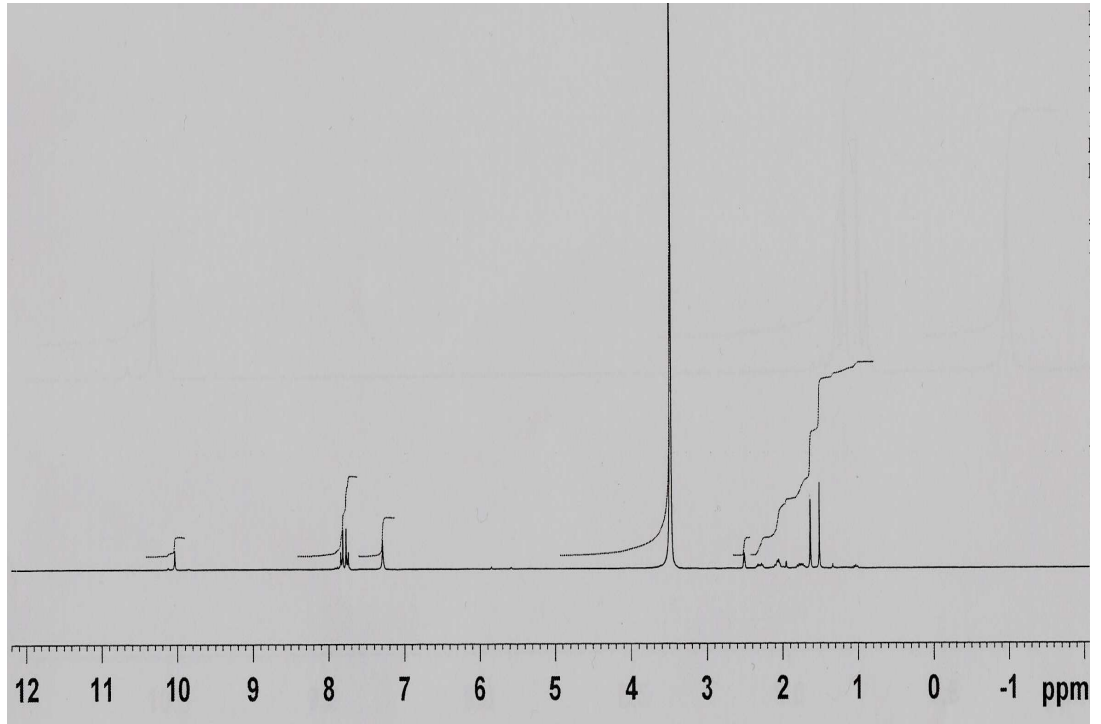
Ek Şekil 2.1. 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (1)'in DMSO- d_6 içerisinde alınan ^1H NMR spektrumu



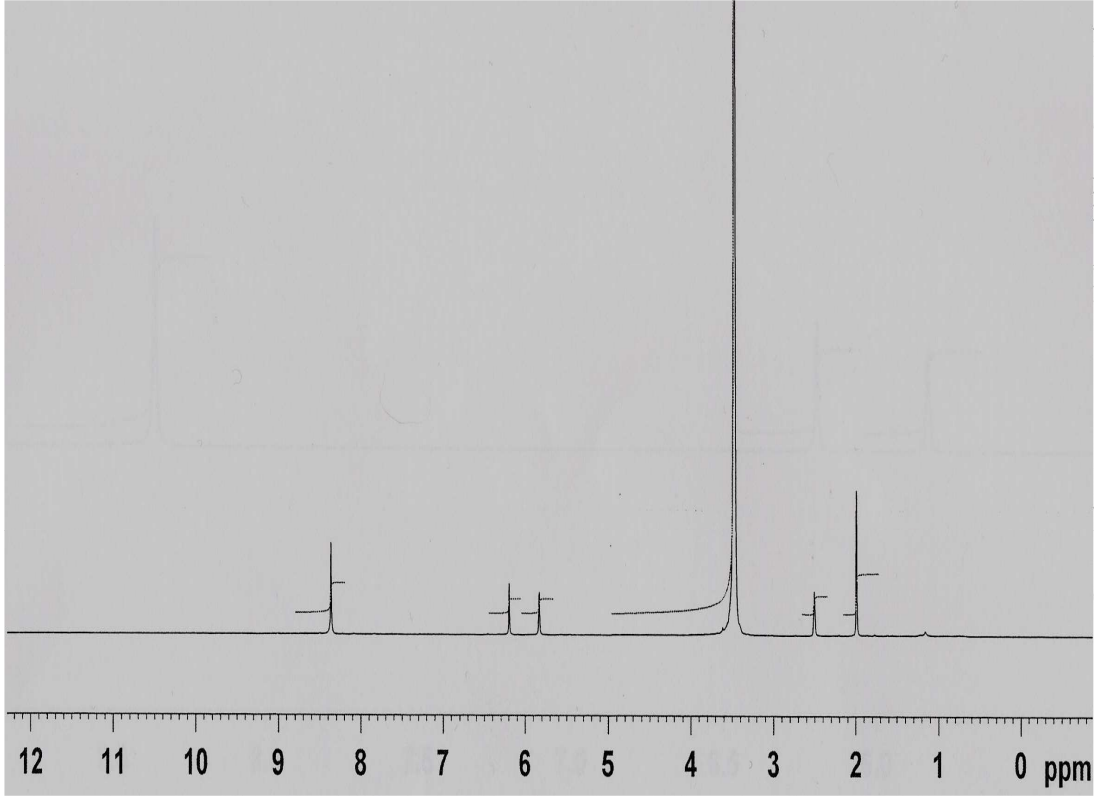
Ek Şekil 2.2. 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (2)'ün DMSO- d_6 içerisinde alınan ^1H NMR spektrumu



Ek Şekil 2.3. 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit (3)'ün DMSO-d₆ içerisinde alınan ¹H NMR spektrumu



Ek Şekil 2.4. 4-(metakriloilamino)-benzen sülfonamit (4)'ün DMSO-d₆ içerisinde alınan ¹H NMR spektrumu



Ek Şekil 2.5. 2-(metakriloilamino)-1,3,4-tiyadiazol-5-sülfonamit (6)'nın DMSO-d₆ içerisinde alınan ¹H NMR spektrumu

ÖZET

Mann ve Keilin (1940) tarafından sülfanilamitin keşfi çok sayıda hastalığın tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan kapsamlı bir ilaç topluluğunun gelişimine yol açmıştır. Antibakteriyel, antitümör, antikarbonik anhidraz, diüretik, hipoglisemik, antitiroid veya proteaz inhibitör gibi etkili ilaçlar sentezlenmiş ve tıbbi tedavide kullanım alanı bulmuştur.

1944 yılında Friedenwald glokom tedavisi için gözdeki basıncın düşürülmesi gerektiğini ifade etmiş ve başlangıçta diüretik olarak kullanılan oral KAI' nin GİB'ni da azalttığı ilk kez 1954 yılında Becker tarafından bildirilmiştir. Yine aynı yıl glokom tedavisi için karbonik anhidraz inhibitörü olan asetazolamit sentezlenmiş olup halen glokom tedavisinde tablet olarak kullanılmaktadır. Ancak karbonik anhidraz inhibitörlerinin sistemik yan etkileri olduğundan dolayı araştırmacılar yıllarca karbonik anhidraz inhibitörlerinin topikal (damla) formunu geliştirmeye çalışmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda ilk topikal KAI olan dorzolamit Maren tarafından 1995 yılında sentezlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi ve bu bileşiklerin inhibitör aktivitelerinin *in vitro* incelenmesidir. Bu amaçla asetazolamit ve sülfanilamit türevi olan 3 yeni karbonik anhidraz inhibitörü sentezlenmiştir. Bu maddeler; 4-(3-kloro-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit, 4-(3-morfolino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamit ve 4-(3-pirrolidino-2,2-dimetilpropanoilamino)-benzen sülfonamittir.

Sentez sırasında ince tabaka kromatografisi metodu ile reaksiyonun takibi yapılmıştır. 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 (¹H NMR) sonuçları incelenmiştir.

Ayrıca sentezlenen bileşiklerin inhibitör aktiviteleri *in vitro* incelenmiştir. Karbonik anhidraz inhibitör aktiviteleri (*in vitro*) UV-Vis spektrometre ile ölçülmüştür. Bu verilerle birlikte bileşiklerin bölme katsayısı, sudaki çözünürlükleri

gibi çeşitli fiziksel özellikleri de incelenmiştir. Bu bileşiklerin bir kısmının asetazolamit ve sülfanilamitten daha güçlü inhibitör oldukları tespit edilmiştir.

Sentezlenen bu bileşiklerin güçlü inhibitör aktiviteye (*in vitro*) sahip olmaları nedeniyle bu çalışmanın, sağlık bilimleri ile ilgilenen araştırmacılara da yeni çalışma alanları oluşturacağına inanılmaktadır. Bu bileşiklerin *in vivo* aktivite çalışmaları ve klinik çalışmalarının da yapılarak ilaç adayı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Sentezlenen bu bileşiklerin en azından birinin glaukoma tedavisinde kullanılabileceğini ümit etmekteyiz.

SUMMARY

Sulfanilamide was shown to be a specific inhibitor of carbonic anhydrase by Mann and Keilin. The active interest in carbonic anhydrase inhibitors for glaucoma therapy therefore continued throughout the 1950. After that, effective drugs, such as antibacterial, antitumor, anticonic anhydrase, diuretic, hypoglycemic, antithyroid or protease inhibitor, have been synthesised and used in clinical.

Friedenwald in 1944 was the first to suggest that research should be concentrated towards reducing aqueous humour formation for glaucoma therapy. Becker in 1954 was the first suggest that carbonic anhydrase inhibitors (CAIs), which has been used as diuretic, reduces intraocular pressure (IOP). The same year acetazolamide as carbonic anhydrase inhibitor was synthesised for glaucoma therapy. and has been using for glaucoma therapy as tablet since then. However, carbonic anhydrase inhibitors have systemic side effects. Because of these side effects researchers have tried to find topical form of carbonic anhydrase inhibitors for years. of the carbonic anhydrase inhibitors, First topical carbonic anhydrase inhibitor, called dorzolamide, was synthesised by Maren in 1995.

The objective of this project is synthesis and investigation of biological activities of novel inhibitors of carbonic anhydrase. Three novel derivatives of sulfanilamide was synthesised as carbonic anhydrase inhibitor. These compounds are 4-(3-chloro-2,2-dimethylpropanoilamino)-benzene sulfonamide, 4-(3-morpholino-2,2-dimethylpropanoilamino)-benzene sulfonamide and 4-(3-pyrrolidino-2,2-dimethylpropanoilamino)-benzene sulfonamide.

Thin layer chromatography (TLC) method was used to understand whether reaction have completed or not during synthesis. 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.

Inhibitors activities of the synthesised compounds have also been investigated. Inhibitor activities (*in vitro*) of them was measured by UV-VIS spectrofotometer. In

addition, some physical properties such as water solubility, partition coefficients of the synthesised compounds have been investigated as well.

We believe that this study will open new research areas for the scientists who are interested in medicine, because of strong inhibitors (*in vitro*) of synthesised compounds, so Biological activities (*in vivo*) and clinical studies of these compounds should be investigated and evaluated as candidate drug status. We hope that at least one of these synthesised compounds to be useful for glaucoma therapy.