

**YENİ SENTEZLENEN BAZI SÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN KARBONİK
ANHİDRAZ VE KOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYON
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Muhammet Gürkan KURBAN

Doktora Tezi

Biyokimya Ana Bilim Dalı

Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

Ağrı-2023

Her hakkı saklıdır

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Muhammet Gürkan KURBAN

YENİ SENTEZLENEN BAZI SÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN KARBONİK
ANHİDRAZ VE KOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYON
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

AĞRI-2023

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Yeni Sentezlenen Bazı Sülfonamid Türevlerinin Karbonik Anhidraz ve Kolinesteraz Enzim İnhibisyon Potansiyellerinin Belirlenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

☒ Tezimin 3 yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

05.10.2023

Muhammet Gürkan KURBAN

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, Muhammet Gürkan KURBAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 05/10/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

İmza :

Üye : Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Tayfun ARSLAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bayram ALPARSLAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../2023 tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ	1
1.1. Karbonik Anhidraz	1
1.2. Kolinesterazlar.....	8
1.2.1. Asetilkolin.....	9
1.2.2. Asetilkolinesteraz.....	11
1.2.3. Butirilkolinesteraz.....	18
1.3. Sülfonamidler	20

İKİNCİ BÖLÜM

2. KURAMSAL TEMELLER.....	22
----------------------------------	-----------

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL VE METOD.....	26
3.1. MATERYAL.....	26
3.1.1. Kimyasal çalışmalarda kullanılan cihazlar ve yapılan analizler	26
3.1.2. Tez çözeltilerinin elde edilmesi	27
3.2. METOD.....	28
3.2.1. Sentez Çalışmaları	28
3.2.2. Sülfonamid bileşikleri için AChE / BChE inhibitör etkilerinin ölçülmesi	30
3.2.3. Sülfonamid bileşikleri için CA I / II inhibitör etkilerinin ölçülmesi.....	31
3.2.4. Sülfonamidler için IC ₅₀ değerlerinin tespit edilmesi.....	31

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	52
KAYNAKLAR	55

ÖZET
DOKTORA TEZİ
YENİ SENTEZLENEN BAZI SÜLFONAMİD TÜREVLERİNİN KARBONİK
ANHİDRAZ VE KOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYON
POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Muhammet Gürkan KURBAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

2023

İnsan karbonik anhidraz izoenzim I ve II (CA I ve II) inhibitörleri, glokom, kanser vb. hastalıkların tedavisinde kullanıma potansiyelleri nedeniyle önemli terapötik ajanlar olarak kabul edilmektedir. Kolinesterazların (ChE'ler), yani asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesterazın (BChE) inhibisyonu, bugüne kadar Alzheimer hastalığı (AD) için en etkili tedavi yaklaşımı olarak kabul ediliyordu. Bu çalışmada sülfonamid grubu içeren bir dizi yeni Schiff bazı türevi sentezlendi. Sentezlenen moleküllerin karakterizasyonu elementel analiz ve FTIR, ¹H- ve ¹³C-NMR gibi bazı spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıldı. Bu dört esteraz enzimine karşı sentezlenen tüm moleküller, güçlü bir şekilde etkisi gösterdiler.

Sonuç olarak, sentezlenen bazı Schiff bazı sülfonamid türevlerinin, bu çalışmada kullanılan enzimlere karşı nanomolar seviyesinde güçlü inhibisyon aktiviteleri nedeniyle yeni potansiyel ilaç adayı moleküller olabileceği söylenebilir.

2023

Anahtar Kelimeler: Sülfonamid, Karbonik Anhidraz, Asetilkolinesteraz, Butirilkolinesteraz, İnhibisyon.

ABSTRACT

Ph. D. DISSERTATION

DETERMINATION OF THE CARBONIC ANHYDRASE AND CHOLINESTERASE ENZYME INHIBITION POTENTIALS OF SOME NEW SYNTHESIS SULPHONAMIDE DERIVATIVES

Muhammet Gürkan KURBAN

Advisor: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

2023

Human carbonic anhydrase isoenzyme I and II (CA I and II) inhibitors, glaucoma, cancer, etc. They are considered important therapeutic agents due to their potential to be used in the treatment of diseases. Inhibition of cholinesterases (ChEs), namely acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), has been considered the most effective treatment approach for Alzheimer's disease (AD) to date. In this study, a series of new Schiff base derivatives containing sulfonamide groups were synthesized. Characterization of the synthesized molecules was done using elemental analysis and some spectroscopic methods such as FTIR, ¹H- and ¹³C-NMR. All molecules synthesized against these four esterase enzymes showed strong effects.

As a result, it can be said that some synthesized Schiff base sulfoamide derivatives may be new potential drug candidate molecules due to their strong inhibitory activities at the nanomolar level against the enzymes used in this study.

2023

Keywords: Sulfonamide, Carbonic anhydrase, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Inhibition.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için her türlü şartı sağlayan ve bana her zaman her türlü desteği sunan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında değerli yardımları ile bana yardımcı olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Deniz EKİNCİ, Sayın Doç. Dr. Tayfun ARSLAN, Sayın Doç. Dr. Aykut ÖZTEKİN, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bayram ALPARSLAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK ve Dr. Öğr. Üyesi Eyüp BAŞARAN hocalarıma da tezim için elzem olan sentez süreçlerinde yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında sabrı ve değerli yardımları ile bana yardımcı olan sevgili eşime teşekkürlerimi bir borç bilirim.

05/10/2023

Muhammet Gürkan KURBAN

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Karbonik anhidrazların sınıflandırılması, bu sınıfların yapıları ve bulundukları canlılar.....	2
Tablo 1.2. CA ilişkili hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisinde hedef alınan CA İzofomu.....	6



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. CA enzimlerinin katalizlediği tepkime	1
Şekil 1.2. α -CA katalitik bölgesi: CA II kristal yapısının CO (pdb 2VVA) ve HCO_3^- ile kompleks halde süper pozisyonu. Çember içerisinde katalitik alan büyütülmüştür.....	4
Şekil 1.3. Karbinik Anhidrazın Katalitik Döngüsü A) Su molekülü enzimi hidroksillenmiş türe dönüştürür. B) Hidroksile iyon CO_2 molekülüne saldırır. C) HCO_3^- 'ün ZN iyonunu koordine dildiği tür oluşur. D) Enzimin aktif olmayan yapısı tekraren oluşur.	5
Şekil 1.4. Etki mekanizmalarına göre 5 sınıfa ayrılmış CA İnhibitörleri.	7
Şekil 1.5. Asetilkolinin hidrolizi.	8
Şekil 1.6. Kolin nörotransmisyonunun şematik diyagramı.	10
Şekil 1.7. AChE enzimi görseli. Üst panel dikey eksen etrafında 90° döndürülmüş orta paneldeki yapılar ile doğrudan aktif bölge kanyonlarının görüntülerini sunar. Alt paneller, AChE'nin bağlanma bölgelerinin büyütülmüş görüntülerini sunar.	12
Şekil 1.8. Organofosfatlarca gerçekleşen AChE'nin irreversibl inhibisyonu. Mavi yaşlı enzimi; yeşil inhibe olmuş enzimi temsil eder. L ve R, inhibisyon ve reaktivasyon yollarını takip ederek sırasıyla birinci ve ikinci ayrılan organofosfat gruplarını temsil eder	14
Şekil 1.9. Kolinesteraz enzim inhibitörü olan ilaç moleküllerinin kimyasal yapıları ve bunların insan AChE ve BChE enzimine karşı inhibitör değerleri.	16
Şekil 1.10. BChE enzimi görseli. Üst panel dikey eksen etrafında 90° döndürülmüş orta paneldeki yapılar ile doğrudan aktif bölge kanyonlarının görüntülerini sunar. Alt paneller, BChE'nin bağlanma bölgelerinin büyütülmüş görüntülerini sunar.	18
Şekil 3.1. Sentezlenen moleküllerin çıkış moleküllerinin sentez şeması.....	29
Şekil 3.2. Sentezlenen sülfonamid türevleri (6-10)	30
Şekil 4.1. Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı	32
Şekil 4.2. Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu.....	32
Şekil 4.3.Ç Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin ^1H NMR spektrumu	33

Şekil 4.4. Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin ¹³ C NMR spektrumu	33
Şekil 4.5. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı	34
Şekil 4.6. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu.....	34
Şekil 4.7. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin ¹ H NMR spektrumu	35
Şekil 4.8. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin ¹³ C NMR spektrumu	35
Şekil 4.9. Bileşik 8'in kimyasal yapısı.....	36
Şekil 4.10. Sentezlenmiş olan 8 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu...	36
Şekil 4.11. Sentezlenmiş olan 8 numaralı sülfonamid türevinin ¹ H NMR spektrumu	37
Şekil 4.12. Sentezlenmiş olan 8 numaralı sülfonamid türevinin ¹³ C NMR spektrumu	37
Şekil 4.13. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı	38
Şekil 4.14. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu...	38
Şekil 4.15. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin ¹ H NMR spektrumu	39
Şekil 4.16. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin ¹³ C NMR spektrumu	39
Şekil 4.17. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı ...	40
Şekil 4.18. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu.	40
Şekil 4.19. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin ¹ H NMR spektrumu	41
Şekil 4.20. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin ¹³ C NMR spektrumu	41
Şekil 4.21. Bileşik 6 için hCA I IC ₅₀ grafiği..	42
Şekil 4.22. Bileşik 7 için hCA I IC ₅₀ grafiği..	42
Şekil 4.23. Bileşik 8 için hCA I IC ₅₀ grafiği..	43
Şekil 4.24. Bileşik 9 için hCA I IC ₅₀ grafiği..	43
Şekil 4.25. Bileşik 10 için hCA I IC ₅₀ grafiği..	44
Şekil 4.26. Bileşik 6 için hCA II IC ₅₀ grafiği.	44
Şekil 4.27. Bileşik 7 için hCA II IC ₅₀ grafiği..	45

Şekil 4.28. Bileşik 8 için hCA II IC50 grafiği..	45
Şekil 4.29. Bileşik 9 için hCA II IC50 grafiği..	46
Şekil 4.30. Bileşik 10 için hCA II IC50 grafiği..	46
Şekil 4.31. Bileşik 6 için AChE IC50 grafiği..	47
Şekil 4.32. Bileşik 7 için AChE IC50 grafiği..	47
Şekil 4.33. Bileşik 8 için AChE IC50 grafiği..	48
Şekil 4.34. Bileşik 9 için AChE IC50 grafiği..	48
Şekil 4.35. Bileşik 10 için AChE IC50 grafiği..	49
Şekil 4.36. Bileşik 6 için BChE IC50 grafiği..	49
Şekil 4.37. Bileşik 7 için BChE IC50 grafiği..	50
Şekil 4.38. Bileşik 8 için BChE IC50 grafiği..	50
Şekil 4.39. Bileşik 9 için BChE IC50 grafiği..	51
Şekil 4.40. Bileşik 10 için BChE IC50 grafiği.....	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CA	: Karbonik anhidraz
AChE	: Aserilkolinesteraz
BChE	: Butirilkolinesteraz
EC	: Enzim komisyonu
ACh	: Asetilkolin
AH	: Alzheimer hastalığı
IC ₅₀	: Enzimin aktif bölgesinin yarısının subtrat ile dolduğu andaki inhibitör konsantrasyonu
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
MS	: Multiple Skleroz
PD	: Parkinson hastalığı
mL	: mililitre
M	: Molar
Mg	: miligram
AChI	:Asetiltiyokolin iyodat
BChI	:Butiriltiyokolin iyodat
PNFA	:p-Nitrofenilasetat

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ

1.1. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1; CA), her organizmada yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{2+} iyonu ihtiva eden metalloenzimdir. CA CO_2 'in hidratasyonunu ve HCO_3^- 'ın dehidratasyonunu katalize eder (Supuran and Scozzafava 2001).



Şekil 1.1. CA enzimlerinin katalizlediği tepkime (Zamanova et al. 2019)

CA ayrıca karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizlenmesinin yanı sıra ürenin siyanamite, siyanatın karbamata ve aldehitin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalize eder (Supuran and Scozzafava 2001). CA enzimi ilk defa, birbirlerinden haberdar olmayan Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından 1933 yılında keşfedilmiştir. Eritrositlerden akciğer kılcallarına bikarbonatın hızlı transferini gerçekleştiren katalitik faktörün arandığı bir çalışma neticesinde ilk olarak enzimin karakterize edilmesi gerçekleştirilmiştir. Keilin ve Martin (1944), CA enzimindeki çinko miktarı ile enzimin aktivitesinin orantılı olduğunu tespit ederek çinkonun enzimin işlevselliğinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Bu minvalde CA enzimi, tanımlanmış olan ilk metalloenzim olmuştur (Hisar vd 2003).

Günümüze kadar; filogenetik olarak 8 gruba ayrılmış farklı CA grupları belirlenmiştir. Bunlar; α -, β -, γ -, δ -, ζ - η -, θ - ve ι - CA gruplarıdır (Maciel *et al.* 2022).

α -CA omurgalılarda, bakterilerde, alglerde ve bitkilerde mevcuttur. β -CA bakteri, alg ve bitkilerde daha yaygın iken; γ -CA'lar esas olarak Arkaea ve bazı bakterilerde bulunur; δ -CA ve ζ -CA sadece deniz diyatomlarının bazılarında bulunur. Karbonik anhidrazların α grubu monomerik izoenzimler olup katalitik aktivitesi en iyi olan gruptur. Karbonik anhidraz izoformlarından 16 adet Memelilerde izole edilmiş

olup memeli olmayan omurgalılarda da birkaç izozim elde edilmiştir. α -CA gen ailesinden üç farklı grup CA izoenzimi tanımlanmıştır. Bu gruplardan CA I, II, III, V, VII ve XIII sitoplazmada bulunur iken; CA IV, IX, XII, XIV ve XV izoenzimleri hücre membranında; CA VIII, X ve XI ise protein bağımlı CA grubudur. Yüksek bitkilerdeki CA izoformlarının çoğu β - grubu olup β - grubu CA'lar dimer, tetramer ya da oktomer yapıdadır. γ -karbonik anhidraz, *Methanosarcina thermophila* bakterisinde bulunan bir homotrimerdir. Deniz diyatomu *Thalassiosira weissflogii*'de bulunan monomerik CA TWCA 1; δ -CA grubunun ilk örneğidir. ζ - grubu CA'ların temel olarak aynı protein omurgasında biraz farklı üç aktif bölgeye sahip monomer yapıda olmaları muhtemeldir.(Lionetto *et al.* 2012).

δ -, ζ - η -, θ - ve ι - familyaları doğada daha az bulunan CA gruplarıdır. Hem δ - hem de ζ -CA'lar deniz diyatomlarında karbon konsantrasyonu sürecinden önemli rol oynadıkları anlaşılmıştır. η - CA grubuna yalnızca plazmodium türlerinde rastlanılmıştır. θ - ve ι -grubu karbonik anhidrazlar deniz diatomları ve bakterilerde, θ - grubu bunların yanı sıra alglerde bulunabilir. Aktif yapısında Zn içeren θ -grubu Karbonik anhidrazların fotosentez ve diyatomlarda büyüme rol oynadığı rapor edilmiştir. ι - grubu Karbonik anhidrazlar için sınırlı sayıda araştırmalar yapılarının dimer olduğunu ve aktif bölgelerinde Zn^{2+} iyonu yerine Mn ihtiva edebileceği belirtilmiştir (Maciel *et al.*, 2022).

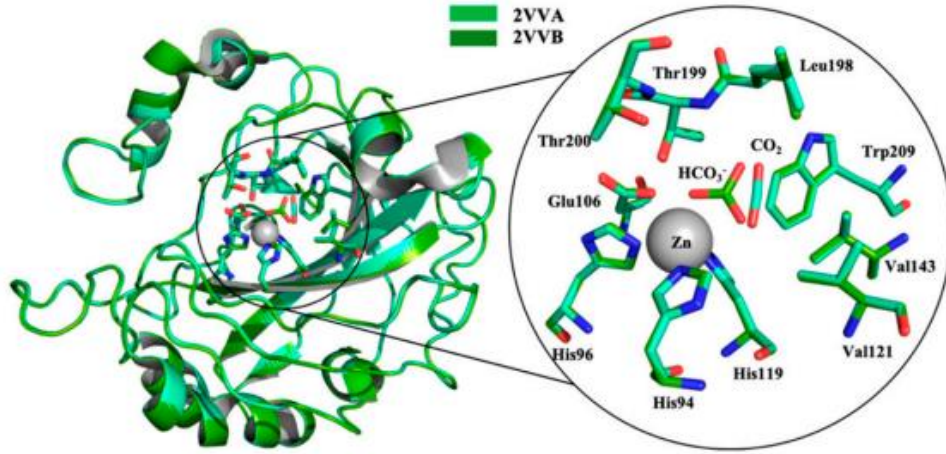
Tablo 1.1. Karbonik anhidrazların sınıflandırılması, bu sınıfların yapıları ve bulundukları canlılar (Maciel *et al.* 2022).

CA Sınıfı	Tanımlandığı Canlı	Tür Örneği	Yapısı Ve Aktif Bölgedeki Metal İyonu
α	Hayvan	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus Musculus</i>	Monomer, dimer veya tetramer yapıda olabilirler. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Zn'dur
	Bakteri	<i>Vibrio Cholerae</i> <i>Sulfurhydrogenium</i> <i>Yellowstonense</i>	
	Alg	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Dunaliella salina</i>	
	Bitki	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Oryza sativa</i>	
	Mantar	<i>Aspergillus oryzae</i>	

β	Bakteri	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Dimer, tetramer hegzamer yada oktomer yapıda olabilir.
	Arke	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	
	Prokaryot	<i>Trichonoma vaginalis</i>	Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Zn'dur.
	Mantar	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	Hayvan	<i>Drosophila megalongaster</i>	
	Alg	<i>Porphyridium purpureum</i> <i>Coccomyxa</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	
	Bitki	<i>Pisum sativum</i>	
γ	Bakteri	<i>Sulfurihydrogenibium yellowstonense</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Homotrimer yapıdadır. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Zn'dur.
	Arke	<i>Myceliophthora thermophila</i> ,	
	Bitki	<i>Saccharina japonica</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	
δ	Deniz Diyatomu	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Monomer yapıdadır. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Zn'dur.
ζ	Deniz Diyatomu	<i>Thalassiosira weissflogii</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i>	Monomer yapıdadır. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Cd yada Zn'dur.
η	Ökaryot	<i>Plasmodium ssp.</i>	Yapısı tanımlanamamıştır. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Zn'dur.
θ	Deniz Diyatomu	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Yapısı tanımlanamamıştır. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Zn'dur.
	Bakteri	<i>Phaenodactylum tricorutum</i>	
	Alg	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	

1	Deniz Diyatomu	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Dimer yapıdadır. Aktif Bölgede bulunan metal iyonu Mn'dır.
	Bakteri	<i>Burkholderia territori</i>	

α -CA'ların aktif bölgesi, üç ana bileşenden oluşan 15 Å derinliğinde bir hidrofobik ceptir: Bu bileşenlerden birincisi 2 değerlikli bir metal iyonu; bu ZN2 ile temsil edilir. İkincisi üç histidin kalıntısı, bunlar imidazol kısmı sayesinde metal iyonunu bağlayan His94, His96 ve His119'dur. Son olarak da enzimin aktif olmayan durumunda, aktif formu temsil eden enzimin hidroksile edilmiş halini üretmek için bir protonu kaybeden bir su molekülüdür (Pogetti *et al.* 2022).



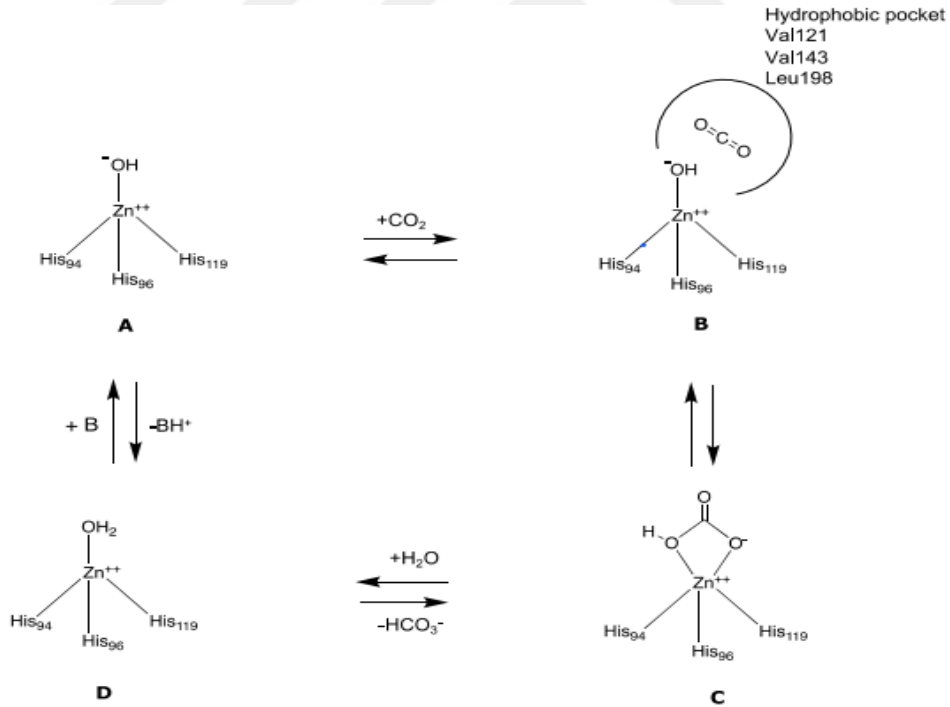
Şekil 1.2. α -CA katalitik bölgesi: CA II kristal yapısının CO (pdb 2VVA) ve HCO₃⁻ ile kompleks halde süper pozisyonu. Çember içerisinde katalitik alan büyütülmüştür (Pogetti *et al.* 2022).

α -, β -, γ -, δ -, ζ - η grubu CA'ların katalitik mekanizmaları iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Bu enzimlerin katalitik bölgelerinde bir metal hidroksit türü dördüncü ligand olarak bulunur. A-CA'lar Zn ihtiva eder ve hayvanlarda, verte bratlarda, prokaryotlarda, mantarlarda, alglerde, protozoalarda ve bitkilerde bulunur (Akocak and Supuran 2019).

α -CA'ların katalizlediği CO₂ hidrasyonu, aşağıda gösterildiği gibi iki farklı adımda gerçekleşir:

$E-Zn-OH + CO_2 \leftrightarrow E-Zn-HCO_3^- + H_2O \leftrightarrow E-Zn-OH_2 + HCO_3^-$ (Purkerson and Schwartz 2007).

Enzimin aktif olmayan hali Zn'ye bağlı bir su molekülü tarafından oluşur. (Şekil D) Bu molekül ilk olarak bir protonunu kaybederek hidroksile bir türe dönüşür. Bu hidroksile tür aktif bir türdür. (Şekil A) Hidroksilli iyon hidrofobik cebin yakınında bulunan CO₂ molekülü üzerinde güçlü nükleofilik etki gösterir. (Şekil B) Bu durum HCO₃⁻'ün çinko iyonuna koordine olduğu türlerin oluşumuna sebep olur. (Şekil C) Akabinde Bikarbonat iyonu Zn'den uzaklaştırılır ve çözelti içinde su molekülü tarafından çözelti içine salınır. (Şekil D) Ve Katalitik döngü tekraren başlayabilir. Enzim aktivasyon sürecinde hız kısıtlayan basamak ZN²⁺'ye bağlı su molekülünden çevreye proton transferinin olduğu aşamadır. Yani proton mekiğinin olduğu basamaktır. Enzimin doğal durumunda bu reaksiyon proton mekiği görevi gören Histon 64'ün bazik kısmı veya imidzol grubu sayesinde meydana gelir (Pogetti *et al.* 2022).



Şekil 1.3. Karbinik Anhidrazın Katalitik Döngüsü A) Su molekülü enzimi hidroksillenmiş türe dönüştürür. B) Hidroksile iyon CO₂ molekülüne saldırır. C) HCO₃⁻ 'ün ZN iyonu ile koordine olduğu tür oluşur. D) Enzimin aktif olmayan yapısı tekraren oluşur (Pogetti *et al.* 2022).

CA'lar, fizyolojik bakımdan önemli role sahiptirler. Dokuların çoğunda asit-baz dengesini sağlamaları hasebiyle dokulardaki ph düzeyinin düzenlenmesi karakteristik özellikleridir. CA'lar dokuların ph düzeyinin sağlanmasının yanı sıra glukoneogenez, lipjenez ve üre sentezi gibi biyosentetik reaksiyonlar ve kalsifikasyon, tümör oluşumu gibi patolojik ve süreçlerde de rol oynarlar. CA'ların çok sayıda patolojik ve fizyolojik olgularda rol alması CA enzimlerini kanser, glokom, ödem, epilepsi, Alzheimer osteoporozis ve obezite gibi patolojik durumların tedavisinde hedef molekül yapmıştır. Bu gibi hastalıkların tedavi edilmesinde CA'ların aktive ya da inhibe edilmesi amaçlanmaktadır (Akkemik vd. 2017).

Tablo 1.2. CA ilişkili hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisinde hedef alınan CA İzofomu (Lomelino *et al.* 2016).

Hastalık	Hedef Alınan CA İzofomu
Glokom	CA II, CA IV, CA XII
Kanser	CA IX, CA XI
Epilepsi	CA VII
Nöropatik Ağrı	CA VII
Obezite	CA VA

Karbonik anhidrazları aktive ederek tedavide kullanılan onay almış hiçbir ajan mevcut değilken, CA inhibitörleri genellikle tedavide esasen anti-glokom ajanları, anti-epileptikler ve diüretikler olarak kullanılmakta olup kanser ve obezite tedavisinde araştırmalar devam etmektedir (Chiaramonte *et al.* 2018).

Etki mekanizmasına bağlı olarak beş farklı CAI sınıfı bilinmektedir:

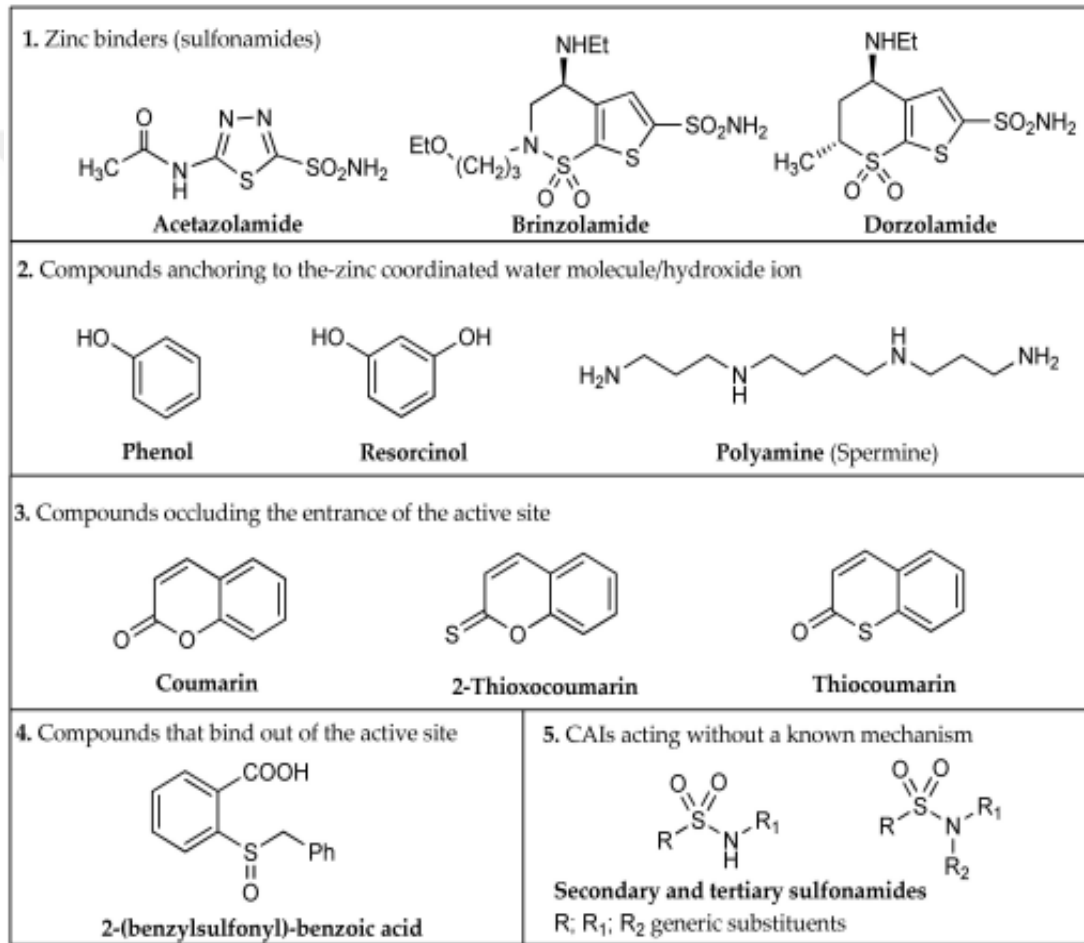
1.Çimko bağlayıcılar. Başka bir deyişle Enzimin aktif bölgesinin bivalent metal iyonunu şelatlayan bileşikler. Bu reaksiyonun netiesinde Zn^{2+} atomu ile su molekülü/hidroksit iyonu arasındaki koordinasyon bozulur ve Enzimin katalitik etkinliği son bulur. Bu grup inhibitörler en önemli grubu oluştururlar. Sülfonamidler ve bunların izosterleri (sülfamatlar veyasülfamidler), ditiokarbamatlar, hidroksamat, vb.) bu grupta yer alır. Bu grupta yer alan sülfonamidler en yaygın olarak kullanılan Karbonik anhidraz inhibitörüdür. Yıllardır en az 20 molekül sülfonamid türevi klinik olarak kullanılmıştır.

2. çinko koordineli su molekülü/hidroksit iyonuna bağlanan moleküller. Bu gruba Fenoller ve poliaminler örnek olarak verilebilir.

3. Aktif bölgenin girişini tıkayan bileşikler. kumarinler ve bunların izosterleri bu gruba örnek olarak verilebilir.

4. Aktif bölgenin dışından bağlanan moleküller. 2-(benzilsülfonil)benzoik asit bu gruba yer alır.

5. Bilinen belirli bir mekanizma olmadan hareke eden moleküller. İkincil ve üçüncül sülfonamidler ve imatinib bu gruba örnektir (Chiaramonte *et al.* 2018).



Şekil 1.4. Etki mekanizmalarına göre 5 sınıfa ayrılmış CA İnhibitörleri (Chiaramonte *et al.* 2018).

Bilinen en güçlü organik karbonik anhidraz inhibitörleri ise sülfonamiterdir. Bu sebeple, KAİ ilaçların senteziyle ilgili çalışmalarda motif olarak en çok sülfonamidler kullanılmıştır (Şen vd., 2017).

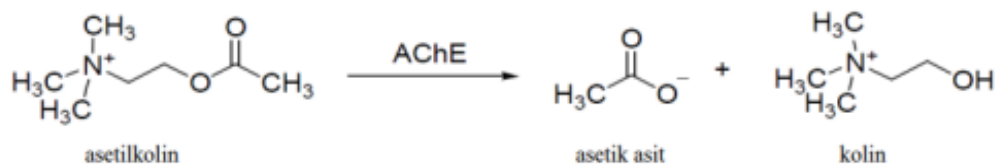
1.2. Kolinesterazlar

Esterazlar, hidrolaz grubu enzimler olup bir su molekülü ile esterlerin reaksiyonunu katalize ederek reaksiyon sonucunda asit ve alkol grubu bileşikler oluştururlar. Farklı tipte esterazlar mevcuttur. Farklı kolinesteraz enzimlerin protein yapıları, fonksiyonları farklı olup farklı substratlara farklı spesifite gösterirler (Oakeshott *et al.* 1993).

Omurgalılarda asetilkolinesteraz (AChE; asetilkolin hidrolaz) ve bütirikolinesteraz (BChE; açilkolin açilhidrolaz) olmak üzere kolin esterlerini hidrolize uğratan iki tip kolinesteraz enzimi mevcuttur. Bu iki tip kolinesteraz enzimi yapısal olarak birbirine oldukça benzer enzimler olup katalizledikleri substrata spesifikliğı, ihtiva edildiğı dokular ve inhibitörlere hassasiyetleri açısından farklılıklar göstermektedirler (Demir ve Türkan 2022).

BChE, kolin esterlerinin hidrolizlenme reaksiyonlarını katalize eden bir serin hidrolaz enzimi olup özgül olmayan kolinesteraz ya da psödokolinesteraz olarak da bilinmektedir (Darvesh *et al.* 2003).

İki kolinesteraz enzimi de asetilkolin hidrolizinde rol oynamaktadırlar. AChE enziminin BChE enzimine göre asetilkolinin hidrolizini daha hızlı katalize ettiği belirlenmiştir. Enziminin en hızlı hidrolizlediği kolin esteri butirilkolindir. Bu nedenle bu kolinesteraz enzime BChE adı verilmiştir. BChE’a santral sinir sistemi sinapslarında pek rastlanmadığından BChE’ın bu sinapslarda asetilkolinin hidrolizinde görevi yoktur (Demir ve Türkan 2022).



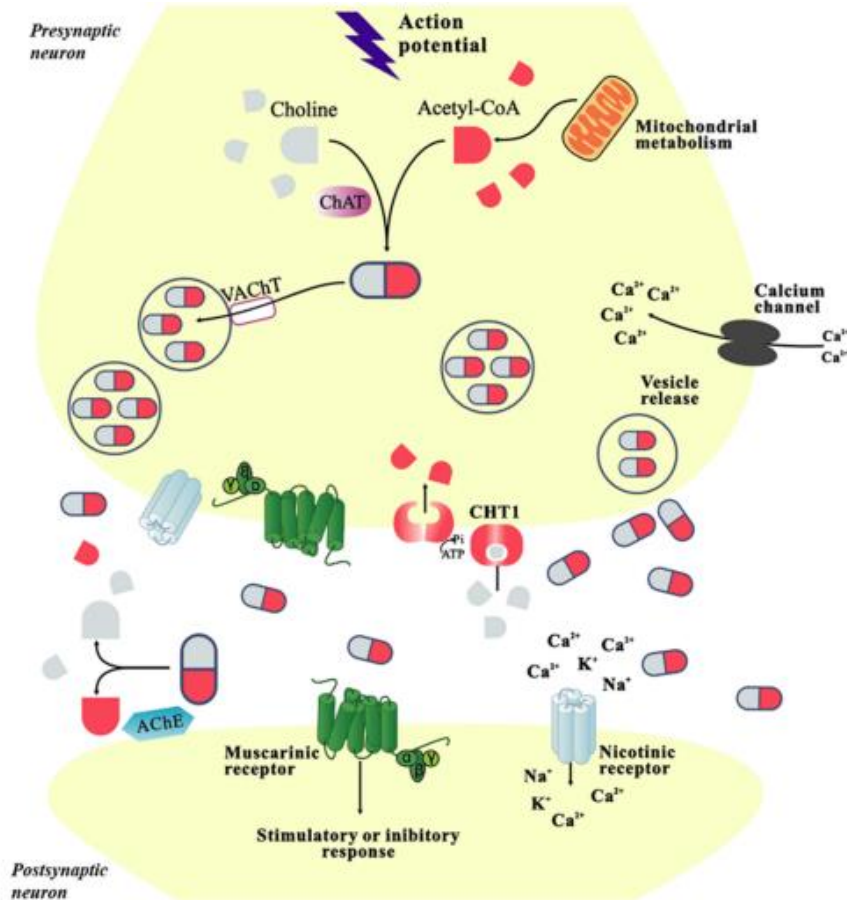
Şekil 1.5. Asetilkolinin hidrolizi.

1.2.1. Asetilkolin

Asetilkolin (ACh), tanımlanmış olan ilk nörotransmitter madde olup santral ve periferik sinir sisteminde merkezi role sahip kolinerjik nöronlar tarafından kullanılmaktadır. ACh tüm pre ve post ganglionik parasempatik nöronlar, tüm pre ganglionik sempatik nöronlar ve post ganglionik sempatik nöronların bir kısmı tarafından kullanılmaktadır (Ferreira-Vieira *et al.* 2016).

Nörotransmitter olan ACh'in sentezi, depolanması ve salınması kolinerjik nöronlarca gerçekleşir. ACh santral sinir sistemi ve periferik sinir sistemi üzerindeki nörotransmitter etkilerini muskarinik ve nikotinik ACh reseptörleri üzerinden gösterir. ACh nörotransmitter olarak kolinerjik nöronlardan salındığı gibi hücreler arası iletişimde rol alan nöronal olmayan dokular tarafından da salınır ve bu dokularda hücre çoğalması, yapışma, göç, salgılama, hayatta kalma ve apoptoz gibi temel hücresel olaylarda rol alır (Zoli *et al.* 2018).

ACh, lipid metabolizmasında rolü olan kolin ve mitokondride hücresel solunumda bulunan asetil koenzim A molekülünden türetilir. ACh'ı asetil koenzim A ve kolin moleküllerinden türetmek için nöron gövdelerinde konumlanan, ribozomlarda oluşturulan, ve akson terminaline taşınan, kolinasetiltransferaz (ChAT) enzimi gerekmektedir. ACh, ilkin, akson terminalin sitoplazmasında ChAT enzimi tarafından sentezlenir akabinde veziküler asetilkolin taşıyıcı (VAChT) tarafından sinaptik vesiküller içinde konsantre edilir. Bir eylem potansiyeli neticesinde ACh sinaptik boşluğa salınır. Sinaptik boşluğa salınmış olan ACh hem pre hem de postsinaptik membran üzerinde konumlanmış olan ACh reseptörlerine (AChR) bağlanır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, nörotransmisyonun gerçekleşmesinden sonra bağlanmış olduğu ilgili reseptörden ayrılır. Reseptörden ayrılan veya sinaptik boşlukta bulunan serbest ACh molekülleri AChE enzimi ile hidrolize olur. AChE enziminin katalitik aktivitesi sonucunda oluşan kolin tekraren kullanılmak üzere presinaptik nörona iletilir (Koçancı ve Aşım 2016).



Şekil 1.6. ACh nörotransmisyonunun şematik diyagramı. ChAT enzimi tarafından asetil koA ve kolinden presinaptik nöronların sitoplazmasında ACh sentezlenir. Daha sonra veziküler VACHT aracılığıyla sinaptik veziküler foliküllere aktarılır. (Chen *et al.* 2022).

Nörodejeneratif hastalıklar genellikle kolinerjik sistemle ilişkilidir; ana nörotransmitter ACh molekülüdür. AChE ile parçalanır. AChE inhibitörleri veya muskarinik ve nikotinik reseptör (nAChR) agonistleri genellikle bu hastalıkları tedavi etmek için kullanılır (Walczak-Nowicka and Herbet 2021).

Bazal ön beyinde bulunan kolinerjik nöronlar santral sinir sistemindeki kolinerjik sinyal iletiminin önemli bileşenleridir. Bu nedenle hafıza, dikkatin düzenlenmesi ve bilişsel fonksiyonlarda önemli rol oynarlar. Bu nöronlarda meydana gelen hasarların Alzheimer hastalığı dahil nörodejeneratif hastalıklarda önemli etken olduğu gösterilmiştir. (Dwomoh *et al.* 2022)

Günümüzde Alzheimer hastalığının oluşum sebebinin açıklanmasında başvurulan hipotezlerden biri kolinerjik hipotezdir. Kolinerjik hipotez Alzeihmer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların mekanizmasının dayandırıldığı bir hipotezdir. Kolinerjik hipoteze göre kortekste Ach miktarının azaldığı öne sürülür. Bu hipoteze göre; santral sinir sisteminde ACh Düzeyinin azalmasının sebepleri şunlardır;

- 1-AChE enziminin katalitik aktivitesinin yükselmesi
- 2- ChAT enziminin katalitik aktivitesinin düşmesi
- 3-Sinaptik yarıktaki kolinin re-uptake'nin olmaması.
- 4-Bazal ganglionlarda kolinerjik perikaryal kayıpları

ACh nörotransmitterinin hafıza zeka ve öğrenmede aldığı rol ile bu veriler göz önüne alındığında kolinerjik hipotez ortaya çıkmıştır (Demir ve Türkan 2022).

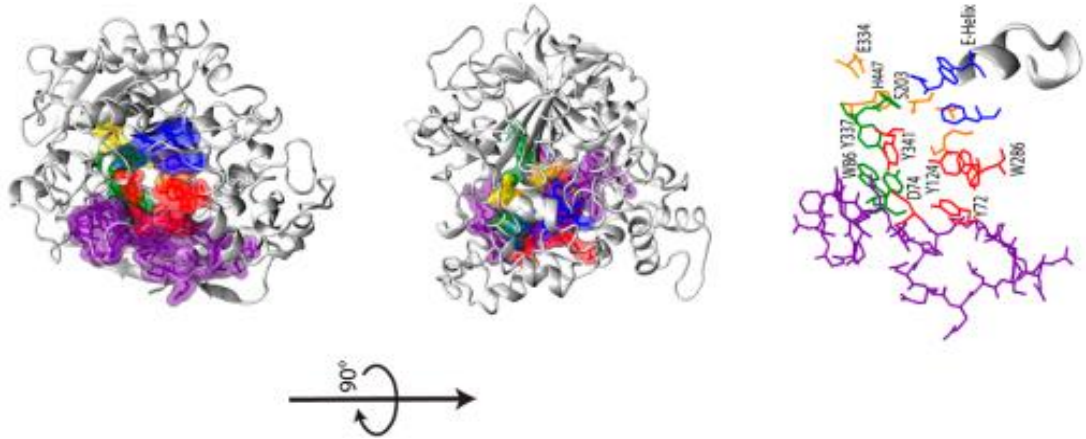
1.2.2. Asetilkolinesteraz

AChE, ACh'nin hidrolizini ACh'yi asetat ve koline ayırarak gerçekleştirir ve ACh'nin sinaptik boşluktan ayrılmasını sağlar. AChE enziminin çeşitli morfolojik proselerde, sinir sistemindeki hücre farklılaşması ve sinaps oluşum sürecinde, hücre apoptozisinde ve hücre adezyonunda ve göçünde rol aldığı çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (Koçancı ve Aslım 2016).

AChE monomer, dimer veya tetramerik formda ortaya çıkabilir. Örneğin beyinde tetramerik form (G4) baskındır ve dimerik form (G2) esas olarak eritrositlerde bulunur. AChE, yaklaşık olarak $45 \times 60 \times 65$ Å boyutlarında elipsoidal şekilde olan bir enzimdir. 537 aminoasit ihtiva eder. Enzimin bağlanma yeri birkaç alt bölgeden oluşur. Bu bağlama bölgeleri, açıl cep, oksianyon deliği, anyonik bölge ve periferik anyonik bölgedir. Enzim yapısı, enzimin yarısına sirayet eden (20 Å uzunluğunda), enzimin tabanına doğru uzanan dar ve derin bir geçide sahiptir. Geçidin kaplanması ve tabanı Asn-66 ve Ile-444 kalıntılarından meydana gelmektedir.. Ayrıca Asp-285, Glu-273, Asp-72, Tyr-334 ve Glu-199 gibi kalıntılar da ihtiva eder. Serin (Ser-203), histidin (His-447) ve glutamat (Glu-334) Enzimin katalitik üçlüsüdür. Enzimin aktif

bölgesinde bulunan aromatik kısımlar, kuaterner ligandinlerin bağlanması için önemlidir.

Enzimin anyonik bölgeSİ Trp-86, Trp-84 ve Phe-330 kalıntılarını ihtiva eder. Trp-86 kalıntısı, kolinin kuaterner amonyum grubunu ve aktif merkez inhibitörlerini, örneğin katyon-pi etkileşimi yoluyla edrofonyumu bağlar. Phe-295 ve Phe-297 kalıntılar, kovalent etkileşimler için açıl cebin substrat spesifikliğınden sorumludur. Phe-295 kalıntısı, non-kovalent enzim substrat kompleksindeki substrat spesifikliğınden de sorumludur. Oksianyon deliğı, Gly-121, Gly-122 ve Ala-204 gibi omurga peptidlerinin N-H gruplarından meydana gelir. Periferik anyonik bölgede bulunan Trp-286'nın ve daha önce anılan Trp-86, periferik anyonik bölge ligandının inhibisyon prosesinde önemlidir, AChE aktif bölgesine plastisite sağlar. Periferik anyonik bölgenin açılasyon bölgesine substrat girişı için bir ilk bağlanma yeri olarak hareket edebileceğı veya katyon klirensini ve ürün salımını regüle edebileceğı işlevine sahip olacağı düşünülmektedir. (Walczak-Nowicka and Herbet 2021).



Şekil 1.7. AChE enzimi görseli. Üst panel dikey eksen etrafında 90° döndürülmüş orta paneldeki yapılar ile doğrudan aktif bölge kanyonlarının görüntülerini sunar. Alt paneller, AChE'nin bağlanma bölgelerinin büyütülmüş görüntülerini sunar. (De Boer *et al.* 2021).

AChE, morfojenik fonksiyon dahil çok sayıda süreçte rol oynamaktadır. AChE, sinir sistemi gelişimi sürecinde nöromusküler bağlantıların, talamokortikal bağlantıların ve akson büyümesinde rol almaktadır. Nöron oluşum sürecinde hücre mimarisi değişikliklerinde düzenleyici ve neokorteksde nöroplastik proseslerde de rol alabilir. AChE, ayrıca apoptozda da rol almaktadır. AChE'nin daha kolay ifadesinin

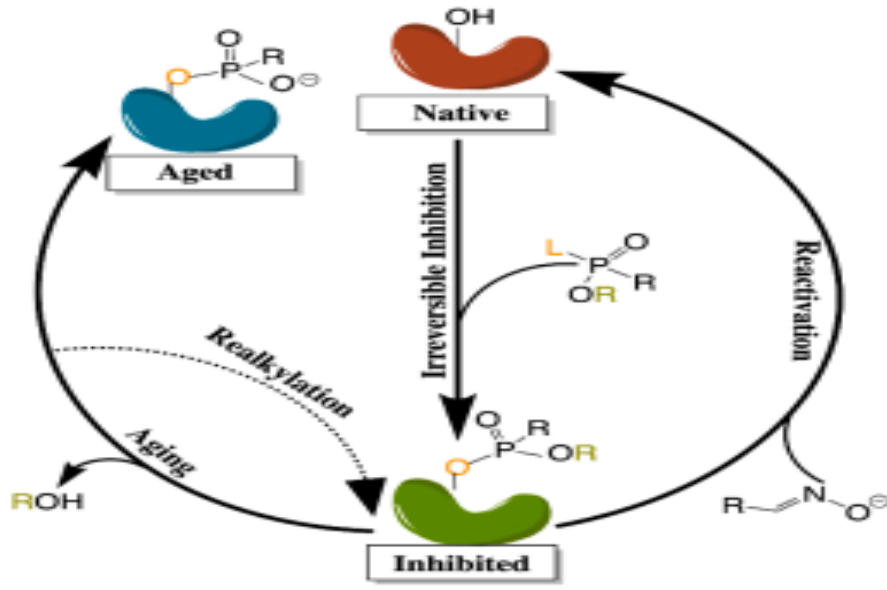
olduğu hücreler apoptoza uğrar ve enzimin inhibisyonu apoptozisin durmasına sebep olur. AChE'nin hücre adezyon molekülleri ile homolojisi ve yapısal benzerliği hasebiyle AChE'nin hücre adezyonunda işlevsel olduğu öngörülmektedir. (Walczak-Nowicka and Herbert 2021).

Anti- kolinesterazlar veya AChE inhibitörleri, ACh'in hidrolizini önleyerek ACh'in nörotransmitter süresini ve düzeyini artırırlar, AChE inhibitörleri . Etki biçimine göre iki gruba ayrılabilir: Reversibl ve İrreversibl inhibitörler. Reversibil inhibitörler kompetitif veya non-kompetitif inhibitörler olmak üzere iki şekildedirler. Kompetitif veya non-kompetitif reversibl inhibitörler genellikle terapötik işleve sahipken, İrreversibl inhibitörler toksik durumlara sebep olurlar. Reversibl AChE inhibitörleri, AChE enziminin aktivitesinin farmakolojik olarak düzenlenmesinde önemli bir role sahiptirler (Colović *et al.* 2013).

Karbamat ve Organofosfatlı pestisitler, toksisitelerini asetilkolinesterazı inhibisyona uğratarak gösterirler. Bu pestisitler, AChE inhibisyonunu aktif bölge serin grubuna bağlanarak gerçekleştirirler. AChE'nin Karbamile serin formu fosforile formdan daha az stabildir ve karbamil kısmı, kendiliğinden hidroliz yoluyla enzimden kopabilir. AChE'nin organofosfatlı pestisitlerle inhibisyonunun irreversibl olması karbamatların tersinir inhibisyonuna göre daha toksik olmasına neden olur. Bu nedenle AChE'nin bir kısmını sinir ajanları tarafından irreversibl inhibisyonundan korumak için bir ön tedavi olarak karbamat piridostigmininden yararlanılmaktadır.

Antikolinesterazların akut toksik etkisi, kolinerjik sinapslarda ACh düzeyinin kontrolsüz olarak artışı ile gerçekleşir ve bu durum kolinerjik sendromla sonuçlanır. Bunun sonucu olarak istem dışı dışkılama, kas felci, hipertansiyon, kasılmalar, titreme, nöbetler ve solunum depresyonu gibi semptomlar oluşur (Tattersall 2018).

AChE'nin irreversibl inhibisyonunda inhibitör enzime kovalent bağla bağlanır. Enzimi irreversibl inhibisyonunda enzim-inhibitör kompleksi ancak enzimin yok edilmesi oksidasyonu veya hidrolizi ile ayrışabilir (Gürsoy ve Gürsoy 2017)

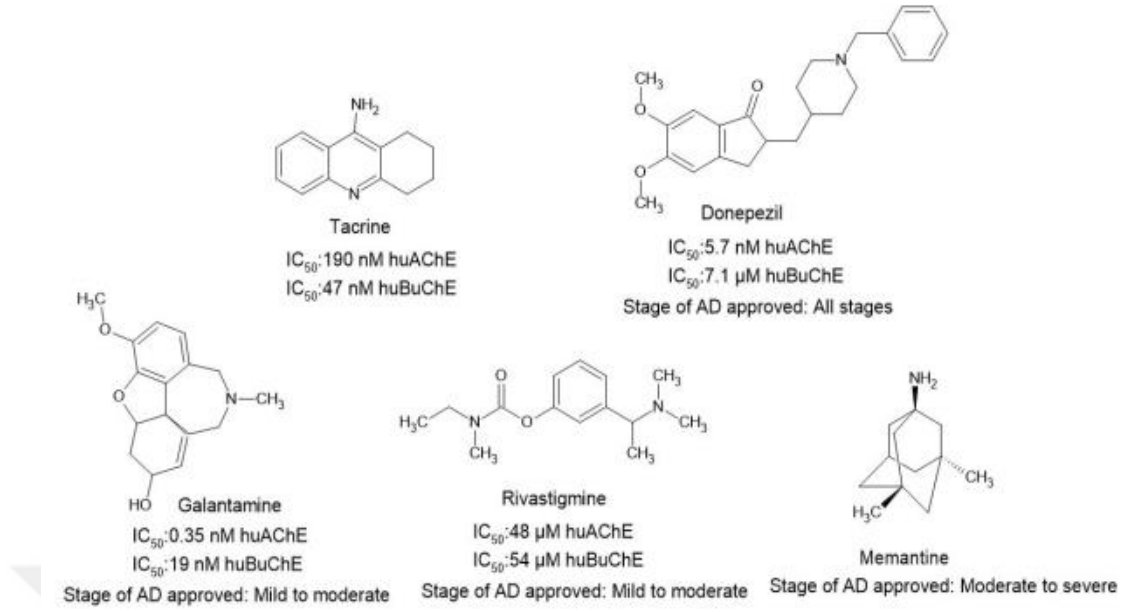


Şekil 1.8. Organofosfatlarca gerçekleşen AChE'nin irreversibl inhibisyonu. Mavi yaşlı enzimi; yeşil inhibe olmuş enzimi temsil eder. L ve R, inhibisyon ve reaktivasyon yollarını takip ederek sırasıyla birinci ve ikinci ayrılan organofosfat gruplarını temsil eder (Boer *et al.* 2021).

Reversible inhibisyonunda inhibisyona uğrayan enzim etkinliğini tomonla veya suyla yıkama ile ilk etkinliğine dönebilir. Substrat konsantrasyonunun ya da inhibitöre göre enzim konsantrasyonunun arttırılması ile bu tip inhibisyonlarda enzim ile inhibitör arasındaki ilişki tersine dönebilir. Bu inhisisiyon farklı şekillerde gerçekleşebilir. Bu nedenle farklı reversible inhibisyon türleri vardır. Bu farklı reversble inhibisyon türlerinden ilki (kompetitif) inhibisyonudur. Kompetitif inhibisyonunda inhibitör enzimin aktif bölgesine substratla yarışarak bağlanarak reaksiyonun gerçekleşmesini inhibe eder. İkincisi, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonudur. Bu tür reversibl inhibisyonunda enzimin yapıcı substrarla benzerliği yoktur. Bu nedenle inhibitör enzimin substratın bağlanmadığı bir bölgesine veya enzim substrat kompleksine bağlanarak tepkimeyi yavaşlatır. Kompetitif ve non kompetitif inhibitörler farklı şekillerde inhibe ettikleri enzimin kinetiğini etkilerler. Non- kompetitif inhibisyonunda Michaelis Menten sabiti sabit kalıp maksimum hız azalırken kompetitif inhibisyonunda maksimum hız sabit kalır ancak Michaelis Menten sabiti artar (Gürsoy ve Gürsoy 2017).

Reversibl AChE inhibitörleri karbamat, kuaterner veya üçüncül amonyum grubu gibi farklı fonksiyonel gruplara sahip bileşikleri içerir ve myastenia gravis alzheimer, glokom, ameliyat sonrası ileus, mesane distansiyonu, gibi hastalıkların tedavisinde ve antikolinerjik doz aşımına karşı antidot olarak kullanılmaktadır (Colović *et al.* 2013).

AChE inhibitörleri terapötik amaçlı olarak çoğunlukla yetersiz seviyede olan ACh düzeylerini arttırmak amaçlı kullanılırlar. Bu minvalde en eski uygulama oftalmolojide glokom tedavisine yöneliktir. Fizostigmin önceden bu amaçla kullanılmaktayken yerini büyük ölçüde pilokarpin gibi kolinomimetiklere bırakmıştır. Nöromusküler kavşakta yetersiz ACh nedeniyle kas zayıflığının meydana geldiği miyastenia gravis tedavisinde doğal AChE inhibitörleri kullanılmaktaydı. Ancak Fizostigminin vücuttaki dağılımı çok geneldir olduğundan Fizostigmin'in sentetik analogları yapılmıştır ve terapötik kullanımda en çok kullanılan ikisi, dördüncül bir nitrojen içeren neostigmin ve piridostigmin olmuştur. Alzheimer hastalığı ile beyindeki düşük ACh düzeylerini ilişkilendiren hipotezin ortaya çıkışıyla, AChE'nin ACh düzeylerini arttırabilmesi hasebiyle AChE inhibitörlerinin kullanımına yeni bir yön vermiştir. (Houghton *et al.* 2006). Bu minvalde, Bir takım Kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmiştir. Donepezil, galantamin, rivastigmin ve memantin günümüzde mevcut ve ulaşılabilir olan Alzheimer tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörleridir. Fakat bu ilaçların yüksek düzey kullanımlarda çeşitli yan etkiler ortaya çıkarmış ve terapötik etkinlikleri sınırlıdır (Sharma 2019).



Şekil 1.9. Kolinesteraz enzim inhibitörü olan ilaç moleküllerinin kimyasal yapıları ve bunların insan AChE ve BChE enzimine karşı inhibitör değerleri ve Glutamat N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin non-kompetitif antagonisti memantin (Yıldırım ve Güzeldemirci 2023).

Geleneksel Kolinesteraz İnhibitörleri şunlardır:

- **Fizostigmin:** Fizostigmin ayrıca eserin olarak adlandırılır. Fizostigmin kan-beyin bariyerini (BBB) geçebilse de, yarılanma ömrünün kısa olması ve çok sayıda yan etki oluşturması sebepleri ile dar bir terapötik etkili bir ilaçtır.
- **Takrin:** Takrin hem AChE hem de BChE enzimlerinin etkili bir inhibitörüdür. Buna rağmen iştahsızlık, ishal, mide bulantısı, kusma ve halsizlik gibi çok sayıda yan etki meydana getirmesi nedeniyle takrin kullanımı sınırlıdır. Ayrıca, takrin kullananların takrinin meydana getirmesi muhtemel olacan karaciğer toksisitesinin değerlendirilmesi için kan izlenimlerinin yapılması gerekir. Takrinin kısa yarı ömrü ve yüksek düzey takrin kullanımının oluşturacağı yan etkiler nedeniyle terapötik aktiviteyi uzun süreli devam ettirmek için çoklu dozaj rejimleri gerekir.
- **Donepezil:** Donepezil yalnızca nörotransmitter düzeyinde değil, aynı zamanda glutamatın neden olduğu eksitotoksitenin çeşitli yönlerinin inhibisyonu, inflamatuvar sitokinlerin erken ekspresyonunun azaltılması, AChE'nin nöroprotektif izoformunun indüksiyonu ve oksidatif stresin neden olduğu etkilerin azaltılması dahil alzheimer patogenezinde yer alan hemen hemen tüm aşamalarda moleküler ve hücresel düzeyde

de etki göstermektedir donepezil kullanımına bağlı kas krampları, uykusuzluk, mide bulantısı, iştahsızlık, ishal, gibi çeşitli yan etkileri meydana gelmektedir. Yüksek doz donepezil ile tedavi edilenlerde hipotansiyon, şiddetli kusma, kas zayıflığı, şiddetli mide bulantısı, solunum problemleri ve bradaikardi görülür.

- **Rivastigmin:** Rivastigmin, 2000 yılında hafif ve orta dereceli Alzeihmer tedavisi için onaylandı. Rivastigmin ayrıca Parkinson hastalığıyla ilişkili demans tedavisinde de kullanıldı. Kilo kaybı, ishal, kusma, bulantı, iştahsızlık ve mide ağrısı rivastigminin sık oluşturduğu yan etkilerdir.
- **Galantamin:** Galantaminin Alzeihmer'in bilişsel semptomlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Düzensiz solunum, mide krampları, mide bulantısı, kas zayıflığı, bilinç bulanıklığı ve gözlerde sulanma galantamin kullanımına bağlı oluşan sık yan etkilerdir (Sharma 219).

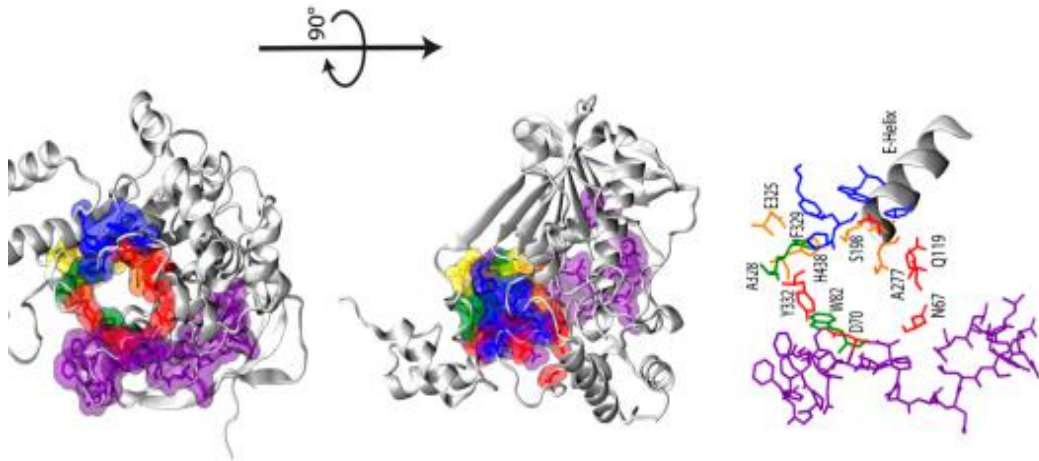
Yeni geliştirilen kolinesteraz inhibitörleri şunlardır.

- **Fenserin:** Fenserin, fizostigminin fenilkarbamat türevidir beta-amiloid öncü proteinini azaltmak ve geri dönüşümlü bir AChE enzim ihibisyonu oluşturmak üzere iki şekilde etki göstermektedir. Fizostigmin ve takrine göre toksisitesi daha az olup hızlı emilir.
- **Tolserin:** Tolserin, fenserinden yalnızca fenilkarbamoil kısmındaki 2'-metil ihtiva etmesi bakımından farklılık göstermektedir. 2000 yılında klinik öncesi çalışmalar başlatıldı ve hAChE'ye karşı BuChE'ye karşı 200 kat daha seçici olduğu gösterildi. AChE enzimini inhibe etmesi bakımından yapısal analogları olan fizostigmin ve fenserine göre AChE enzimini güçlü bir şekilde ingibe ettiği gösterilmiştir. Ancak Tolserinin insanlar üzerinde etkilerine istinaden yayımlanmış çalışma olmadığından klinik öncesi verilere göre insan üzerindeki fayda ve risklerini belirlemek pek zordur.
- **Esolerin:** Takrinden türetilmiştir. insanlarda yayınlanmış bir rapor yoktur. çalışmalar klinik öncesi ve klinik modellerde yapılmıştır.
- **NS2330 (Tesofensine):** Tesofensin üzerinde yapılmış olan in vivo ve in vitro çalışmalar göstermiştir ki tesofensinin serotonin, norepinefrin ve dopamin nörotransmitterlerinin presinaptik alımını inhibe etmektedir. tesofensinin için yapılan Faz IIA denemeleri, hafif Alzheimer hastalarında anlamlı bilişsel iyileşmeyi sağladığını gösterdi. Fakat Faz IIB denemeleri etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermiştir (Mehta *et al.* 2012).

Geleneksel olarak kullanılan ve yeni jenerasyon olan kolinesteraz inhibitörlerinin yanı sıra, sentetik analoglar ve doğal olarak türetilen kolinesteraz inhibitörleri de mevcuttur. Huperzin, flavanoid ve kardanol doğal olarak türetilen Kolinesteraz inhibitörleridir. Sentetik analogar kompetitif kolinesteraz inhibitörleri olarak geliştirilmiştir. N-alkil-7-metoksitakrin hidroklorid, fenil 5,6-dimetoksi-1-okso-2,3-dihidro-1H-2-indenilmetanon ve ladostigil [(N-propargil-(3R) aminoindan-5il)-etil metil karbamat)]ve 2(benzo[d]tiyazol-2-yl)-3-heteroarilakrilonitriles sentetik analoglardır.

1.2.3. Butirilkolinesteraz

İnsan vücudunda BChE, AChE'ye göre on kat daha fazla mevcuttur. İnsan vücudu yaklaşık 680 nanomol butirilkolinesteraz ve 62 nanomol asetilkolinesteraz ihtiva eder. BChE veya ilgili mRNA, plazma,kalp,böbrek,deri,ince bağırsak, kolon,akciğer, dalak, kas ve kan damarlarının iç yüzeyi gibi neredeyse her doku ihtiva olunur. Nörotransmitter ACh, BChE'ni iyi bir substratı olmakla birlikte BChE'nin esas substratı butirilkolindir. BChE, butirilkolini ACh'e göre 2 kat daha yüksek oranda hidrolize uğrattır. (Masson, and Lockridge 2010).



Şekil 1.10. BChE enzimi görseli. Üst panel dikey eksen etrafında 90° döndürülmüş orta paneldeki yapılar ile doğrudan aktif bölge kanyonlarının görüntülerini sunar. Alt paneller, BChE'nin bağlanma bölgelerinin büyütülmüş görünümünü sunar. (De Boer *et al.* 2021).

BChE'nin yapısı AChE ile benzer olmasına rağmen, AChE'deki aktif bölge geçidini kaplayan 14 aromatik amino asitten 6'sı BChE'deki alifatik kalıntılarla ikame edilmiştir. Özellikle, TcAChE'deki Phe288 ve Phe290'ın insan BChE'deki daha küçük Leu286 ve Val288 ile ikamesi, daha derin bir geçitle sonuçlanan konformasyonel değişikliklere yol açar. Bu nedenle BChE AChE'den daha çok çeşitlilikte substrat ve inhibitörlerle etkileşime girmesine ve potansiyel olarak hidrolize olur. Bundan dolayı BChE, daha küçük ve çok daha spesifik AChE'nin karışık veya spesifik olmayan, daha büyük kardeşi olarak kabul edilmiştir (De Boer et al. 2021).

AChE inhibitörleri alzheimer hastalığı tedavisinde sinaptik yarıktaki ACh'nin azalmasını engelleyerek ve muskarinik reseptörler ile nikotinik reseptörlerdeki asetilkolin konsantrasyonunu artırarak bilişsel faaliyetleri iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak alzheimer hastalarındaki nöronlar ciddi şekilde hasar görmüştür ve BChE seviyeleri fizyolojik durumun %120'sine yükselmişken AChE seviyeleri onarılamaz şekilde %90'dan fazla azalmış olduğundan AChE inhibitörlerinin tedavi süresi sınırlıdır. Bu minvalde BChE, devam eden AD'de telafi edici bir enzim olarak çok önemli bir rol oynar. BuChE'nin anormal β -amiloid ($A\beta$) birikimi ile yüksek düzeyde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenlerle Çeşitli çalışmalar BChE enzim inhibisyonunun ilerlemiş alzheimer hastalığı tedavisi için potansiyel bir hedef olduğunu ileri sürmüştür (Zhou and Huang 2022).

Spesifik olarak BChE enzim inhibisyonunun hücre Canlılığını azaltmadan fare beyni ve insan nöroblastoma hücrelerinde β -amiloid peptid düzeylerini azaltmıştır. Ayrıca, selektif olarak inhibisyonu, yaşlı ratlarda labirent performansını artırmış ve rat beyinlerinde uzun süreli güçlenmeyi artırmıştır. Dahası , yüksek düzey BChE'nin nöritik plaklar ve nörofibriler yumaklar gibi alzheimerin nöropatogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (Li et al. 2021). Bu minvalde BChE'nin seçici bir şekilde inhibe edilmesi umut verici bir klinik tedavi stratejisini oluşturmaktadır. Fakat iki izoform AChE ve BChE'nin oldukça homolog proteinler olmaları hasebiyle, AChE'yi ekarte ederek BChE'yi seçici olarak hedef alan inhibitörlerin geliştirilmesi zorlu bir süreçtir. Naftamid bileşikler, izosorbit analogları, fenserin bazlı bileşikler, paltanik asit türevleri ve karbamat bazlı bileşikler gibi çeşitli seletif BChE inhibitörleri raporlanmasına rağmen bu bileşiklerden oldukça sınırlı bileşikler (bisnorsimserin ve

eptastigmin) klinik çalışmalara geçmiştir. Bu nedenle, yeni seçici BChE inhibitörü moleküllerine ihtiyaç duyulmaktadır (Jiang *et al.* 2019)

1.3. Sülfonamidler

Yapısal olarak –SO₂NH– taslak yapısına sahip Sülfonamid ve sülfonilamid türevi moleküller –SO₂NH– iskelet grubundaki farklı fonksiyonel birimlerin değişimiyle kemoterapötik, diüretik, antiepileptik ve antiglokom gibi oldukça çeşitli terapötik etkiler sergileyebilen önemli bir ilaç grubudurlar (Öztürk vd. 2020).

Klinikte sülfonamidlerin farmakolojik olarak kullanıldığı aktiviteleri şunlardır:

- **Antibiyotik Etkinlik:** Sülfonamidlerin mikroorganizmaların üreme ve gelişmesini engelleyerek antibiyotik etki gösterdiği günümüzde aydınlatılmıştır. Çoğu mikroorganizma genetik materyallerin sentezinin gerçekleşebilmesi için folik asit elzemdir. Bakteriler, folik asidin sentezini endojen olarak gerçekleştirirler. Endojen olarak folik asidin sentezinin gerçekleşebilmesi için paraaminobenzoik asite (PABA) gereksinim duyulur. PABA yapısal olarak sülfonamidlere benzerlik gösterdiğinden dolayı ortamda sülfonamidlerin yeter miktar olduğu koşullarda sülfonamid PABA yerine alınır. Böylece folik asit biyosentezi gerçekleşemez. Bu nedenle de bakteri üremesi gerçekleşmez (Yonar ve Sağlam 2013). Sülfonamidler göstermiş oldukları bakterid etkinin yanı sıra bazı mantarlara (*Pneumocystis carinii*) ve protozoalara karşı da inhibitör aktivite gösterir (Ovung and Bahattacharyya, 2021).
- **Karbonik Anhidraz İnhibisyonu:** Sülfonamidler gözün siliyer süreçlerinde (CA II, IV ve XII gibi) bulunan CA izoenzimlerinin inhibisyonu neticesinde antiglokom olarak kullanılırlar. Metazolamid, Asetazolamid, metazolamid, etoksazolamid ve diklorofenamid yaygın olarak kullanılmakta olan antiglokom ilaçlarıdır. Ayrıca bu CA inhibitörleri olan sülfonamidlerden bazıları hem CA IX hem de CA XII'yi inhibisyona uğrattığı öne sürülmüştür. Bu tür bileşiklerin çoğunluğu, tümörle ilişkili bu CA izoformlarını hedeflemek amacıyla geliştirildi. (Carta et al. 2012). Dahası güçlü bir CA inhibitörü olan asetazolamid akut dağ hastalığının en yaygın kullanılan ve çalışılan ilaçtır (Leaf, and Goldfarb 2007).
- **Siklooksijenaz-2 (COX-2) İnhibisyonu:** Yapılan çalışmalarda spesifik olarak COX-2 inhibitörü moleküllerin klasik non-steroidal anti inflamatuvar ilaçlar kadar güçlü bir şekilde analjezik ve antiinflamatuvar etki gösterdiği, ayrıca nispeten daha az sindirim

sitemi üzerinde yan etkilere neden olduğu belirtilmiştir. Bu moleküllerin esas yapılarında, geleneksel non steroidal anti inflamatuvar ilaçlara özgü olan karboksilat grubu bulunmamakta; karboksilat grubunun yerine COX-2'nin aktif bölgesindeki Arg-513 ile etkileşime girebilen sülfon veya sülfonamid yapıları mevcuttur. (Gökşen ve Kelekçi 2010)

- **Reseptör Tirozin Kinaz İnhibisyonu:** Reseptör ve reseptör olmayan protein tirozin kinazlar, hücrenin metabolizması, farklılaşması ve büyümesi ve göçünde reglatif olan hücre sinyalleşme proseslerinde esas enzimlerdir. Son yıllarda kanser tedavisinde bu enzimlerin spesifik inhibisyonu yeni metot olmuştur Günümüzde çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmakta olup pazopanip bu grupta olan bir sülfonamid türevidir (Carta *et al.* 2012).

İKİNCİ BÖLÜM

2. KURAMSAL TEMELLER

CA enziminin ilk olarak karakterizasyonu birbirlerinden haberdar olmayan Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından 1933 yılında sığır eritrositlerinden gerçekleştirilmiştir. (Meldrum and Roughton 1933). 1944 yılında Keilin ve Martin CA enziminin katalitik gücü ile Zn iyonu arasında korelesyon olduğunu belirtmiş ve CA enzimi tanımlanmış olan ilk metalloenzim olmuştur. (Keilin and Martin 1944).

CA enzimi, memeli dokuları, mantar, bitki, böcek, fare ve suda yaşayan canlılar gibi çok sayıda canlıda zamanla keşfedilmiştir (Krungrai *et al.* 2001).

1961 yılında enzimlerin sınıflandırılmasının gelişimi ile birlikte CA enzimi sınıf 4 enzim olarak tasnif edilmiştir. 1976 yılına kadar yalnızca I ve II izoenzimleri bilinirken günümüzde 18 izoenzimin tamamının hangi genetik aileye ait olduğu (alfa beta gama); fonksiyonel farklılıkları ve yapıları aydınlatılmıştır (Supuran and György 2015).

CA enziminin ilk grubu olan α -CA 1930 yılında omurgulılardan keşfedilmiştir. 1990'nın başlarında bitkilerden elde edilen ikinci bir CA türü elde edilmiş; 1994 yılında da üçüncü bir tür CA arkebakterilerde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, *Chlamydomonas reinhardtii* ve karasal bitkilerde hem α hem β CA türüne rastlanması hasebiyle Karbonik anhidrazların tasnifi için daha uygun bir terminolojiye ihtiyaç duyulduğu anlaşılmış olup Tasnif için Yunan harflerinin kullanılarak tasnif edilmesi kabul edilmiştir. Son CA aile η -CAs ve ζ -CA'lar sırasıyla 2015 ve 2016 yıllarında tespit edilmiştir (DiMario, R. J. *et al.* 2018)

CA izoenzimlerinin katalitik süreçlerinin iyi bir şekilde anlaşılmış olması, organizmada sıklıkla bulunmaları ve fizyolojik/patolojik süreçlerde oldukça etkili olmasından dolayı bu enzimler uzun süredir önemli farmakolojik hedef halindedirler (Gelheard 2009).

1940 yılında CA enzimlerinin Sülfonamidlerce inhibe edildiği anlaşılmıştır. Bu inhibisyonda Sülfonamidlerde mevcut olan NH₂ grubu enzimde bulunan metal iyonuna bağlanır. Zamanla sülfonamidlerin Karbonik Anhidrazlarda bulunan metali

bağlayabilmek için iyonize olmaları gerektiği anlaşılmıştır. Bu nedenle sülfonamid grubunun düşük pKa'larında inhibisyon daha iyi bir şekilde gerçekleşir (Jonsson and Lijas 2020). CA enzim inhibisyonu, diüretikler, antineoplastik, antikonvülsan ve antiglokom gibi çok sayıda terapötik amaçla kullanılmaktadır (Carta *et al.* 2019).

Sülfonamid türevi bileşiklerin CA inhibitörleri olarak ilk kullanılan bileşikler olmasının ardından çok sayıda CA inhibitörü oluşturulmasına rağmen sülfonamidin CA enziminin Zn grubunu bağladığı bileşikler halen terapötik olarak kullanılan en güçlü bileşiklerdir. . (Carta *et al.* 2014).

Sülfonamid türevi ilaçlar, oldukça etkili CA inhibitörleri olarak uzun zamandır terapötik amaçlı kullanılsalar da bu ilaçların CA izoenzimlerine selektifliklerinin olmaması bu ilaçların ciddi yan etkiler meydana getirmesine sebebiyet vermektedir. Bu minvalde günümüzde CA izoenzimine özgül sülfonamidlerin geliştirilmesine ilişkin çalışmalar mevcuttur(Winum *et al.* 2009).

CA-IX ve CA-XII izoenzimleri tümör progresyonunda rol oynayan izoenzimler olup bu rollerinden dolayı bu izoenzimleri inhibe eden ajanlar geliştirmek çok sayıda çalışmada hedef olmuştur. Bu hususa ilki spesifik antibadiler, ikincisi de bu izoenzimlerin katalitik bölgesini hedef alan küçük bileşikler geliştirmek olmak üzere 2 temel yaklaşım üzerinde durulmuştur (Monti *et al.* 2013).

ACh'in keşfi ilk olarak Sir Henry Dale ve Arthur Erwins tarafından 1913 yılında gerçekleştirilmiştir. Akabinde 1920 yılında Otto Loewi tarafından nörotransmitter olarak karakterize edilmiştir. Bu doğrultuda 1936'da Henry Dale, Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülünü " sinir uyarılarının kimyasal iletimi ile ilgili keşiflerinden dolayı Otto Loewi ile paylaştı. (Tansey 2006).

1940 yılında Alles ve Hawes, Kolinesteraz İnhibitöre substrat spesifikliklerine, inhibitör duyarlılıklarına ve dokularda dağılım farklılıklarına göre kolinesteraz enzimlerini 2'ye ayırmışlardır (Radic *et al.* 1993).

BChE çeşitli nöroaktif peptidlere ACh'e göre daha özgül davranırken AChE, ACh'e yüksek derecede selektiftir. AChE temel olarak nöronlarda ihtiva edilirken BChE glial hücrelerle bağlantılıdır. Sağlıklı bir beyinde Kolinesteraz katalitik işlevinin 80'ini AChE, %20'sini BChE enzimi gerçekleştirir. Kolinerjik nörotransmisyonda

AChE'nin işlevi iyi bir şekilde bilinmesine rağmen BChE'nin fonksiyonu yeterince anlaşılamamıştır (Greig *et al.* 2001).

Terapötik olarak Kolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu sinaptik aralıkta düşmüş ACh düzeylerini arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Soylu ve Karalı, 2017).

AChE inhibitörleri terapötik amaçla myastenia gravis alzheimer, glokom, ameliyat sonrası ileus, mesane distansiyonu, gibi hastalıkların tedavisinde ve antikolinergik doz aşımına karşı antidot olarak kullanılmaktadır (Colović *et al.* 2013). BChE enzim inhibitörleri ise AChE gibi alzheimer tedavisinde önem taşımaktadır (Taylor *et al.* 2012).

Fizostigmin, Alzeihmer Hastalığının tedavisi için ilk üzerinde çalışılmış olan Kolinesteraz inhibitörü idi. Fizostigminin Kan-beyin bariyerini (BBB) geçmesine rağmen, terapötik indeksinin dar olması, yarılanma ömrünün kısa olması ve baş ağrısı, baş dönmesi, bulantı, kusma, baş ağrısı, ishal gibi çok sayıda yan etki oluşturmaları nedeniyle ilaç onay almamış olup enzimatik incelemelerde fizostigmin bir referans bileşik olarak kullanılmıştır. Bu doğrultuda rivastigmin fizostigminin karbamat türevi olup Alzeihmer tedavisinde kullanılmaktadır (Işık vd. 2012).

1993 yılında Takrin, AH'nın tedavisinde FDA tarafından kullanım onayı almıştır. (Chiu and Wei 2017). Bu minvalde Donepezil, 1996 yılında AHtedavisi için FDA tarafından onaylanmış ikinci ilaç olmuştur (Soylu ve Karalı, 2017).

Takrin, rivastigmin, galantamin, hurperzin A ve donepezil gibi anti kolinesteraz ilaçların Alzeihmer hastalığında hastalık progresyonunu yavaşlatmakta faydalı olduğu günümüze kadar gösterilmiştir (Chiu and Wei 2017). Fakat bu ilaçlar yüksek düzey kullanımlarda çeşitli yan etkiler göstermekte olup bu ilaçların terapötik etkinlikleri sınırlıdır (Sharma 2019). Bu doğrultuda Fenserin, Tolserin, Esolerin ve Tesofensin gibi kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmiştir Fakat bu ilaçlar klinik öncesi çalışmalar sürecindedir. (Mehta *et al.* 2012).

Alzeihmer hastalarındaki nöronların ciddi şekilde hasar görmüş olması, BChE seviyeleri fizyolojik durumun %120'sine yükselmesi AChE seviyeleri onarılamaz şekilde %90'dan fazla azalmış olması nedenleriyle Alzeihmer tedavisinde AChE inhibitörlerinin tedavi süresi sınırlıdır. Bu doğrultuda BChE, devam eden AD'de telafi edici bir enzim olarak çok önemli bir rol oynar. BChE'nin anormal β -amiloid (A β)

birikimi ile yüksek düzeyde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenlerle Çeşitli çalışmalar BuChE enzim inhibisyonunun ilerlemiş alzheimer hastalığı tedavisi için potansiyel bir hedef olduğunu ileri sürmüştür (Zhou and Huang 2022).

2009 yılında Girisha vd. tarafından piperidin sülfonamid türevlerini sentezlenerek bu türevlerin AChE üzerinde inhibisyon etkilerini etkileri 3 farklı meteryalde (Fare, İnsan serumu ve Electric eel) incelenmiştir. İncelemeler neticesinde bulunan IC50 değerleri Neostigmine standartı ile karşılaştırılmıştır. İnceleme sonucunda sentezlenen 9 türevden 3'ü standarda yakın değerler göstermiştir (Girisha *et al.* 2009).

2015 yılında Bag vd. AChE ve BChE enzimlerine karşı etkilerini belirleyebilmek için yeni 28 adet sülfonamid türevi bileşik sentezlemiş olup bu sülfonamid türevlerinden 14,19 ve 26 kodlu bileşikler standart bileşiğinin IC50 değerleri ile karşılaştırıldığında bileşiklerin inhibitör işlevi görmede umut vadettiği görülmüştür (Bag vd 2015).

2015 yılında Riaz vd. tarafından yeni piridin sülfonamid türevi bileşikler sentezlenmiş olup, bu sülfonamid türevi bileşiklerin a-glukosidaz, AChE ve BChE enzimlerine karşı etkilerini belirleyebilmek için *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Sentezlenmiş olan bu türevlerden 4a bileşiğinin bu 3 enzim ile kayda değer bir şekilde etkileşime girdiği anlaşılmıştır (Riaz *et al.* 2015).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Sentez ve biyokimya çalışmalarında kullanılan analitik saflıktaki kimyasallar, Sigma-Aldrich ve Merck gibi firmalardan satıcı firmalar aracılığıyla tedarik edilmiştir.

3.1.1. Kimyasal çalışmalarda kullanılan cihazlar ve yapılan analizler

- **Evaporatör:** IKA marka evaporatör çözücülerin uygun koşullar altında ortamdaki uzaklaştırılmasında kullanıldı.
- **Isıtıcı:** Velp marka magnetik ısıtıcılı karıştırıcılar, reaksiyon ortamının ısıtılması ve/veya karıştırılmasında kullanıldı.
- **Erime Noktası:** Barnstead IA9100 Electrothermal Digital Melting Points marka cihaz ile katı bileşiklerin erime aralıkları tayin edildi.
- **Elemental Analiz Tayini ve Cihazı:** Thermo Scientific Flash 2000 model elemental analiz cihazı ile (C, H, N, S) tespit edildi. Bu analizler, Batman Üniversitesi, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü laboratuvarında yapıldı.
- **FT-IR Spektroskopisi ve Analizi:** Agilent Cary 630 FTIR (ATR) Spektrometresi ile $400-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında spektrumlar alınarak grup tayinleri yapıldı. Bu analizler, Dicle Üniversitesi, Eczacılık Bölümü, Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.
- **NMR Spektroskopisi ve Analizi:**
 - Sentez sonucu elde edilen bileşiklerin ^1H NMR spektruları, Giresun Üniversitesi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (GRÜMLAB) Bruker AVANCE III marka 400 MHz spektroskopi ile yaklaşık 10 mg maddenin $\text{DMSO-}d_6$ içindeki çözeltisinden alındı.
 - Sentez sonucu elde edilen bileşiklerin ^{13}C NMR Spektrumları, Giresun Üniversitesi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (GRÜMLAB) Bruker AVANCE III marka 100 MHz spektroskopi ile yaklaşık 20 mg maddenin $\text{DMSO-}d_6$ içindeki çözeltisinde alındı.

- **Mikro plaka okuyucu:** Thermo Scientific Multiskan GO (İnhibisyon çalışmalarının yapılması ve aktivite değerlerinin belirlenmesi için kullanıldı).
- **pH metre:** Isolab masa üstü pH ölçüm cihazı (Tampon çözeltilerin hazırlanması için kullanıldı).
- **Hassas terazi:** Ohaus (Kullanılan maddelerin hassas tartımı için kullanıldı).
- **Otomatik pipet seti:** Eppendorf ve Isolab pipet setleri (Deneyler esnasında kullanılan çözeltilerin farklı ortamlara aktarılması için kullanıldı).
- **Magnetik karıştırıcı:** IKA ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Deneyler esnasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması için kullanıldı).
- **Saf su cihazı:** Millipore ultra safsu cihazı kullanıldı (Deneyler esnasında kullanılan çözeltilerin hazırlanması, kapların ve aletlerin temizlenmesi için kullanıldı).
- **Buzdolapları:** Beko (Deneyler esnasında kullanılan çözeltilerin ve enzimlerin muhafaza edilmesi için kullanıldı).

3.1.2. Tez çözeltilerinin elde edilmesi

Tez çalışmasında çözeltiler ve malzemelerin temizliği için su saf kullanıldı. Hazırlanan sülfonamid karışımlarının seyreltilmesi için ultra saf su kullanıldı.

1. pH değeri 8,0 ve konsantrasyonu 100 mM olan TRIS-HCl çözeltisinin hazırlanması: 1,211 g TRIS 90 mL saf su içerisinde çözüldü, konsantrasyonu 0,1 N olan hidroklorik asit çözeltisi kullanılarak pH değeri 8,0'a ayarlandı ardından hacmi toplamda 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı (AChE enziminin aktivitesini belirlemek için kullanılan tampon çözelti).

2. pH değeri 7,8 ve konsantrasyonu 100 mM olan fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması: 1,36 g KH_2PO_4 150 mL saf içerisinde çözüldü, konsantrasyonu 0,1 N olan hidroklorik asit çözeltisi ile pH değeri 7,8'e ayarlandı ardından toplam hacmi 200 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı (BChE enziminin aktivitesini belirlemek için kullanılan tampon çözelti).

3. 2 mM AChtI substrat çözeltisinin hazırlanışı: 2,98 mg AChtI tartılarak 5 mL ultra saf su içerisinde dikkatlice çözülerek hazırlandı.

4. 2 mM BChtI substrat çözeltisinin hazırlanması: 3,17 mg BChtI tartılarak 5 mL ultra saf su içerisinde dikkatlice çözülerek hazırlandı.

5. 2 mM DTNB çözeltisinin hazırlanması: 3,86 mg DTNB tartılarak 5 mL 100 mM'lık KH_2PO_4 (pH=7,8) tampon çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanır.

6. 3 mM p-nitrofenil asetat (PNFA) substrat çözeltisinin hazırlanması: 14 mg PNFA 1 mL asetonda çözülür daha sonra içerisine 24 mL ultra saf su konulmuş ve manyetik bar bırakılan 50 mL bir behere aseton içerisinde çözülen PNFA azar azar ve yavaşça ilave edilir.

3.2. Metod

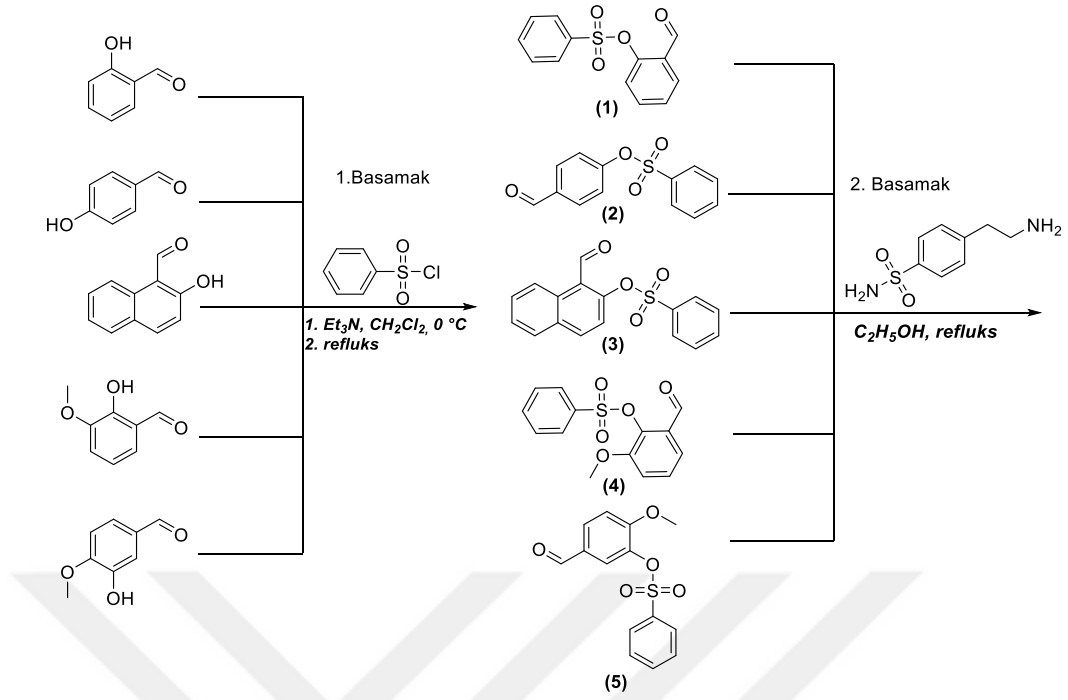
3.2.1. Sentez Çalışmaları

Benzensülfonat Esterlerinin Genel Sentez Yöntemi (1-5)

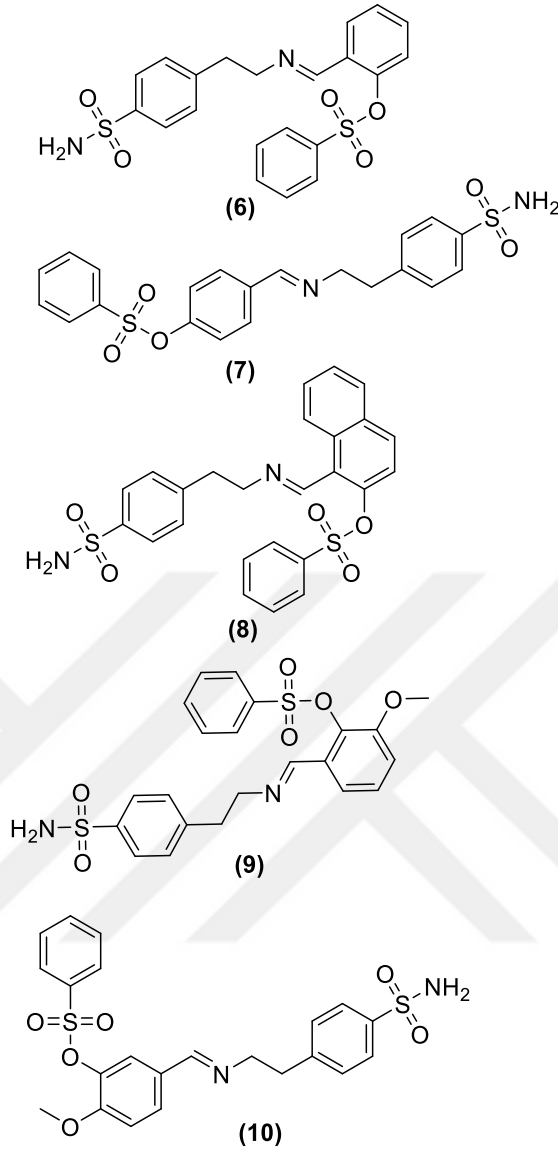
Uygun fenolik aldehitler (2,3 mmol) ve trietilamin (Et_3N) (4,6 mmol, 625 μL), 10 mL CH_2Cl_2 çözücüsü içinde hazırlanan çözeltisi 1 saat boyunca oda sıcaklığında kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. 10 mL CH_2Cl_2 içinde çözünmüş benzensülfonil klorür (2,3 mmol) ilave edildi. İnce tabaka kromatografisi (TLC) ile reaksiyon izlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına soğutuldu ve ardından 2 M HCl ve etilasetat ile iki kez ekstrakte edildi. Organik fazlar susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu, süzüldü ve ardından çözücü evaporatörde buharlaştırıldı. Son olarak, ham ürün etanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı (Başaran 2023).

Schiff Bazlarının Genel Sentez Yöntemi (6-10)

Uygun aril sülfonatlar (1 mmol) ve 4-(2-aminoetil)benzenesülfonamid (1 mmol) ile 10 mL etanol içerisinde hazırlanan çözeltisi 5 saat boyunca geri çeviren soğutucu altında karıştırıldı. Reaksiyonun tamamlanması TLC ile izlendi. Bundan sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Elde edilen ham ürün filtrasyonla uzaklaştırıldı, petrol eteri ile iyice yıkandı ve etanol kristalizasyonu ile saflaştırıldı (Başaran 2023).



Şekil 3.1. Sentezlenen moleküllerin çıkış moleküllerinin sentez şeması.



Şekil 3.2. Sentezlenen sülfonamid türevleri (6-10)

3.2.2.Sülfonamid bileşikleri için AChE / BChE inhibitör etkilerinin ölçülmesi

Elde edilen sülfonamid türevleri için AChE ve BChE enzim inhibisyonlarının tespiti için Ellman yöntemi kullanıldı (Ellman et al. 1961). Ellman yöntemine göre enzim aktiviteleri multiplaka okuyucu kullanılarak spektrofotometrik olarak yapıldı. Bu yöntemle göre DTNB (5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) ve asetiltiyokolin iyodat/S-butiriltiyokolin iyodat substrat olarak kullanılarak enzim reaksiyonları ölçüldü. Reaksiyon sonrasında sarı renkli kompleksin şiddeti 412 nm de ölçülerek aktiviteler belirlendi.

AChe / BChE enzimlerinin enzim ünitesi değeri hesaplanırken kullanılan formül;

$$EU / ml = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_T}{V_E} \times \frac{1}{13,6}$$

Enzim ünitesi hesaplama formülündeki simgeler aşağıdaki gibidir;

EU / ml	: 1 ml çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri
ΔOD	: Zamana göre absorbans farkı değişimi
T	: Zaman (Dk)
13,6	: DTNB için ekstinksiyon katsayısı
V_T	: Toplam hacim (ml)
V_E	: Küvete katılan enzim miktarı (ml)

3.2.3. Sülfonamid bileşikleri için CA I / II inhibitör etkilerinin ölçülmesi

CA enzimi substrat olarak kullanılan PNFA 348 nm’de absorpsiyon veren p-nitrofenol veya p-nitrofenolata hidroliz edilir. Bu dalga boyunda absorbans artışı ölçülerek aktivite belirlenir (Verpoorte and Mehta 1967).

3.2.4. Sülfonamidler için IC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi

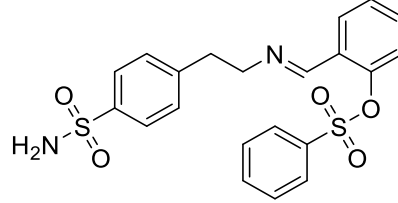
Sentezlenen sülfonamidler (6-10) için yedi farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite değerleri ölçüldü. Elde edilen değerler kontrol değeri ile kıyaslanarak % aktiviteye çevrildi. Sonrasında inhibitörlerin kullanılan miktarları nM olarak belirlendi ve kuvvet konsantrasyonları [I] belirlendi. Excel programı yardımı ile Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Elde edilen grafik eğrisinin denklemi kullanılarak IC₅₀ değerleri belirlendi (Lineweaver and Burk 1934).

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4.1. ARAŞTIRMA BULGULARI

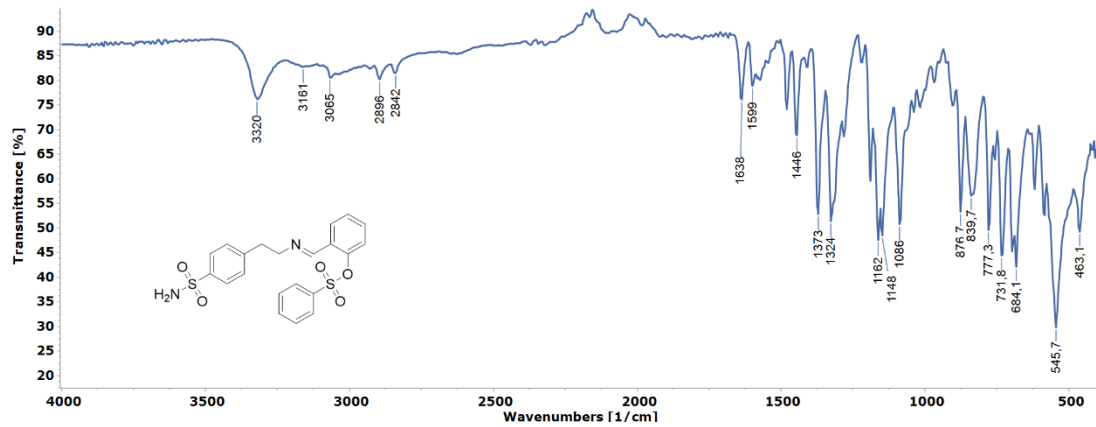
Sentezlenen sülfonamidler için elde edilen sentez verileri aşağıdaki gibidir.

2-(((4-Sülfamoilfenetil)imino)metil)fenil benzensülfonat Bileşiği (6)

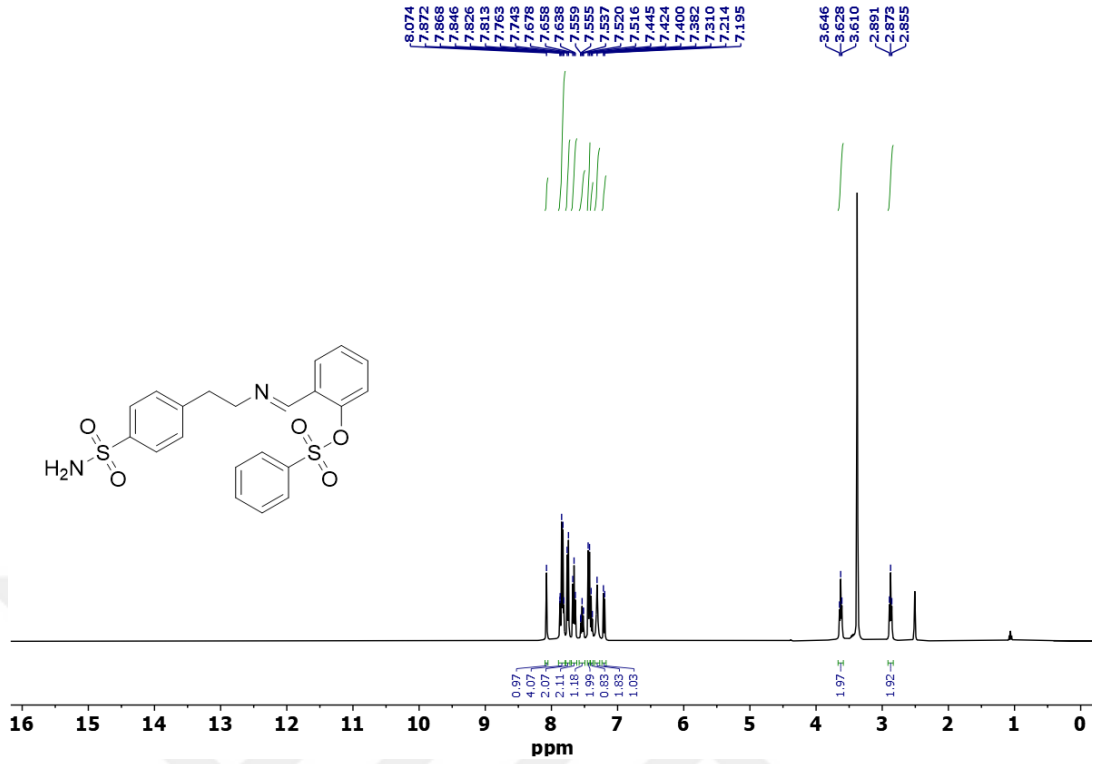


Şekil 4.1. Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı

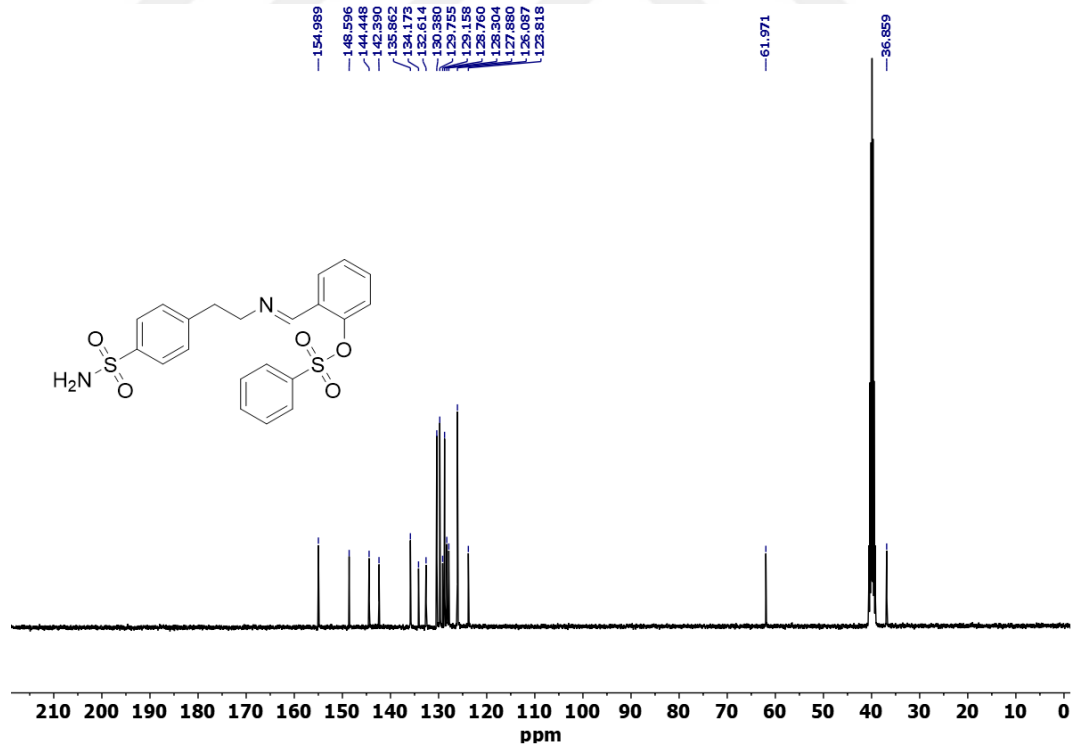
Bileşik **6** verilen yöntemle, açık sarı katı halde, %78 verim ile elde edildi. **Erim noktası:** 143-145 °C. **FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$):** 3320 (N-H), 3161, 3065 (C-H), 1638 (C=N), 1373 ve 1148 (SO₂). **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, ppm):** δ 8.07 (s, 1H, -CH=N), 7.89 – 7.79 (m, 4H, ArH), 7.75 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.66 (t, J = 7.9 Hz, 2H, ArH), 7.58 – 7.49 (m, 1H, ArH), 7.43 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.39 (d, J = 7.5 Hz, 1H, ArH), 7.31 (s, 2H, -NH₂), 7.20 (d, J = 7.7 Hz, 1H, ArH), 3.63 (t, J = 7.1 Hz, 2H, -CH₂-), 2.87 (t, J = 7.2 Hz, 2H, -CH₂-). **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, ppm):** δ 154.99 (C=N), 148.60, 144.45, 142.39, 135.86, 134.17, 132.61, 130.38, 129.76, 129.16, 128.76, 128.30, 127.88, 126.09, 123.82 (ArC), 61.97 (CH₂), 36.86 (CH₂). **Elemental Analiz (C₂₁H₂₀N₂O₅S₂), Hesaplanan:** C, 56.74; H, 4.54; N, 6.30; S, 14.42%. **Tespit edilen:** C, 56.61; H, 4.57; N, 6.48; S, 14.35%.



Şekil 4.2. Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu

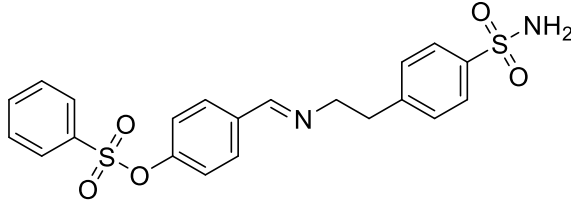


Şekil 4.3.Ç Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin ¹H NMR spektrumu



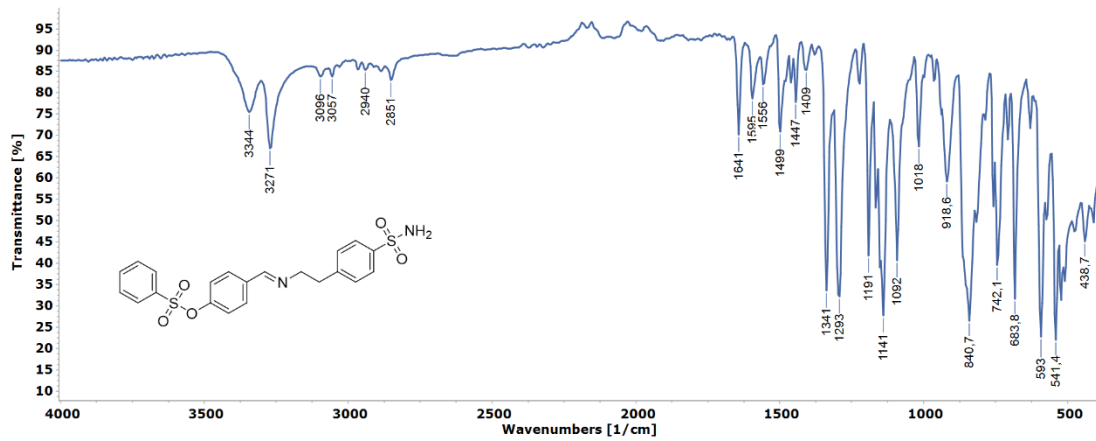
Şekil 4.4. Sentezlenmiş olan 6 numaralı sülfonamid türevinin ¹³C NMR spektrumu

4-(((4-Sülfamoilfenetil)imino)metil)fenil benzensülfonat Bileşiğı (7)

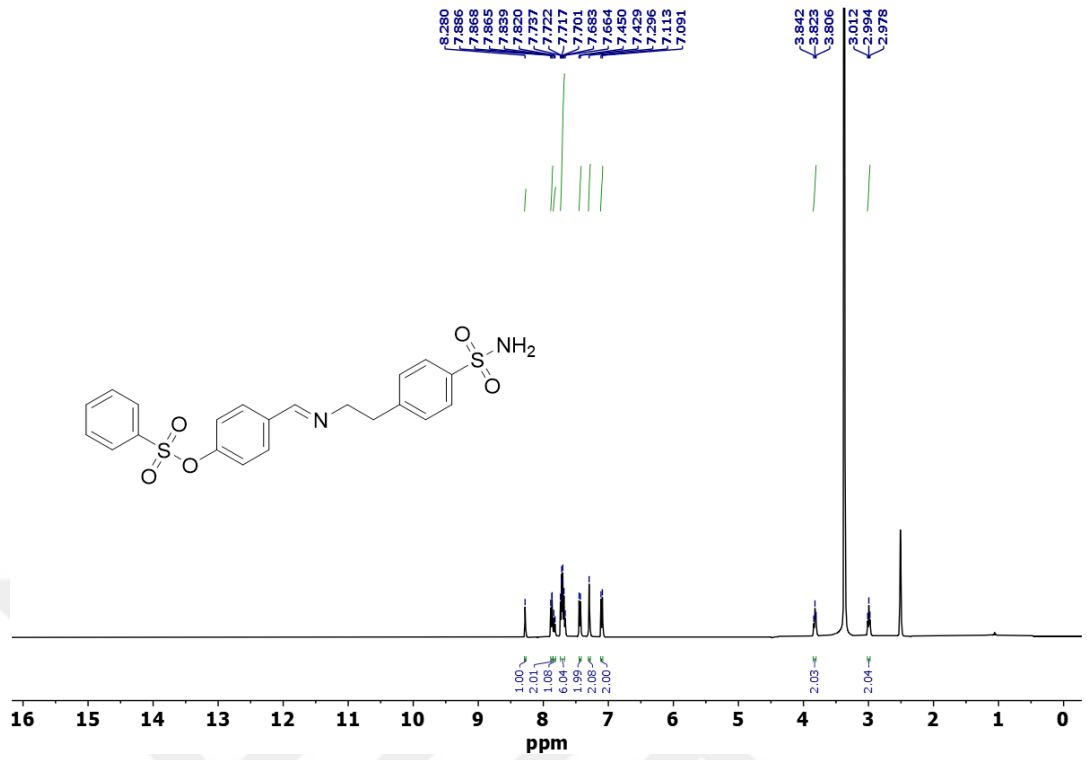


Şekil 4.5. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı

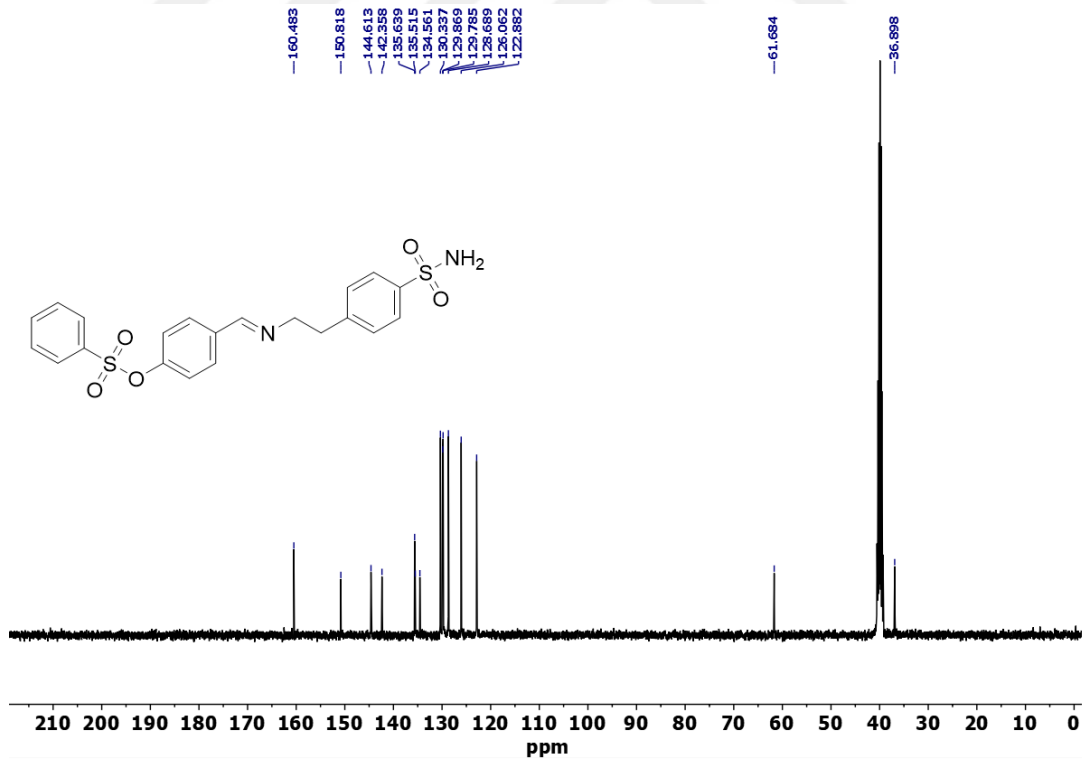
Bileşik 7 verilen yöntemle göre, beyaz katı halde, %75 verim ile elde edildi. **Erimme noktası:** 150-152 °C. **FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$):** 3334 (N-H), 3096, 3057 (C-H), 1641 (C=N), 1341 ve 1141 (SO₂). **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, ppm):** δ 8.28 (s, 1H, -CH=N), 7.89 – 7.85 (m, 2H, ArH), 7.83 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.74 – 7.66 (m, 6H, ArH), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.30 (s, 2H, -NH₂), 7.10 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ArH), 3.82 (t, J = 7.2 Hz, 2H, -CH₂-), 2.99 (t, J = 7.0 Hz, 2H, -CH₂-). **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, ppm):** δ 160.48 (C=N), 150.82, 144.61, 142.36, 135.64, 135.52, 134.56, 130.34, 129.87, 129.78, 128.69, 126.06, 122.88 (ArC), 61.68 (CH₂), 36.90 (CH₂). **Elemental Analiz (C₂₁H₂₀N₂O₅S₂), Hesaplanan:** C, 56.74; H, 4.54; N, 6.30; S, 14.42%. **Tespit edilen:** C, 56.78; H, 4.52; N, 6.23; S, 14.49%.



Şekil 4.6. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu

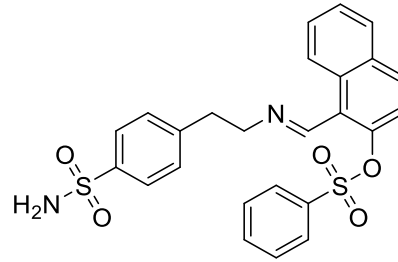


Şekil 4.7. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin ¹H NMR spektrumu



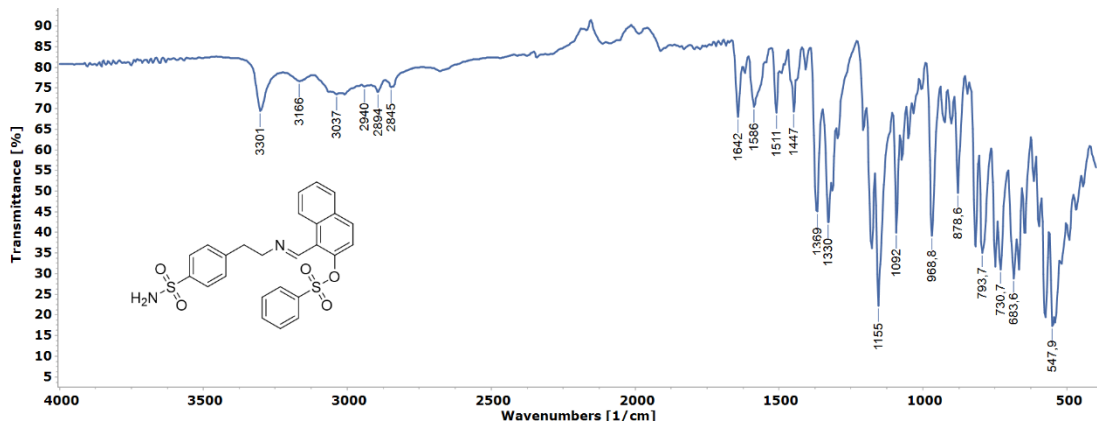
Şekil 4.8. Sentezlenmiş olan 7 numaralı sülfonamid türevinin ¹³C NMR spektrumu

1-(((4-Sülfamoilfenetil)imino)metil)naftalen-2-il benzensülfonat Bileşiğı (8)

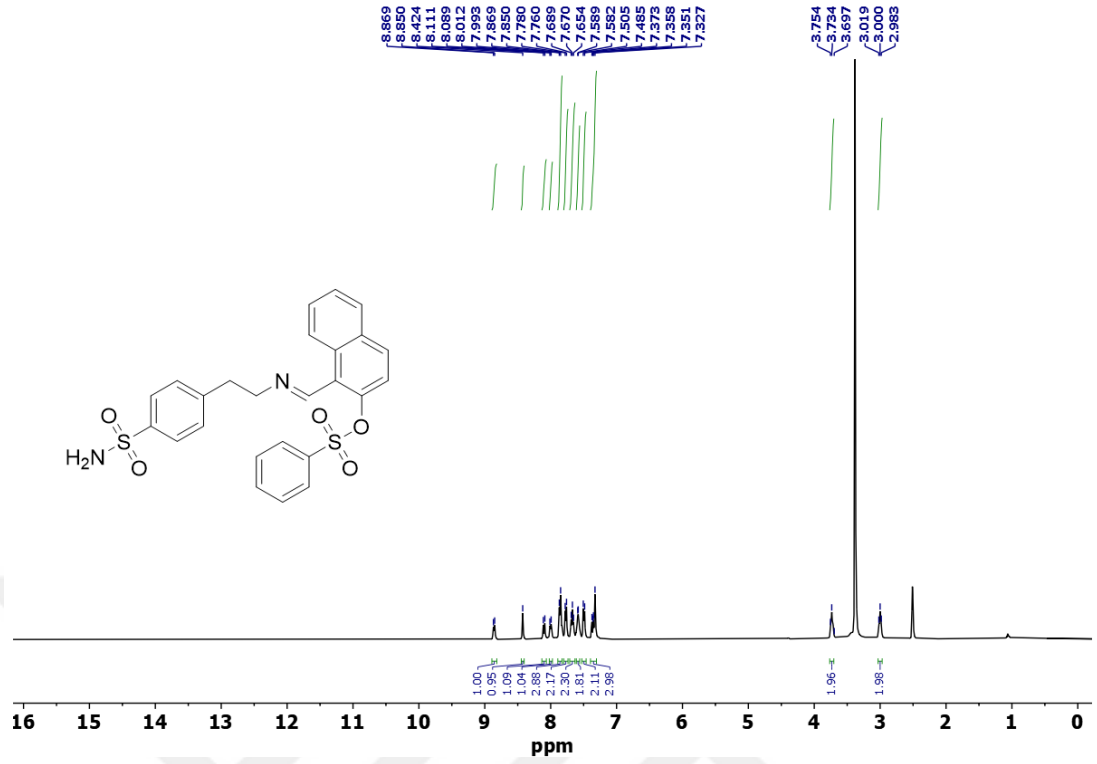


Şekil 4. 9. Bileşik 8'in kimyasal yapısı

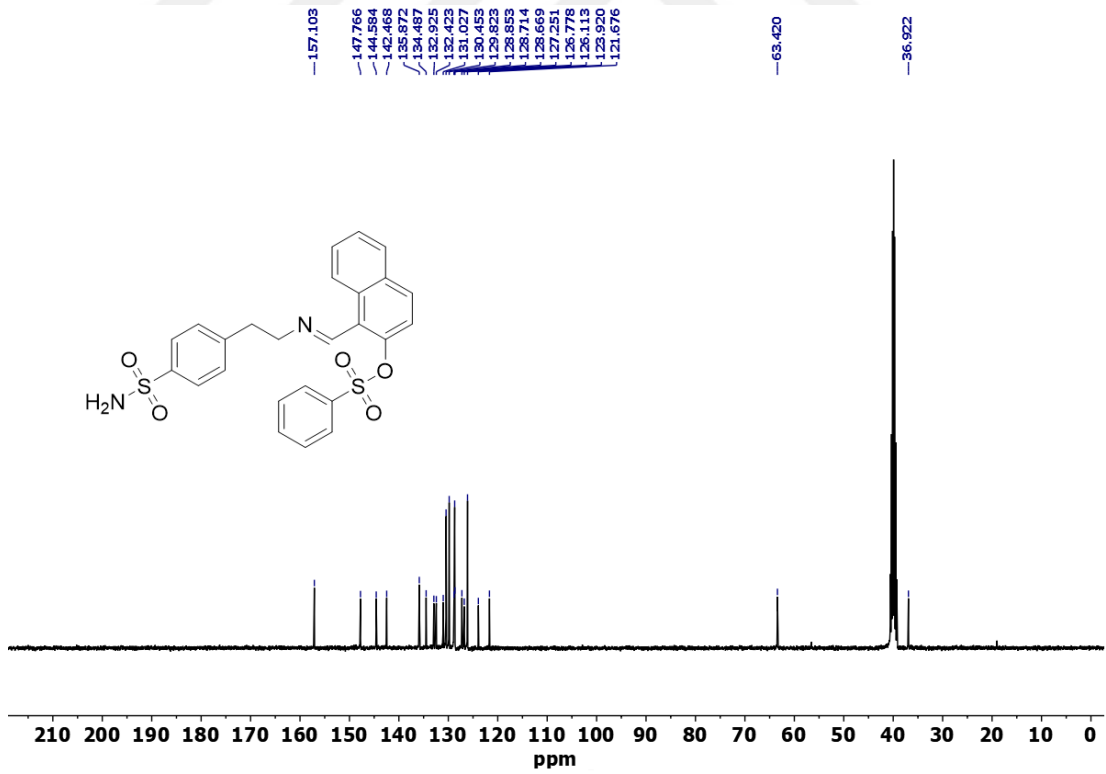
Bileşik 8 verilen yöntemle göre, sarı katı halde, %77 verim ile elde edildi. **Erime noktası:** 132-134 °C. **FT-IR (cm⁻¹, ν_{max}):** 3301 (N-H), 3166, 3037 (C-H), 1642 (C=N), 1369 ve 1155 (SO₂). **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm):** δ 8.86 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 8.42 (s, 1H, -CH=N), 8.10 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH), 8.00 (d, J = 7.4 Hz, 1H, ArH), 7.86 (d, J = 7.7 Hz, 3H, ArH), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ArH), 7.67 (t, J = 7.0 Hz, 2H, ArH), 7.59 (d, J = 2.7 Hz, 2H, ArH), 7.49 (d, J = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.40 – 7.30 (m, 3H, ArH ve -NH₂), 3.74 (t, J = 7.9 Hz, 2H, -CH₂-), 3.00 (t, J = 7.9 Hz, 2H, -CH₂-). **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm):** δ 157.10 (C=N), 147.77, 144.58, 142.47, 135.87, 134.49, 132.92, 132.42, 131.03, 130.45, 129.82, 128.85, 128.71, 128.67, 127.25, 126.78, 126.11, 123.92, 121.68 (ArC), 63.42 (CH₂), 36.92 (CH₂). **Elemental Analiz (C₂₅H₂₂N₂O₅S₂), Hesaplanan:** C, 60.71; H, 4.48; N, 5.66; S, 12.96%. **Tespit edilen:** C, 60.74; H, 4.39; N, 5.74; S, 13.03%.



Şekil 4.10. Sentezlenmiş olan 8 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu

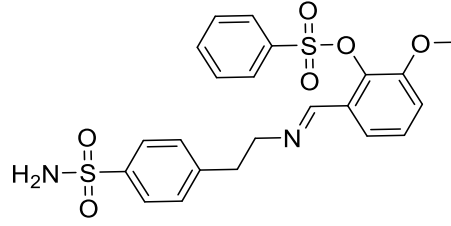


Şekil 4.11. Sentezlenmiş olan 8 numaralı sülfonamid türevinin ¹H NMR spektrumu



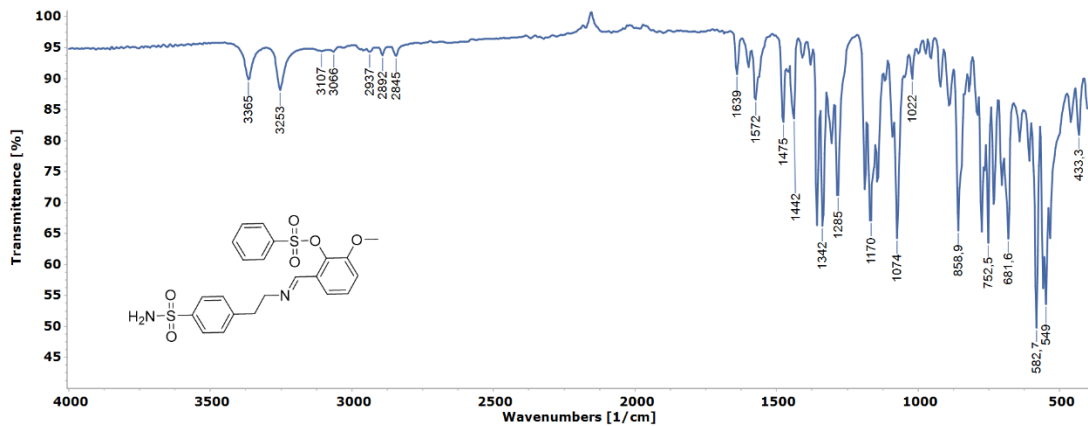
Şekil 4.12. Sentezlenmiş olan 8 numaralı sülfonamid türevinin ¹³C NMR spektrumu

2-Methoksi-6-(((4-sülfamoilfenetil)imino)metil)fenil benzensülfonat Bileşiği (9)

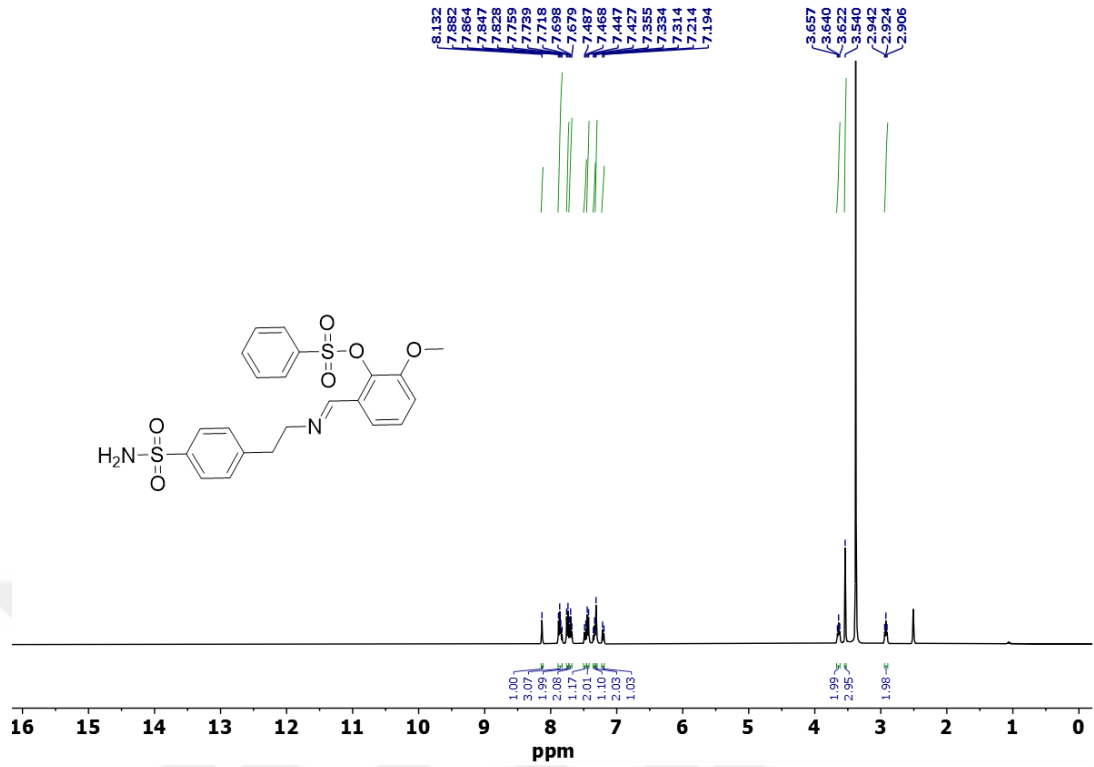


Şekil 4.13. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı

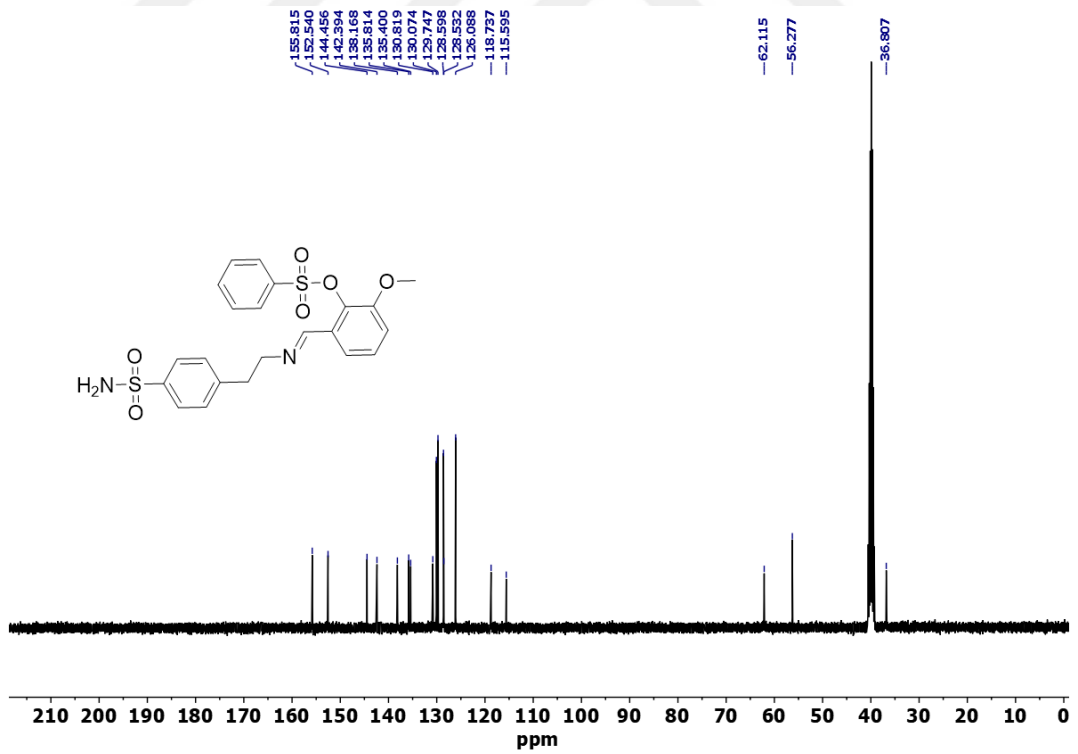
Bileşik **9** verilen yöntemle göre, kirli beyaz katı halde, %73 verim ile elde edildi. **Erimme noktası:** 152-154 °C. **FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$):** 3365 (N-H), 3107, 3066 (C-H), 1639 (C=N), 1342 ve 1170 (SO₂). **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm):** δ 8.13 (s, 1H, -CH=N), 7.89 – 7.83 (m, 3H, ArH), 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.70 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, ArH), 7.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, ArH), 7.44 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, ArH), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ArH), 7.31 (s, 2H, -NH₂), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, ArH), 3.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, -CH₂-), 3.54 (s, 3H, -OCH₃), 2.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, -CH₂-). **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm):** δ 152.54 (C=N), 155.82, 144.46, 142.39, 138.17, 135.81, 135.40, 130.82, 130.07, 129.75, 128.60, 128.53, 126.09, 118.74, 115.60 (ArC), 62.11 (CH₂), 56.28 (OCH₃), 36.81 (CH₂). **Elemental Analiz (C₂₂H₂₂N₂O₅S₂), Hesaplanan:** C, 55.68; H, 4.67; N, 5.90; S, 13.51%. **Tespit edilen:** C, 55.72; H, 4.71; N, 5.83; S, 13.59%.



Şekil 4.14. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu

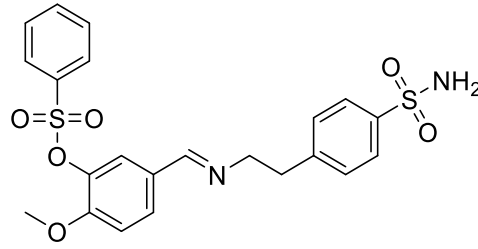


Şekil 4.15. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin ¹H NMR spektrumu



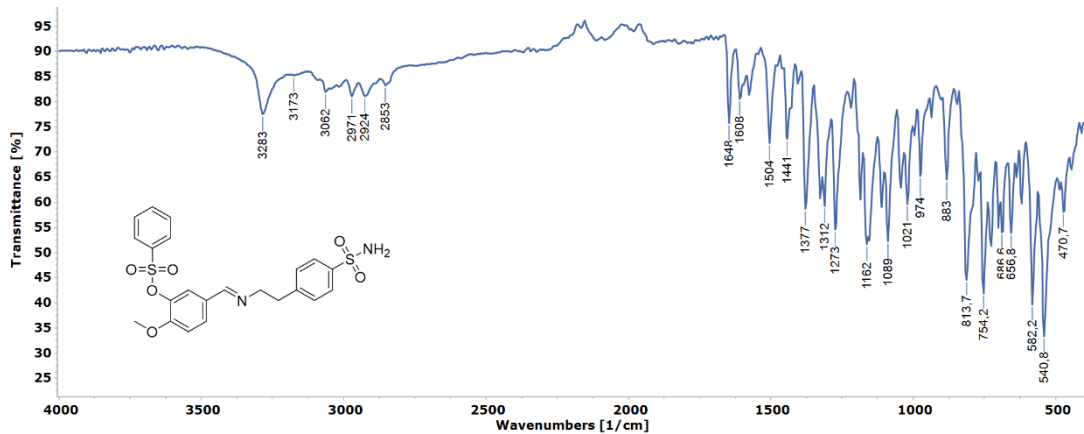
Şekil 4.16. Sentezlenmiş olan 9 numaralı sülfonamid türevinin ¹³C NMR spektrumu

2-Methoksi-5-(((4-sülfamoilfenetil)imino)metil)fenil benzensülfonat Bileşiğı (10)

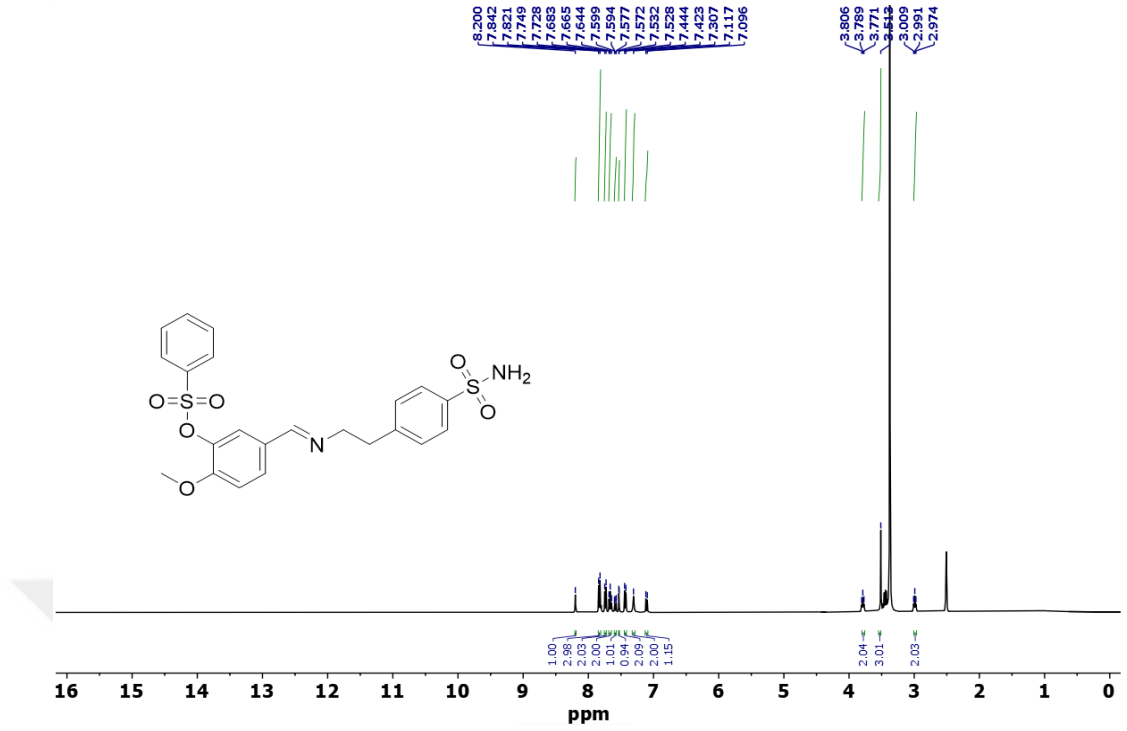


Şekil 4.17. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin kimyasal yapısı

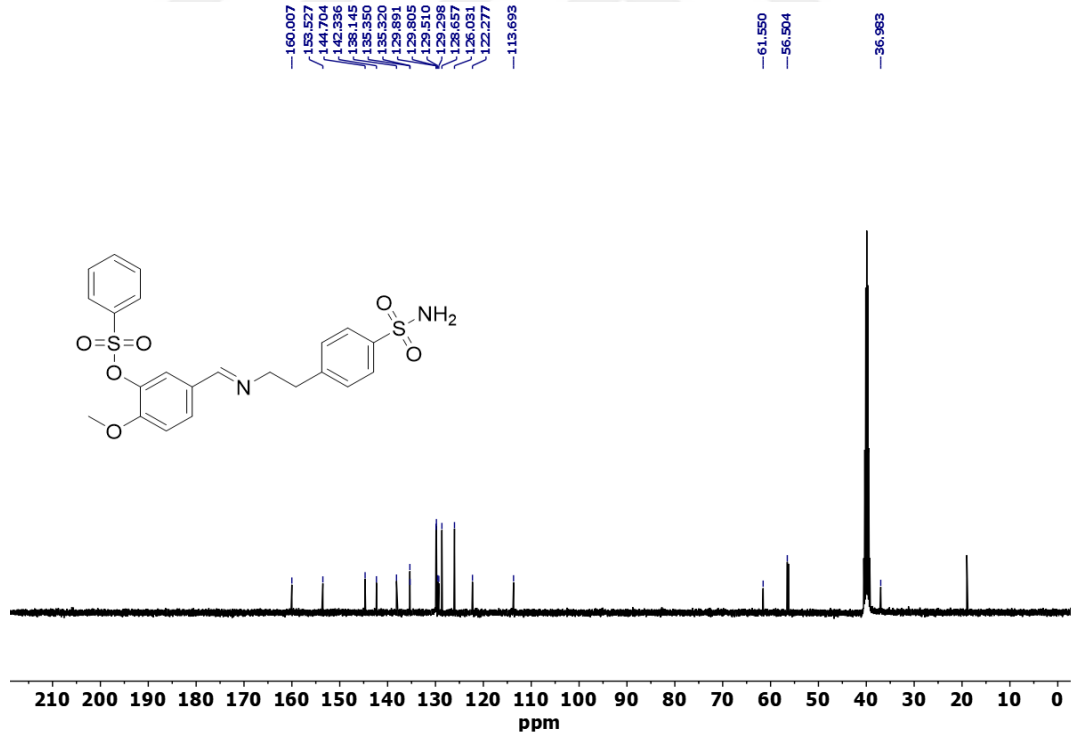
Bileşik **10** verilen yönteme göre, kirli beyaz katı halde, %76 verim ile elde edildi. **Erime noktası:** 147-148 °C. **FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$):** 3283 (N-H), 3173, 3062 (C-H), 1648 (C=N), 1377 ve 1162 (SO₂). **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, ppm):** δ 8.20 (s, 1H, -CH=N), 7.83 (d, J = 8.5 Hz, 3H, ArH), 7.74 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.67 (d, J = 7.4 Hz, 2H, ArH), 7.59 (dd, J = 8.6, 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.53 (d, J = 1.9 Hz, 1H, ArH), 7.43 (d, J = 8.3 Hz, 2H, ArH), 7.31 (s, 2H, -NH₂), 7.11 (d, J = 8.6 Hz, 1H, ArH), 3.78 (t, J = 7.0 Hz, 2H, -CH₂-), 3.51 (s, 3H, -OCH₃), 2.98 (t, J = 6.9 Hz, 2H, -CH₂-). **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, ppm):** δ 153.53 (C=N), 160.01, 144.70, 142.34, 138.14, 135.35, 135.32, 129.89, 129.80, 129.51, 129.30, 128.66, 126.03, 122.28, 113.69 (ArC), 61.55 (CH₂), 56.50 (OCH₃), 36.98 (CH₂). **Elemental Analiz (C₂₂H₂₂N₂O₅S₂), Hesaplanan:** C, 55.68; H, 4.67; N, 5.90; S, 13.51%. **Tespit edilen:** C, 55.69; H, 4.63; N, 5.98; S, 13.42%.



Şekil 4.18. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin FT-IR spektrumu

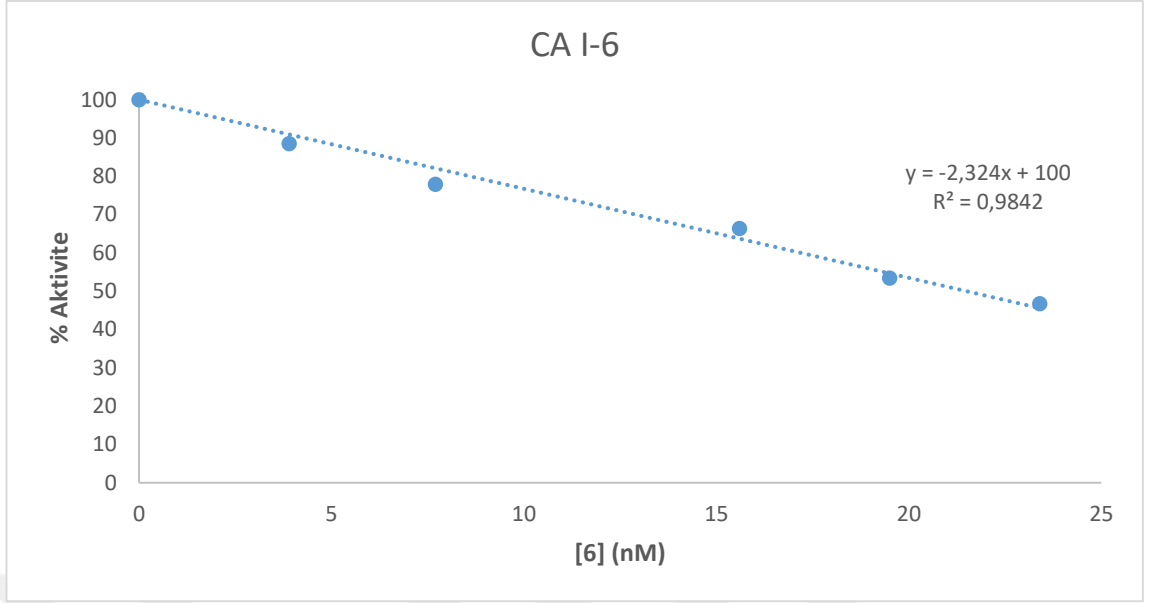


Şekil 4.19. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin ¹H NMR spektrumu

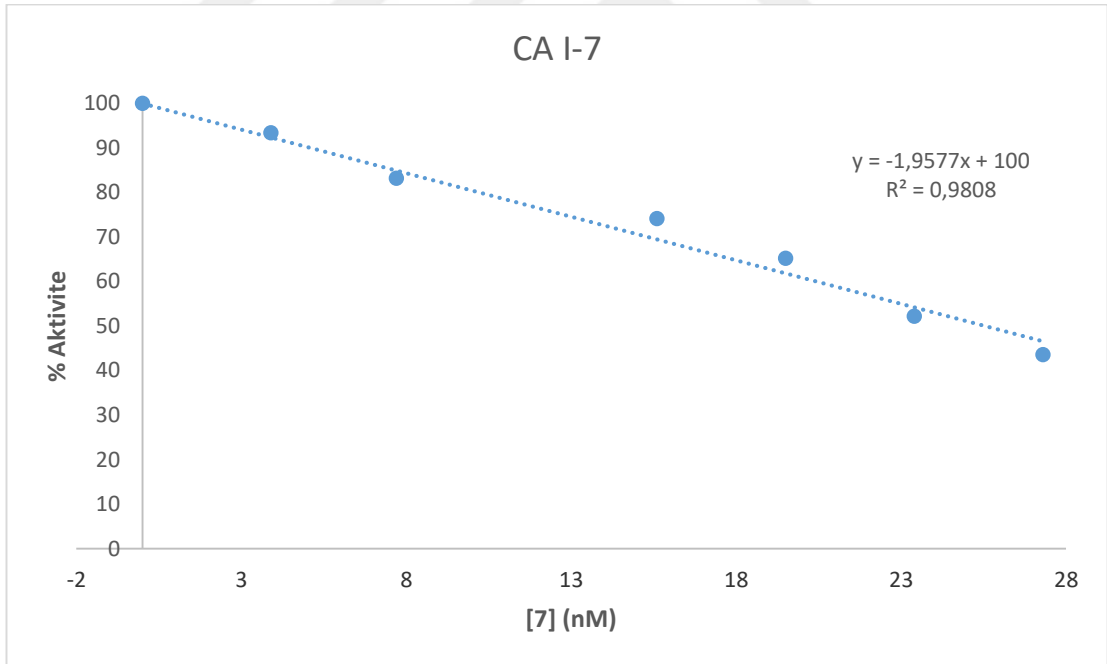


Şekil 4.20. Sentezlenmiş olan 10 numaralı sülfonamid türevinin ¹³C NMR spektrumu

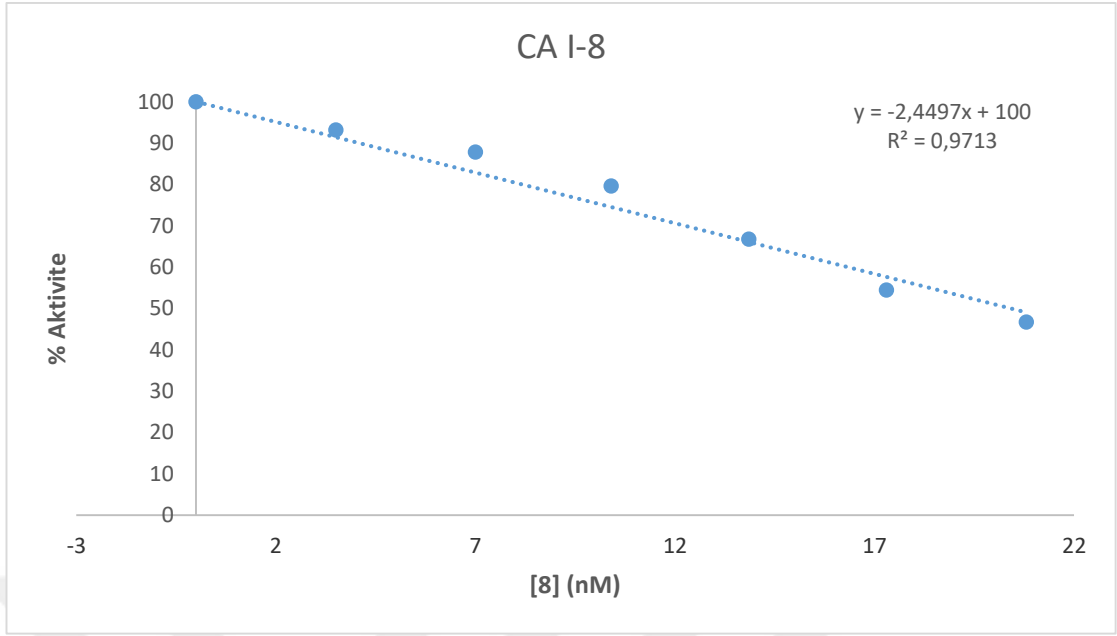
Çalışmamızın enzim inhibisyon verileri aşağıdaki gibi belirlenmiştir.



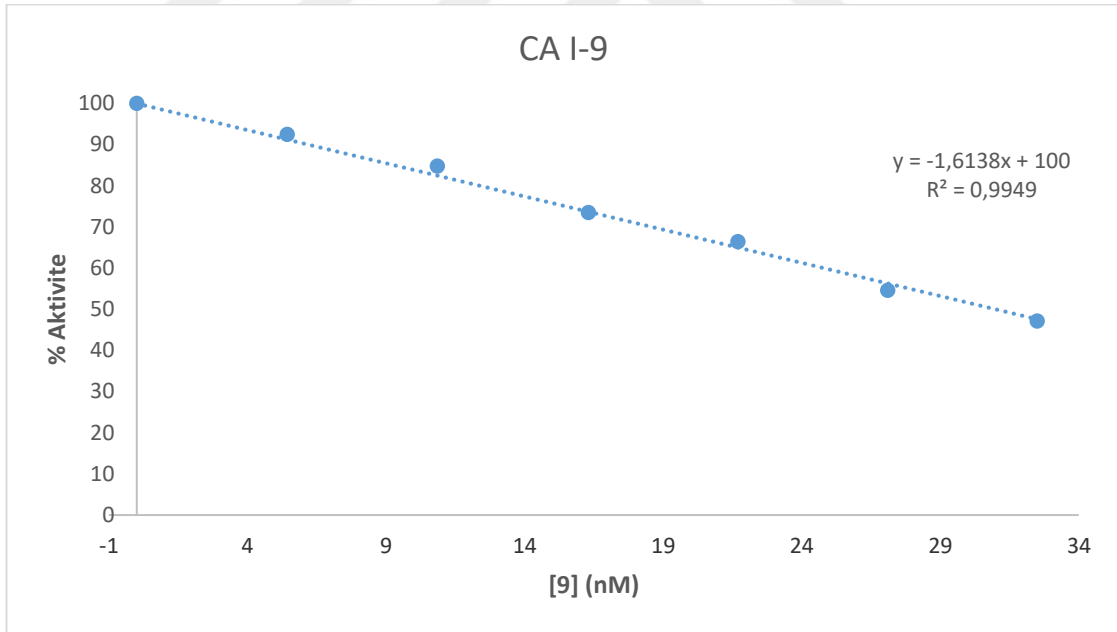
Şekil 4.21. Bileşik 6 için hCA I IC50 grafiği.



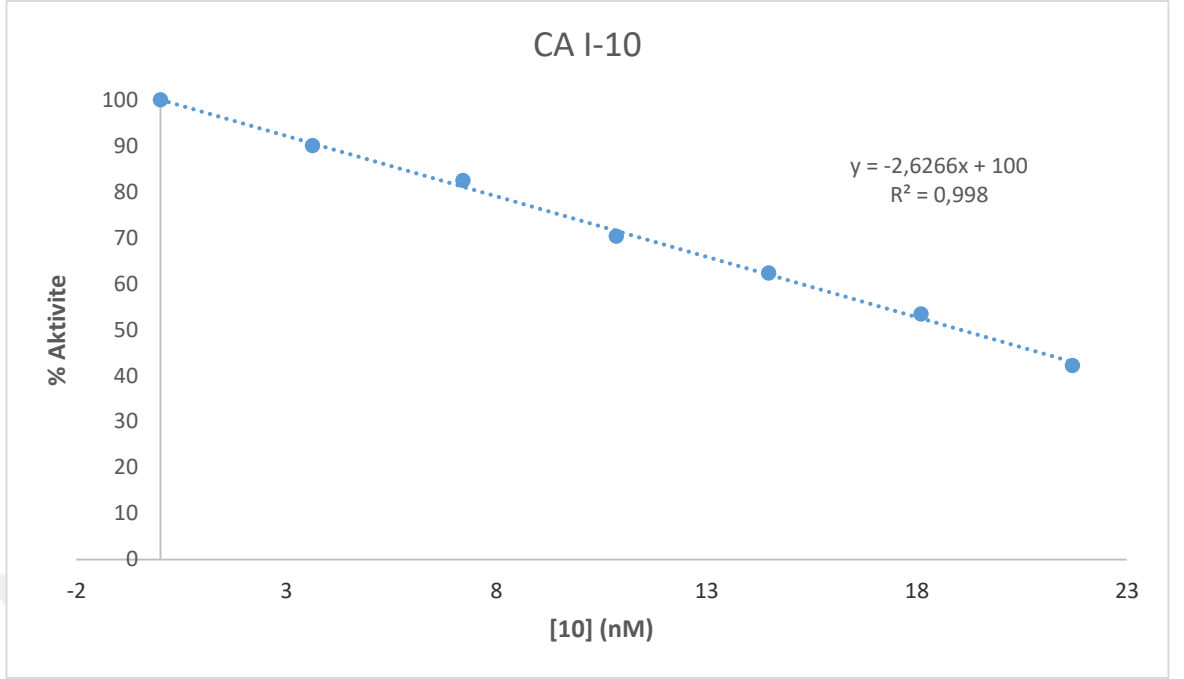
Şekil 4.22. Bileşik 7 için hCA I IC50 grafiği.



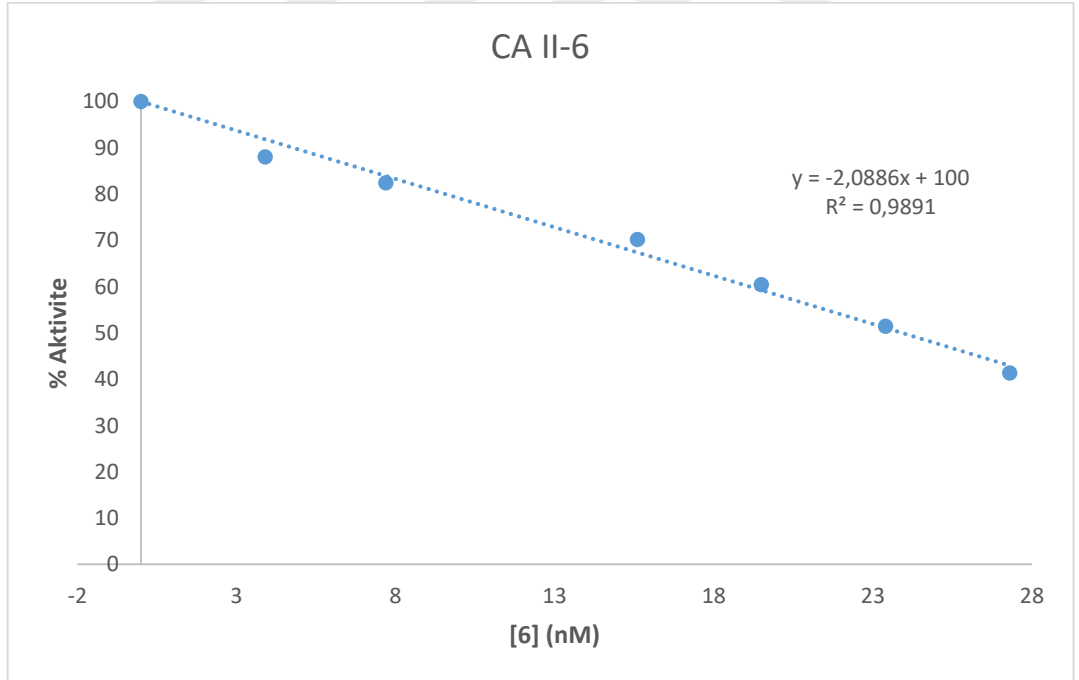
Şekil 4.23. Bileşik 8 için hCA I IC50 grafiği.



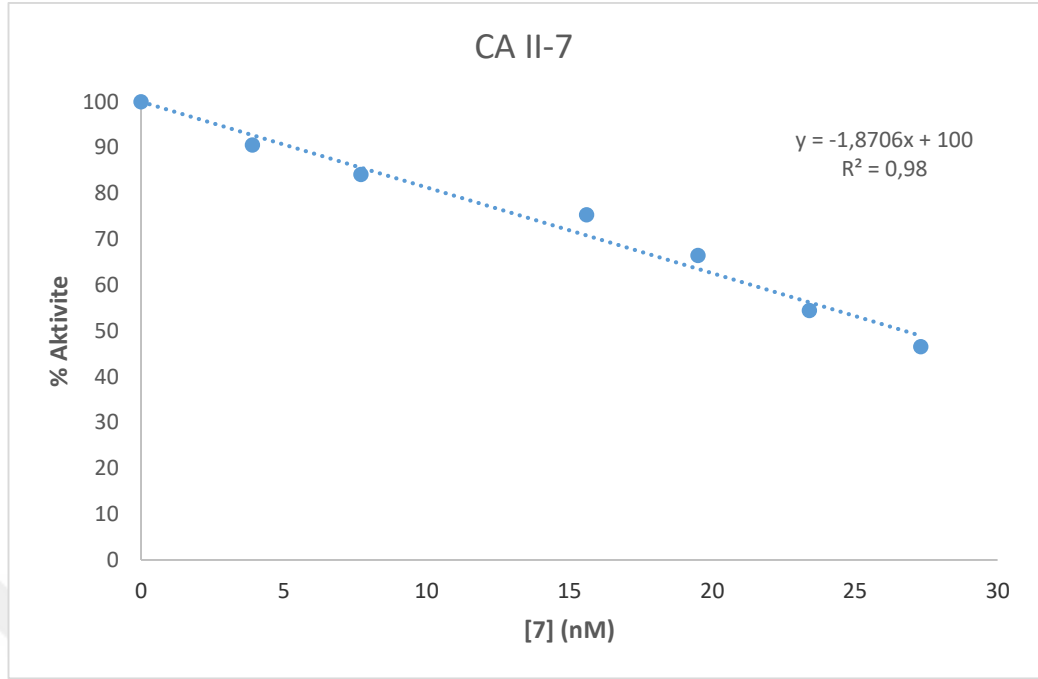
Şekil 4.24. Bileşik 9 için hCA I IC50 grafiği.



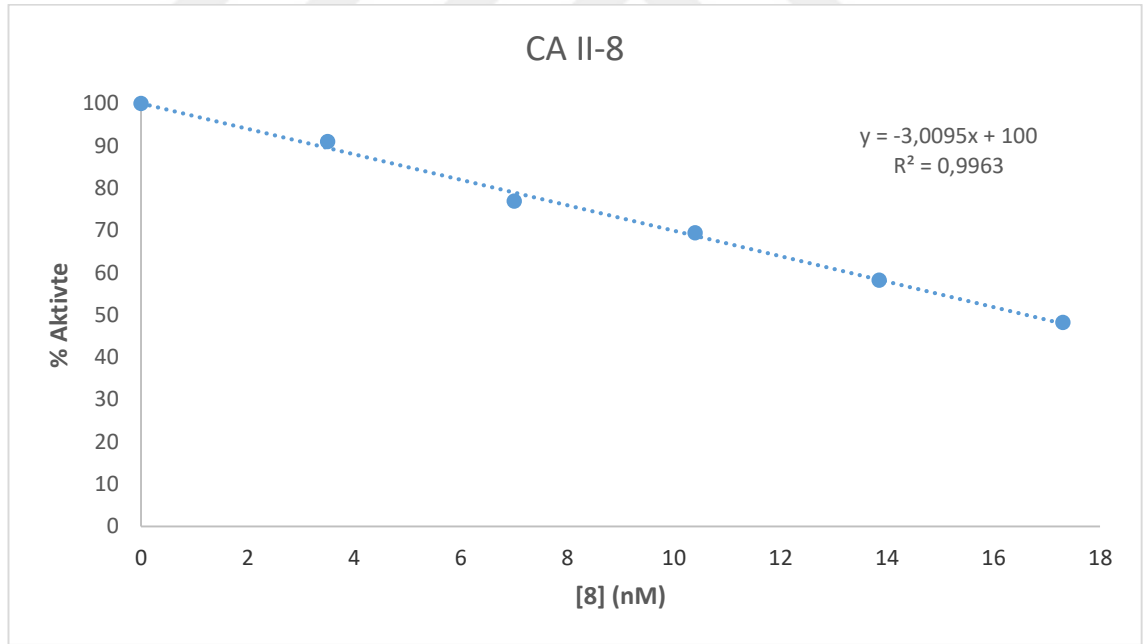
Şekil 4.25. Bileşik 10 için hCA I IC50 grafiği.



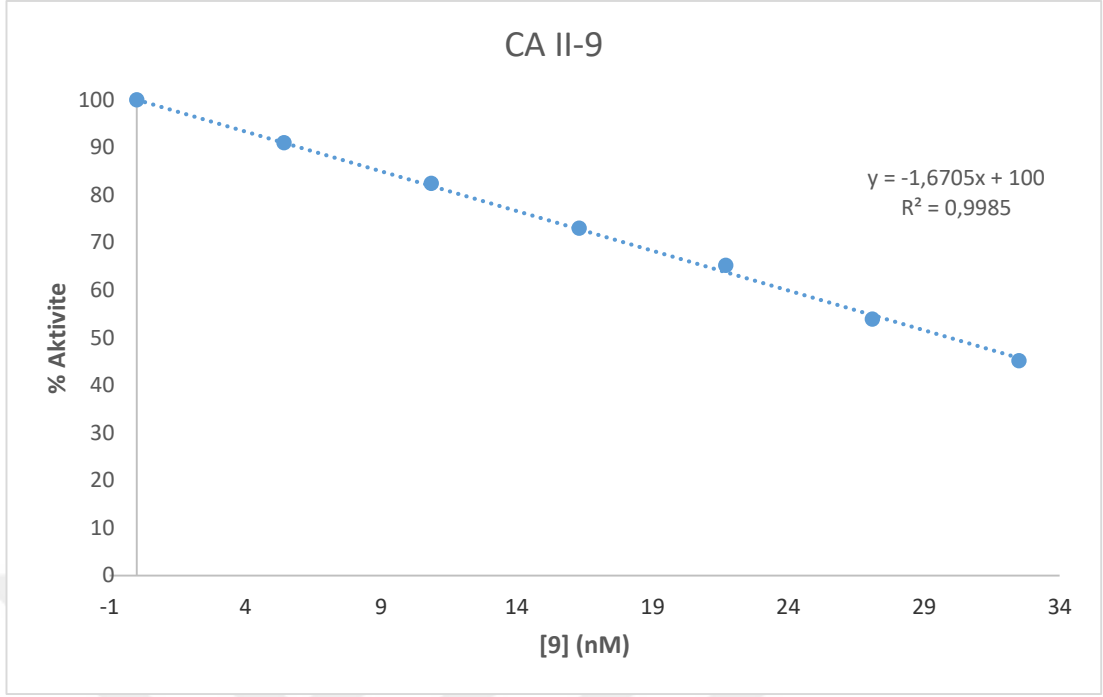
Şekil 4.26. Bileşik 6 için hCA II IC50 grafiği.



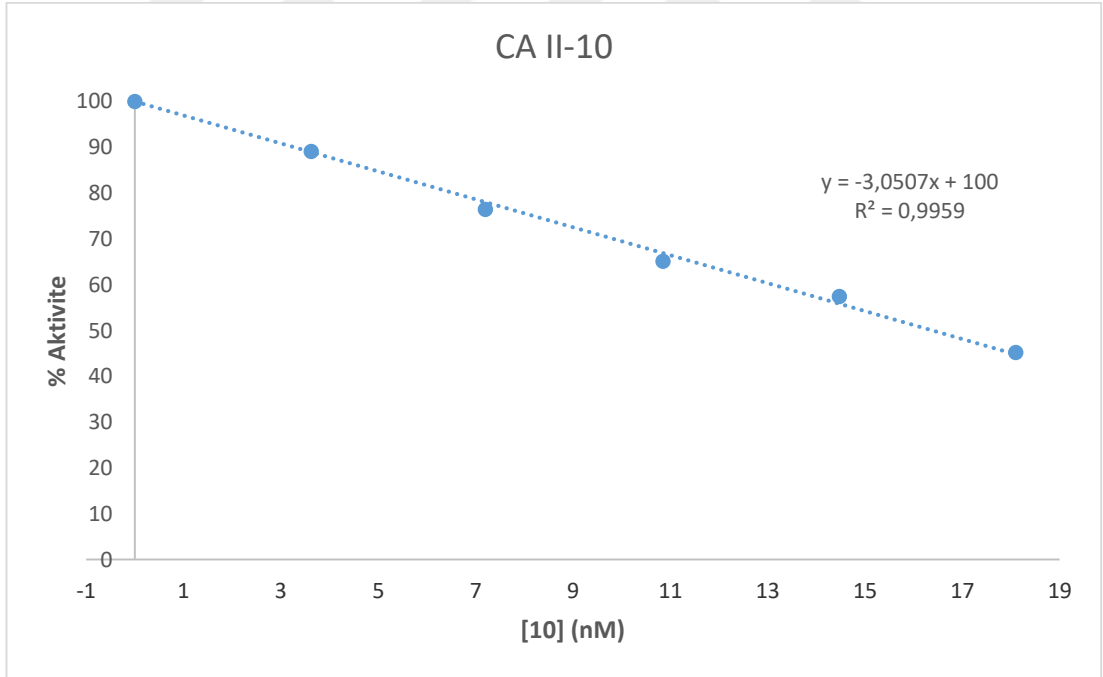
Şekil 4.27. Bileşik 7 için hCA II IC50 grafiği.



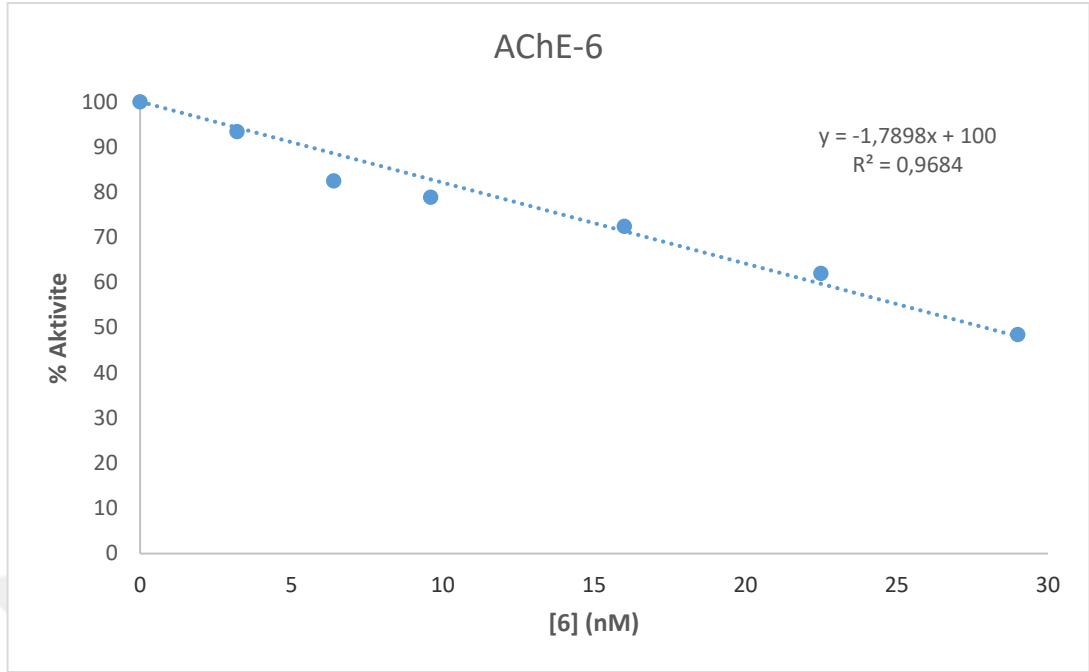
Şekil 4.28. Bileşik 8 için hCA II IC50 grafiği.



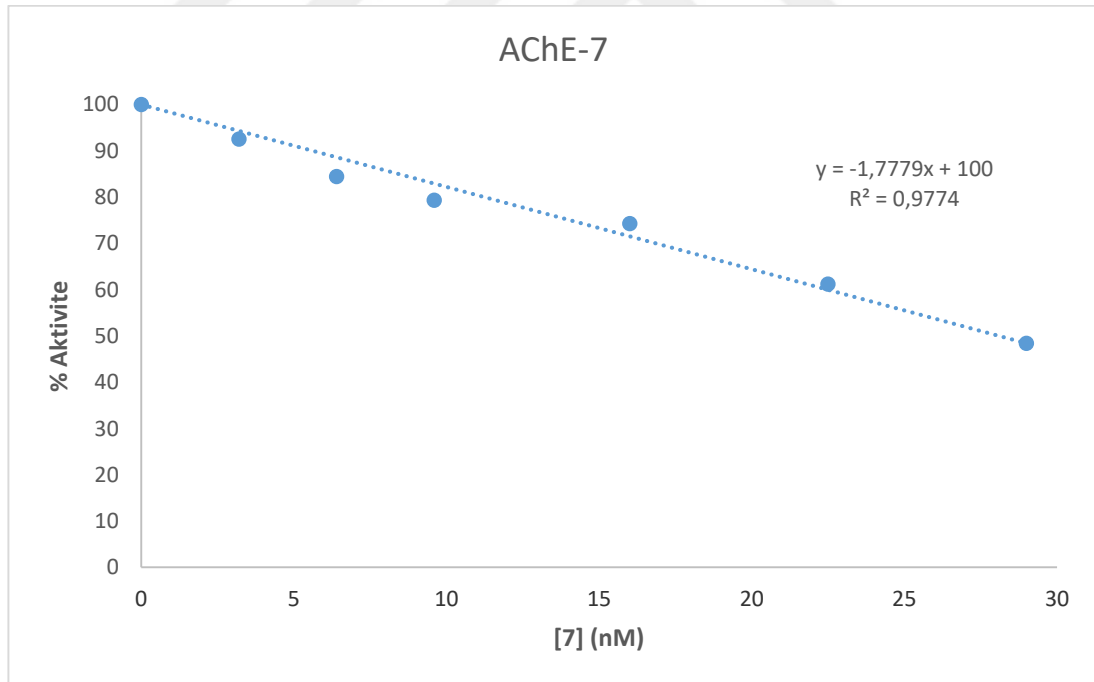
Şekil 4.29. Bileşik 9 için hCA II IC50 grafiği.



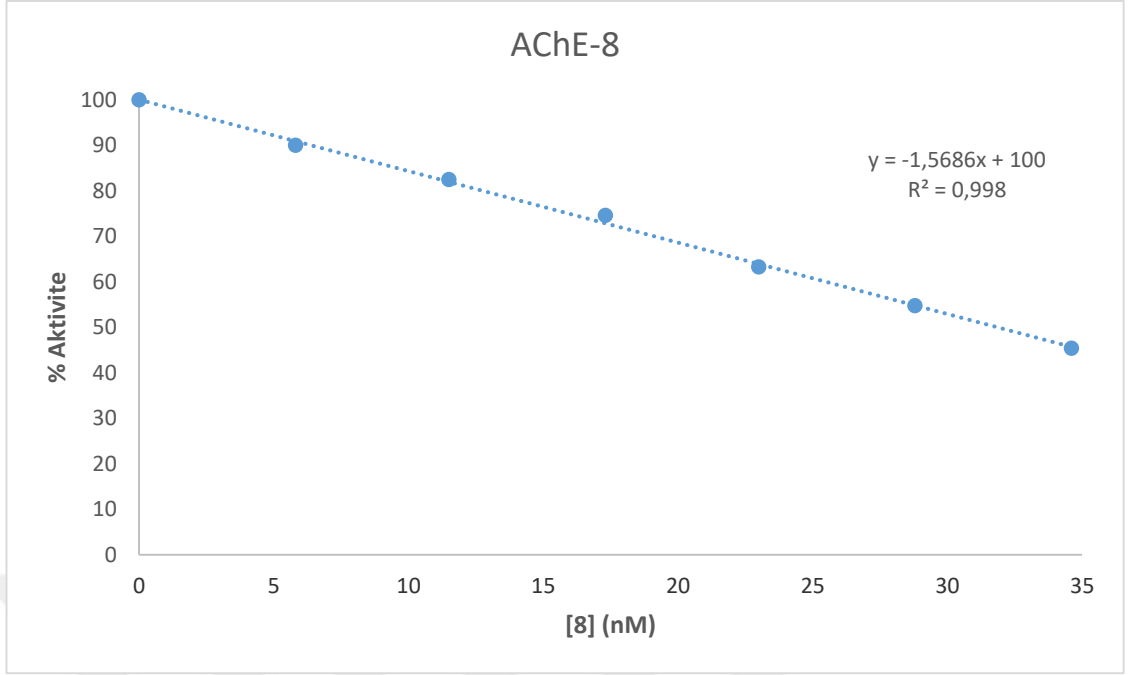
Şekil 4.30. Bileşik 10 için hCA II IC50 grafiği.



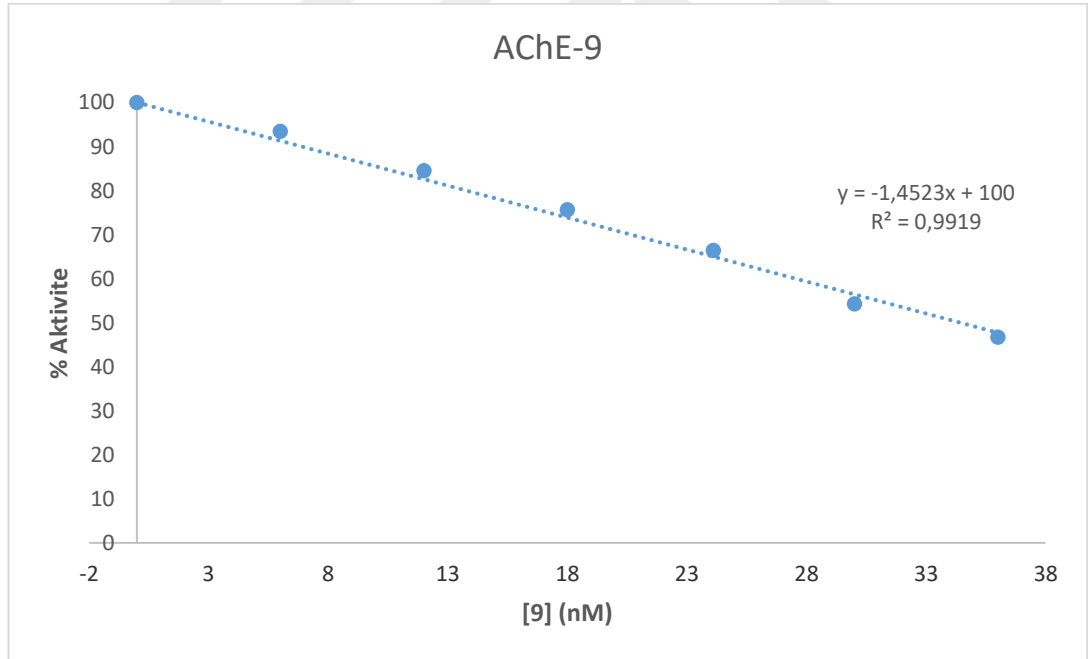
Şekil 4.31. Bileşik 6 için AChE IC50 grafiği.



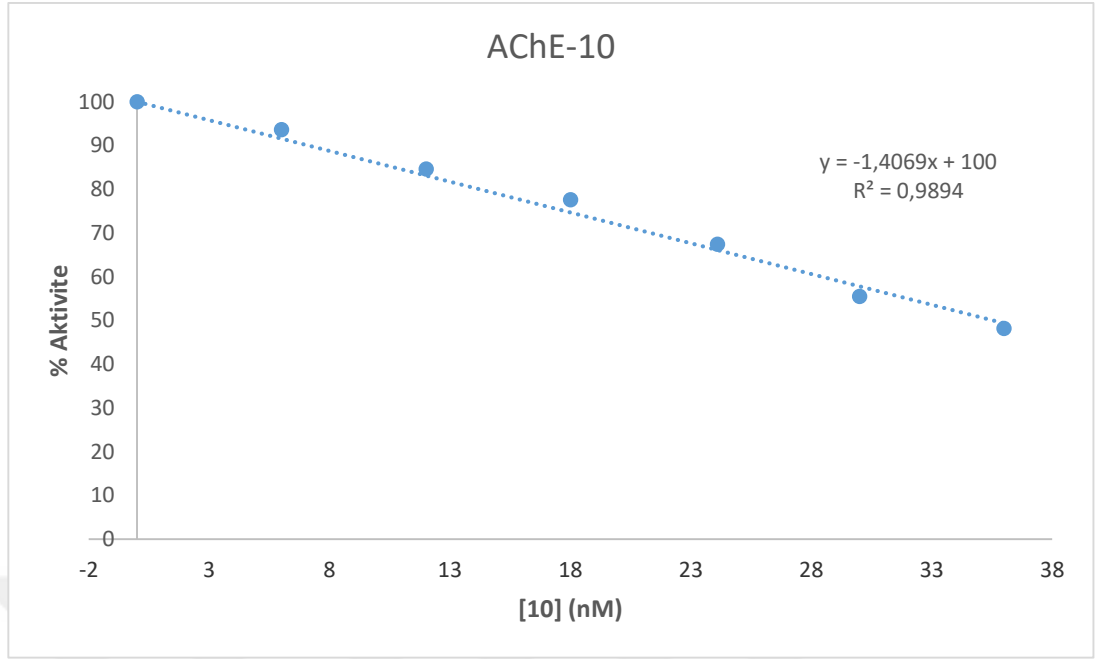
Şekil 4.32. Bileşik 7 için AChE IC50 grafiği.



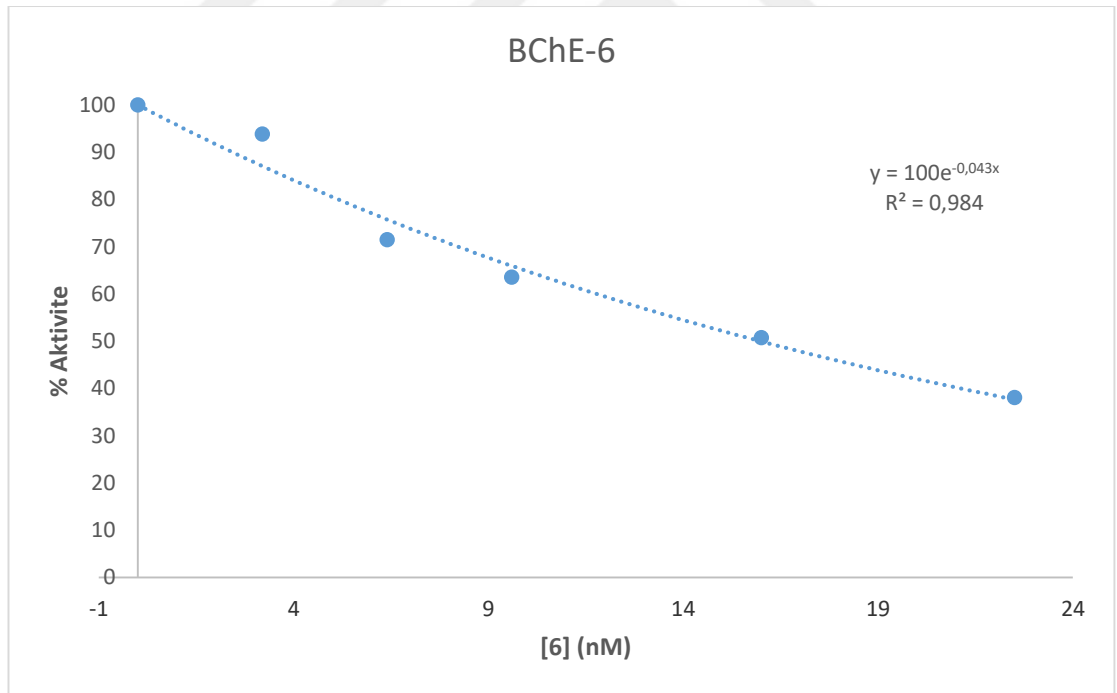
Şekil 4.33. Bileşik 8 için AChE IC50 grafiği.



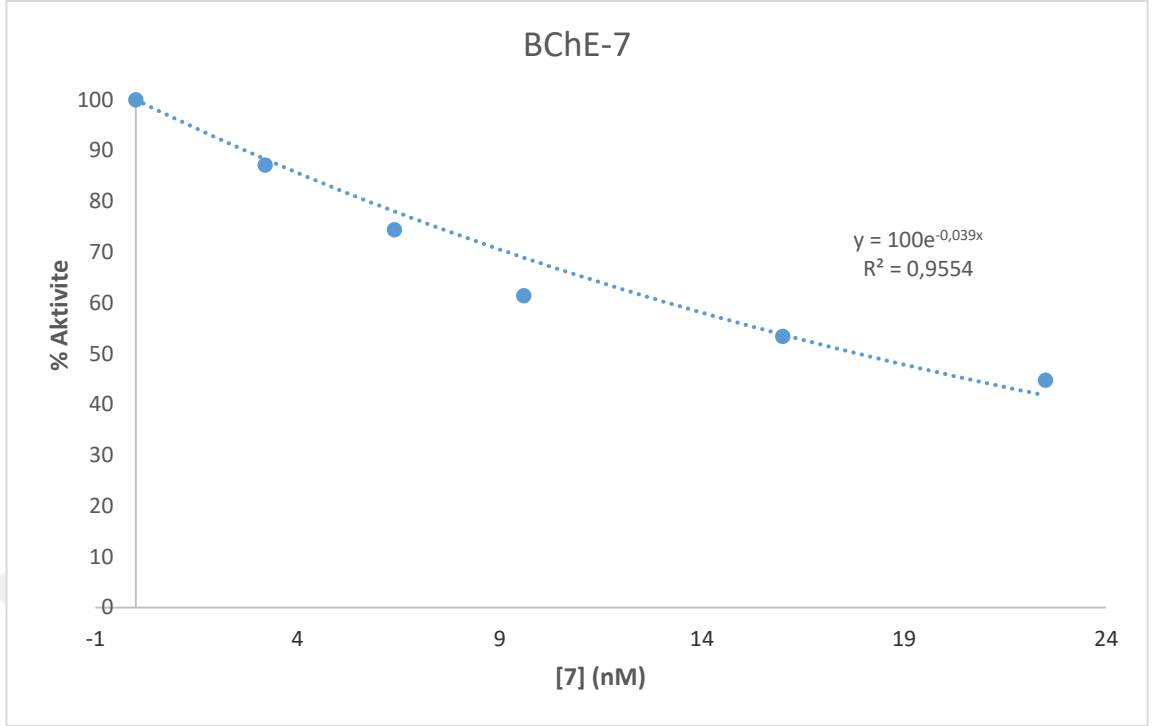
Şekil 4.34. Bileşik 9 için AChE IC50 grafiği.



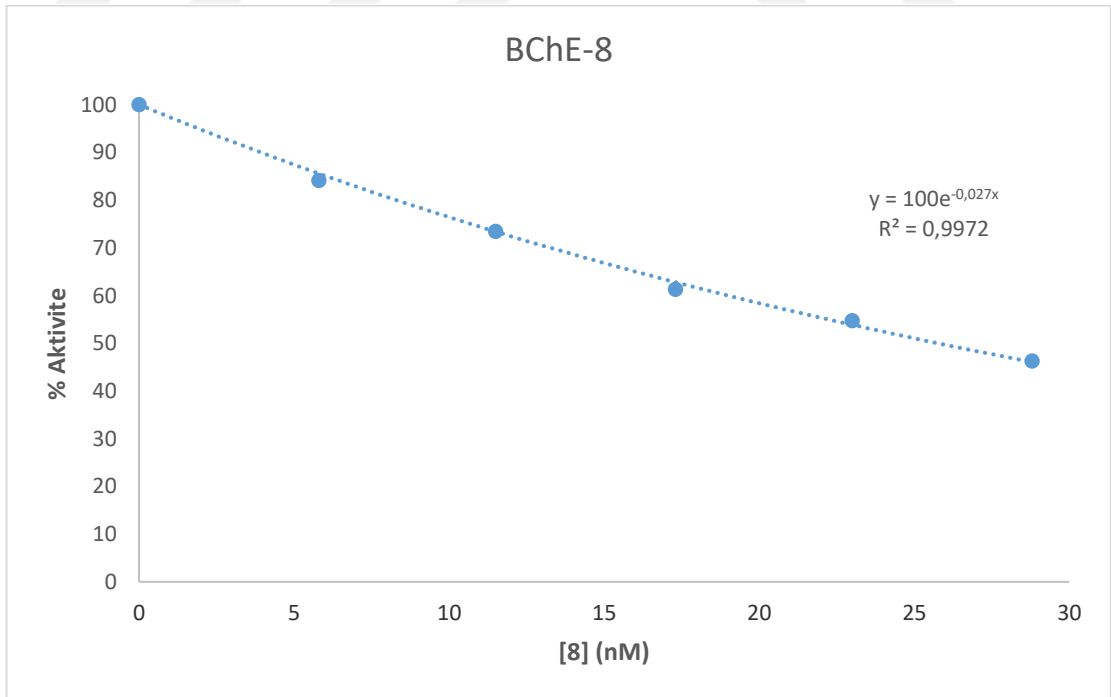
Şekil 4.35. Bileşik 10 için AChE IC50 grafiği.



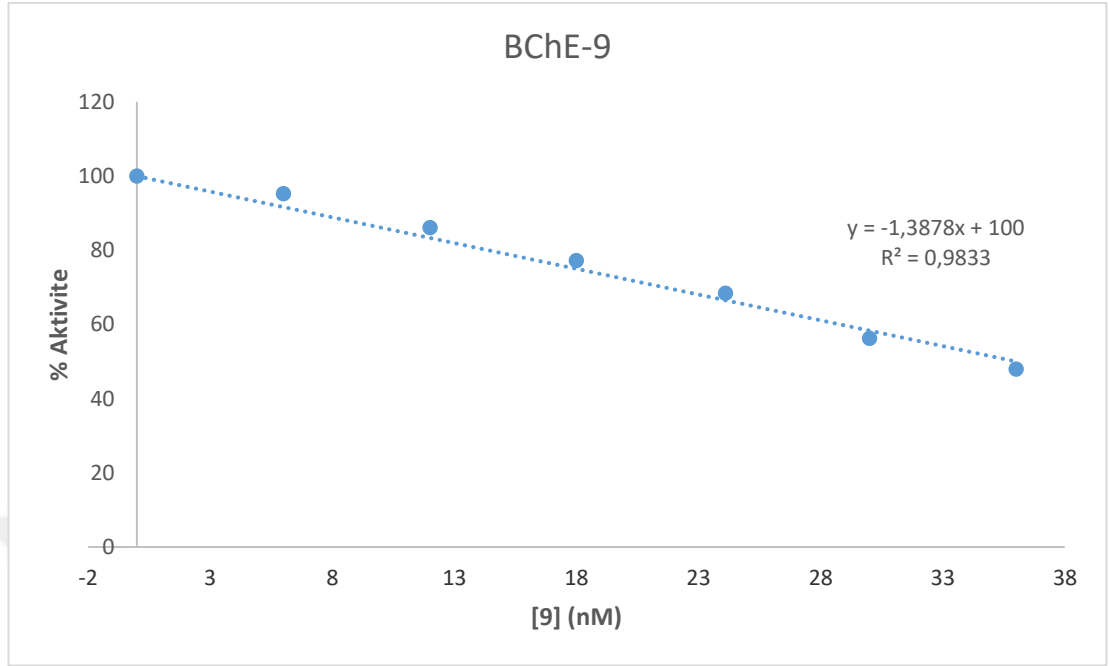
Şekil 4.36. Bileşik 6 için BChE IC50 grafiği.



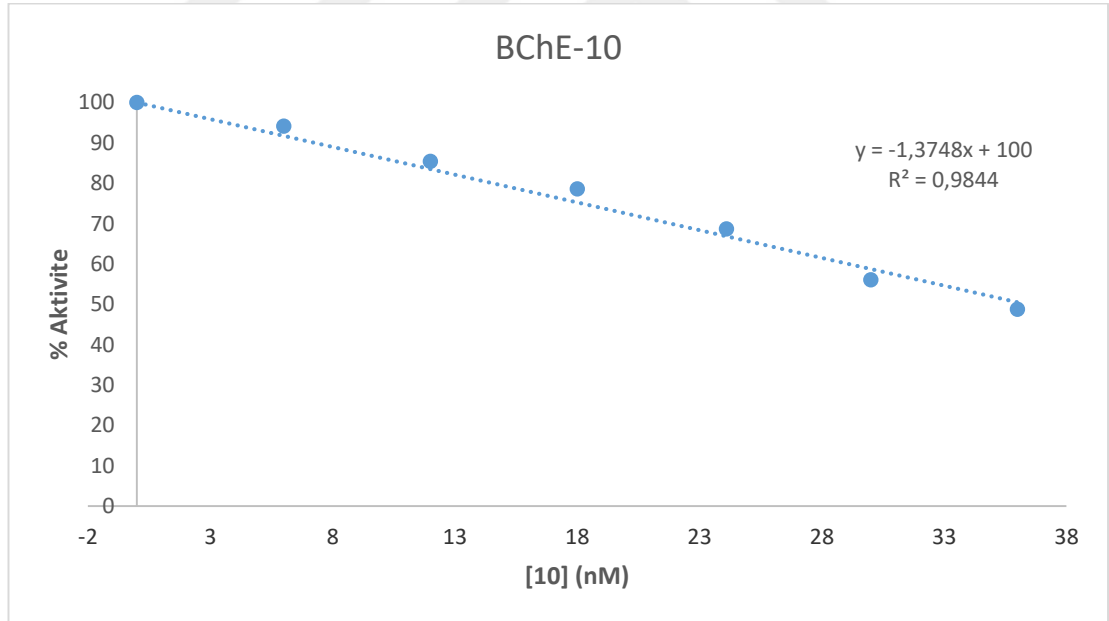
Şekil 4.37. Bileşik 7 için BChE IC₅₀ grafiği.



Şekil 4.38. Bileşik 8 için BChE IC₅₀ grafiği.



Şekil 4.39. Bileşik 9 için BChE IC₅₀ grafiği.



Şekil 4.40. Bileşik 10 için BChE IC₅₀ grafiği.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Enzimler, biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran ve istenmeyen yan ürünler oluşmadan tam ürün oluşumunu sağlayan biyokatalizörlerdir (Keha ve Küfrevioğlu 2021). Enzimatik tepkimeler sırasında, substratlar farklı moleküllere, yani ürünlere dönüşürler. Canlı organizmaların metabolizmasında gerçekleşen hemen hemen tüm tepkimeler, enzimlerin katılımını gerektirir. Enzimler, substratlarına son derece seçici bir şekilde etki ederler. Bu nedenle, bir hücre içinde bulunan farklı enzim grupları, hangi metabolik yolların aktif olduğunu belirler, çünkü birçok potansiyel tepkimeden sadece birkaçını hızlandırırlar. Genellikle, enzimler ileri ve geri tepkimelerin dengesini bozmaz, bunun yerine tepkimelerin hızını kontrol ederler (Senturk 2017; Keha ve Küfrevioğlu 2021).

CA izoenzimleri, CO₂ molekülünün bikarbonat ve H⁺ iyonlarına dönüşümünü katalize eden metaloenzimlerdir ve bu reaksiyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşir (Orhan *et al.* 2022). CA'lar, arkealar, bakteriler, omurgalılar, protozoalar ve yeşil bitkilerin kloroplastlarında bulunur (Orhan *et al.* 2022). CA'lar, metabolizma süreçlerinde pH düzenlemesi, elektrolit sekresyonu, biyosentez ve tümör oluşumu gibi birçok fizyolojik süreçte görev alırlar (Carta *et al.* 2012; Soydan *et al.* 2020).

AChE enzimi inhibe edildiğinde, sinir sisteminde ACh birikmeye başlar ve merkezi sinir sisteminde yüksek seviyelerde ACh, duyuşsal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon problemlerine, motor fonksiyonların baskılanmasına ve solunum yetmezliğine yol açabilir (Chang ve Strichartz 2005).

AChE inhibitörleri, çeşitli biyolojik etkinliklere sahip geniş bir yelpazeyi kapsarlar (Colovic *et al.* 2013). Bu toksinler doğal olarak meydana gelir ve AChE'yi güçlü bir şekilde inhibe ederler. AChE inhibitörleri, silah olarak sinir gazları şeklinde kullanılabilirler, insektisit olarak kullanılırlar ve ayrıca nöromüsküler bir hastalık olan Myastenia gravis'in tedavisinde, glaukoma tedavisinde, postural taşikardi sendromunun tedavisinde, antikolinerjik zehirlenmelere karşı panzehir olarak, non-depolarizan kas gevşeticilerin etkisini tersine çevirme amacıyla, apati gibi hastalıkların nöropsikiyatrik semptomlarının tedavisinde kullanılabilirler. Ayrıca, Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde, nörodejeneratif bozukluklar gibi semptomatik tedavilerde, görsel halüsinasyonlar gibi psikotik belirtilerde, şizofreni hastalarında

bilişsel bozuklukların tedavisinde, otizmin tedavisinde ve uyku düzenini hızlı bir şekilde teşvik etme ve uyuma süresini artırma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh *et al.* 2008; Ribeiz *et al.* 2010; Handen *et al.* 2011; Taylor *et al.* 2012; Choi *et al.* 2013).

Çalışmamızda hedeflenen bileşikler karakterize etmek için elemental analiz (CHNS) ve yapılarının aydınlatılmasında FT-IR, ^1H - ve ^{13}C -NMR spektroskopik yöntemler kullanıldı. Sülfonamit yapısına sahip Schiff bazı bileşiklerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde, yapıdaki N-H ve Schiff bazı oluşumunu gösteren -C=N- gerilme titreşim bantları sırasıyla 3283-3365 ve 1638-1648 cm^{-1} civarında ortaya çıktığı belirlendi. SO_2 fonksiyonel grubunun varlığını temsil eden asimetric ve simetric germe bantları S=O titreşimleri sırasıyla 1341-1377 ve 1141-1170 cm^{-1} civarında gözlemlendi. Schiff bazlarının (6-10) ^1H NMR spektrumları incelediğimizde, 8.42-8.07 ppm'de azometin protonu (-N=CH-) için karakteristik bir singlet gözlemlendi. Sülfonamit yapısındaki NH_2 protonları singlet olarak 7.30-7.31 ppm de rezonans olduğu saptandı. Aromatik protonlar, aromatik bölgede 7.10 ve 8.86 ppm rezonans olduğu belirlendi. 9 ve 10 nolu bileşiklerinin -OCH_3 protonları 3.51-3.54 ppm'de singlet olarak rezonans olduğu saptandı. Schiff bazlarının ^{13}C NMR spektrumlarında, Schiff bazı oluşumunu destekleyen -N=CH- karbonları 152.54 ppm ile 160.48 ppm arasında sinyal verdiği belirlendi. Bu bileşiklerin aromatik karbonlarına bağlı olarak ortaya çıkan sinyaller 113.69- 160.61 ppm'de belirlendi. Bileşik 9 ve 10'nun -OCH_3 karbonları yaklaşık 56 ppm'de tespit edilmiştir. Ayrıca elementel analiz (C, H, N, S) verileri önerilen yapılar için uygundur. Sonuç olarak karakterizasyon verilerinin molekül yapılarıyla uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin çalışılan enzimler için IC_{50} değerleri aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

İnhibitor	CA I (nM)	CA II (nM)	AChE (nM)	BChE (nM)
6	21,51	23,94	27,94	16,18
7	25,54	26,73	28,12	17,77
8	20,41	16,61	31,87	25,67
9	30,98	29,93	34,43	36,03
10	19,04	16,39	35,54	36,37

- Son yıllarda farmasötik açıdan hedef olarak görülen enzimler üzerinde birçok çalışmada yapılmaktadır. Bu çalışmaların asıl amacı yeni ilaç molekülleri keşfetmektir. En eski sentetik antibakteriyel ilaç grubu olan sülfonamidlerin de bu bağlamda yeni türevlerinin sentezlenmesi kullanım sahasının çok geniş olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tez çalışmamızda yeni sülfonamid türevleri sentezleyerek sonrasında spesifik inhibitörü oldukları bilinen CA izoenzimleri üzerinde denendi. Sonrasında ise AChE ve BChE gibi son yıllarda üzerlerinde çok farklı moleküllerin denendiği başka bir grup farmasötik hedef üzerinde deneme yaptık.
- Bu çalışmalar sonucunda sentezlediğimiz 6-10 numaralı moleküllerin son derece etkili CA inhibitörleri olduğunu. Aynı zamanda AChE ve BChE enzimleri üzerinde de son derece başarılı şekilde inhibisyon gösterdiklerini söylemek mümkündür.
- Kolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer hastalığı başta olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. CA inhibitörlerinin de başta glukom, ödem olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilmektedir. Bu durum sentezlenen ve bu enzimler üzerindeki etkinlikleri belirlenen sülfonamid türevi bu moleküllerin birçok hastalık tedavisinde kullanılabilmek potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Akkemik, E., Çalışır, Ü. and Çiçek, B. 2017. İnsan karbonik anhidraz I,II izoenzim aktiviteleri üzerine bazı tiyocrown eterlerin etkisi. BAUN Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(2), 192-199.
- Akocak, S., Supuran, C.T. 2019. Activation of α -, β -, γ -, δ -, ζ and η -, class of carbonic anhydrases with amines and amino acids: a review. Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry, 34, 1652–1659.
- Bag, S., Tulsan, R., Sood, A., Cho, H., Redjeb, H., Zhou, W., LeVine, H., Török, B., Török, M. 2015. “Sulfonamides as multifunctional agents for Alzheimer’s disease”, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 25(3), 626-630.
- Başaran, E. (2023). Schiff Base Derivatives Based on Ampyrone as Promising Acetylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Spectral Characterization, Biological Activity, and SwissADME Predictions. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 49(1), 114-126.
- Buzás, G. M. and Supuran, C. T. 2015. The history and rationale of using carbonic anhydrase inhibitors in the treatment of peptic ulcers. In memoriam Ioan Pușcaș (1932–2015). Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 31(4), 527-533.
- Carta F, Dumy P, Supuran CT, Winum JY. Multivalent Carbonic Anhydrases Inhibitors. Int J Mol Sci. 2019, 20(21):5352.
- Carta F, Supuran CT, Scozzafava A. 2014. Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. Future Med Chem, 6:1149-1165.
- Carta, F., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. (2012). Sulfonamides: a patent review (2008 - 2012). Expert opinion on therapeutic patents, 22(7), 747–758.
- Chen, Z.-R., Huang, J.-B., Yang, S.-L., & Hong, F.-F. (2022). Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer’s Disease. Molecules, 27(6), 1816.
- Chiaromonte, N., Romanelli, M. V., Teodori, E. And Supuran, C. T. 2018. Amino Acids as Building Blocks for Carbonic Anhydrase Inhibitors. Metabolites, 8, 36.

- Chiu, P.Y. and Wei, C.Y. (2017). Donepezil in the one-year treatment of dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Journal of The Neurological Sciences*, 381, 322
- Choi, KH; Wykes, T; Kurtz, M.M., 2013. Adjunctive pharmacotherapy for cognitive deficits in schizophrenia: meta-analytical investigation of efficacy. *The British Journal of Psychiatry* 203,172-178.
- Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315–335.
- Darvesh, S., Hopkins, D. and Geula, C. 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 131–138
- De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J., and Sorin, E. J. (2021). A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules*, 11(4), 580.
- Demir, Z. and Türkan, F. 2022. Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Enzimlerinin Alzheimer Hastalığı ile İlişkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12(4): 2386 - 2395.
- DiMario, R. J., Machingura, J. M., Waldrop, G.L. and Moroney, J. V. 2018. The many types of carbonic anhydrases in photosynthetic organisms. *Plant Science*, 268, 11-17
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7,88-95
- Dwomoh, L., Tejeda, G. S., and Tobin, A. B. (2022). Targeting the M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuronal signaling*, 6(1),
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current neuropharmacology*, 14(1), 101–115.

- Geldeard, L.J., 2009. Fundamental Studies on 2,4,6-trichlorophenyl sulfonate esters. University College London, Faculty of Mathematical and Physical Sciences, Doctoral thesis.
- Girisha, H., Narendra Sharath Chandra, J., Boppana, S., Malviya, M., Sadashiva, C., Rangappa, K. 2009. "Active site directed docking studies: Synthesis and pharmacological evaluation of cis-2,6-dimethyl piperidine sulfonamides as inhibitors of acetylcholinesterase", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(10), 4057-4062.
- Gökşen, U.S. ve Kelekçi, N.G. 2010. Antiinflamatuvar Tedavide Yeni Bir Yaklaşım: Sikooksijenaz ve 5-Lipooksijenazın Dual İnhibitörleri. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy, (1), 81-117
- Greig, N.H., Utsuki, T., Yu, Q.S., Zhu, X., Holloway, H.W., Perry, T., Lee, B., Ingram, D.K., Lahiri, D.K. (2001). A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.*, 17 (3), 159-165.
- Gürsoy Şen, S. ve Gürsoy, O. 2017. Pestisit Analizlerinde Asetilkolinesteraz İnhibisyonuna Dayalı İletken Polimer Esaslı Biyosensörler. *Akademik Gıda*, 15(4), 426-435.
- Handen, B.L.; Johnson, C.R.; McAuliffe-Bellin, S.; Murray, P.J.; Hardan, A.Y. 2011. safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism: neuropsychological measures. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 21, 43-50.
- Hisar, O., Aras Hisar, Ş., Yanık, T. and Aras M.S. 2003. Balık Kan Karbondioksitinin Taşınması ve Atılmasında Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Fonksiyonlar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34 (4), 387-393.
- Houghton, P. J., Ren, Y., & Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural product reports*, 23(2), 181–199.

- Işık, A.T., Bozoğlu, E. ve Eker, D. (2012). AChE and BuChE inhibition by rivastigmin have no effect on peripheral insulin resistance in elderly patients with Alzheimer disease. *Journal of Nutrition*, 16(2), 139-141.
- Jiang, C. S., Ge, Y. X., Cheng, Z. Q., Wang, Y. Y., Tao, H. R., Zhu, K., and Zhang, H. 2019. Discovery of New Selective Butyrylcholinesterase (BChE) Inhibitors with Anti-A β Aggregation Activity: Structure-Based Virtual Screening, Hit Optimization and Biological Evaluation. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(14), 2568.
- Jonsoon, B. and Liljas, A. 2020. Perspectives on the Classical Enzyme Carbonic Anhydrase and the Search for Inhibitors. *Biophysical Journal*, 119, 1275–1280.
- Keha E.E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2021. *Biyokimya*. Aktif yayın evi. 13. Baskı. Ankara.
- Koçancı, F. G. & Aslım, B. (2016). Structure and Functions of Acetylcholinesterase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Plants . *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences* , 6 (1) , 19-35 .
- Krungkrai, S.R., Suraveratun, N., Rochanakij, S., Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in plasmodium falciparum. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668
- Leaf, D. E., & Goldfarb, D. S. (2007). Mechanisms of action of acetazolamide in the prophylaxis and treatment of acute mountain sickness. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 102(4), 1313–1322.
- Li, S., Li, A. J., Travers, J., Xu, T., Sakamuru, S., Klumpp-Thomas, C., Huang, R., & Xia, M. (2021). Identification of Compounds for Butyrylcholinesterase Inhibition. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 26(10), 1355–1364.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Erroi, E. and Schettino, T. 2012. Carbonic Anhydrase as Pollution Biomarker: An Ancient Enzyme with a New Use. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9, 3965-3977.
- Lomelino, C. L., Supuran, C. T. and McKenna, R. 2016. Non-Classical Inhibition of Carbonic Anhydrase. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1150.

- Masson, P., & Lockridge, O. (2010). Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of biochemistry and biophysics*, 494(2), 107–120.
- Mehta, M., Adem, A., & Sabbagh, M. (2012). New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012.
- Monti SM, Supuran CT, and De Simone G. 2013. Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008 - 2013). *Expert Opin Ther Pat*. 23(6) :737-49.
- Oakeshott, J.G., Van Papenrecht, E. A., Boyce T. M., Healy, M. J., Russell, R. J. 1993. Evolutionary Genetics of Drosophila Esterases. *Genetica*. 90. 239- 268
- Oliveira Maciel, A., Christakopoulos, P., Rova, U. and Antonopoulou. I. 2022. Carbonic anhydrase to boost CO₂ sequestration: Improving carbon capture utilization and storage (CCUS). *Chemosphere*, 29, 1-25.
- Orhan, F., Senturk, M., Genisel, M. 2022. A new carbonic anhydrase identified in the Gram-negative bacterium (*Chromohalobacter* sp.) and the interaction of anions with the enzyme. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 254(2022)109290. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109290>.
- Ovung, A., & Bhattacharyya, J. (2021). Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical reviews*, 13(2), 259–272.
- Öztürk, F., Aycan, T. ve Con, A.H. 2020 Sülfametyazol-2,2'-Bipiridin Tuzunun Yapısal ve Spektral İncelenmesi: Deneysel ve Moleküler Modelleme Çalışması. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 9(2), 525-541
- Pogetti, V., Salerno, S., Baglini, E., Barresi, E., Settimo De, F. and Taliani, S. 2022. Carbonic Anhydrase Activators for Neurodegeneration: An Overview. *Molecules*., 27,2544.
- Radic, Z., Pickering, N.A., Vellom, D.C., Camp, S., Taylor, P. (1993) Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32 (45), 12074-12084.

Rand JB. Acetylcholine. WormBook. 2007 Jan 30:1-21.

Riaz, S., Khan, I., Bajda, M., Ashraf, M., Qurat-ul-Ain, Shaukat, A., Rehman, T., Mutahir, S., Hussain, S., Mustafa, G. and Yar, M. 2015. "Pyridine sulfonamide as a small key organic molecule for the potential treatment of type-II diabetes mellitus and Alzheimer's disease: In vitro studies against yeast α -glucosidase, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase", *Bioorganic Chemistry*, 63, 64-71.

Ribeiz, S.R., Bassitt, D.P., Arrais, J.A., Avila, R., Steffens, D.C., Bottino, C.M. (2010). Cholinesterase inhibitors as adjunctive therapy in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder a review and meta-analysis of the literature. *CNS Drugs*, 24, 303-317.

Senturk, M., *Enzyme Inhibitors and Activators*, 2017. Edited by Murat Senturk. Publisher: IN-TECH. ISBN 978-953-51-3058-1.

Sharma K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular medicine reports*, 20(2), 1479-1487.

Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S., Lampasona, M., Catalan, C., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3295-3302.

Soydan, E., Olcay, A. C., Bilir, G., Tas, O., Senturk, M., Ekinici, D., Supuran, C.T. 2020. Effects of some pesticides on honey bee carbonic anhydrase enzyme. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 35 (1) 1923-1927.

Soylu, Ö. ve Karalı, N. (2017). Alzheimer Hastalığı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J. Pharm. Sci.*, 6 (2), 94-109

Supuran, C.T. Scozzafava, A. Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, 1 (2001), 61-97.

Tansey E.M., Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C.R. Biologies.*;329:419–425. [PubMed] (2006).

- Tattersall, John. 2018. Anticholinesterase toxicity. *Current Opinion in Physiology*. 4. 10.1016
- Taylor, D., Paton, C., Shitij, K. (2012). *Maudsley Prescribing Guidelines in Psychiatry*. London: Wiley-Blackwell.
- Walczak-Nowicka, Ł. J., and Herbet, M. (2021). Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9290.
- Winum, J.Y., Montero J.L., Scozzafava A., Supuran C.T., Zinc binding functions in the design of carbonic anhydrase inhibitors. Wiley: Hoboken, 39- 72, 2009.
- Yildirim ER, Ulusoy Guzeldemirci N. Recent advances of cholinesterase inhibitors playing a critical role in the treatment of alzheimer's disease (2020-2022). *Journal of Advanced Research in Health Sciences* 2023;6(2):197-209.
- Yonar, M. E. & Sağlam, N. (2013). Sülfonamidler ve Balıklarda Kullanımı . *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* , 1 (1) , 37-42
- Zamanova S, Shabana AM, Mondal UK, Ilies MA. Carbonic anhydrases as disease markers, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2019, 29(7):509-533.
- Zhou, S., & Huang, G. 2022. The biological activities of butyrylcholinesterase inhibitors. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 146, 112556.
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., & Gotti, C. 2018. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current neuropharmacology*, 16(4), 338–349