

170372

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

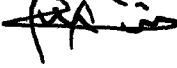
**GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILAN YENİ  
SÜLFANİLAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE  
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

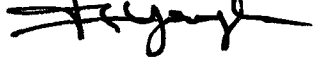
**Mustafa DURGUN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2004**

Yrd.Doç.Dr. Hasan TÜRKMEN danışmanlığında, Mustafa DURGUN' un hazırladığı "Glokom Tedavisinde kullanılan yeni Sülfanilamit Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi" konulu bu çalışma 01/10/2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Harran üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRKMEN 

Üye : Prof. Dr. Nurettin YAYLI 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa DEĞİRMENCI 

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

**Prof. Dr. İbrahim BOLAT**

**Enstitü Müdürü**   


**Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.**

**Proje No: 348**

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

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1 Gözün Yapısı ve Glokom.....	3
2.1.1. Gözün yapısı.....	3
2.1.2. Glokom.....	5
2.1.3. Göz içi basıncı ve glokom oluşumu.....	5
2.1.4. Glokomun sınıflandırılması.....	6
2.1.4.1. Primer glokom.....	7
2.1.4.2. Konjenital glokom.....	9
2.1.4.3. Sekonder glokom.....	9
2.1.5. Tedavi.....	10
2.1.6. Glokomda risk faktörleri.....	11
2.1.7. Göz içi basıncı (GİB).....	12
2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi.....	14
2.2.1. Karbonik anhidraz enziminin metabolizmadaki yeri.....	16
2.2.2. Karbonik anhidraz enziminin metabolizmadaki katalitik mekanizması.....	18
2.3. Karbonik Anhidraz inhibitörleri.....	21
2.3.1. Sülfonamidler.....	21
2.3.2. Karbonik anhidraz inhibitörleri olan sülfonamidlerin etki mekanizması.....	22
2.3.3. Karbonik anhidraz inhibitörlerin sınıflandırılması.....	25
2.3.3.1. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri.....	25
2.3.3.2. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1. Materyal.....	31
3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler.....	31
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	31
3.1.3. Kullanılan cihazlar.....	33
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Sülfü ilaçları.....	34
3.2.2. Sentez.....	35
3.2.2.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamid (8)' in sentezi.....	35
3.2.2.2. 4-(3-metilpiperazinpropanoilamino) benzensülfonamid (9)' un sentezi.....	36
3.2.2.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamid (10)' un sentezi.....	37
3.2.2.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzensülfonamid (11)' in sentezi.....	38
3.2.2.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamid (12)' in sentezi.....	39
3.2.3. Biyolojik çalışma.....	40
3.2.3.1. Sentezlenen bileşiklerin IC <sub>50</sub> değerinin saptanması.....	41
3.2.3.2. Tampon çözeltisinin hazırlanması.....	41
3.2.3.3. Substrat solusyonun hazırlanması.....	41
3.2.3.4. IC <sub>50</sub> değerinin saptanması.....	42
3.2.3.5. Bölme katsayısı ölçümü.....	42
3.2.3.6. Bölme katsayısının belirlenmesi.....	43
3.2.3.7. İnhibitörlerin sudaki çözünürlüklerinin hesaplanması.....	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	45
4.1. Sentezlenen Maddelerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması.....	45

4.1.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzen-sulfonamit (8).....	45
4.1.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzen-sulfonamit (9).....	47
4.1.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzen-sulfonamit (10).....	48
4.1.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzen-sulfonamit (11).....	50
4.1.5. 4-(3-metilpiperidinnopropanoil amino)-benzen sulfonamit (12).....	52
4.2. Biyolojik Çalışma (in vitro) Sonuçları Değerlendirilmesi.....	55
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	67
EK 1 Sentezlenen bileşiklerin FT IR spektrumları.....	68
EK 2 Sentezlenen bileşiklerin <sup>1</sup> H NMR spektrumları .....	71
EK 3 Sentezlenen bileşiklerin <sup>13</sup> C NMR spektrumları .....	74
EK 4 Sentezlenen bileşiklerin kütle spektrumları .....	77
ÖZET.....	80
SUMMARY.....	82



## ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

### GLOKOM TEDAVİSİNDE KULLANILAN YENİ SÜLFANİLAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Mustafa DURGUN

Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Hasan TÜRKMEN  
Yıl: 2004, Sayfa : 83

Bu çalışmanın amacı, glokom tedavisinde kullanılan yeni sülfanilamid türevlerinin sentezi ve sentezlenen bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla karbonik anhidraz inhibitörleri olan yeni sülfanilamid türevleri yüksek verim ve saflıkta sentezlenmiştir. Bu bileşikler sırasıyla 4-(3-metil piperazinopropanoilamino) benzensülfonamid, 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamid, 4-(3-pirolidinopropanoilamino) benzensülfonamid ve 4-(3-metilpiperidino propanoilamino) benzensülfonamid'dir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları, elemental analiz, FT IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve Kütle spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatılmıştır. Elde edilen bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri de araştırılmıştır. Karbonik anhidraz inhibitör aktiviteleri (*in vitro*) UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Bu verilerle birlikte sülfanilamidlerin bölme katsayısı, sudaki çözünürlükleri gibi çeşitli fiziksel özellikleri de incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin asetazolamid ve sülfanilamitten daha güçlü inhibitör oldukları tespit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Glokom, Karbonik Anhidraz İnhibitörleri, Sülfanilamid

## ABSTRACT

MSc Thesis

### SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES OF NOVEL DERIVATIVES OF SULFANILAMIDE FOR GLAUCOMA THERAPY

· Mustafa DURGUN

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

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hasan TÜRKMEN

Year: 2004, Page: 83

The objective of this work is the synthesis of novel derivatives of sulfanilamide and investigation of their biological activity for glaucoma therapy. Novel sulfanilamide derivatives as inhibitors of carbonic anhydrase were synthesized in the work. All novel sulfonamides were synthesized in high yield and purity. These compounds are 4-(3-methylpiperazinopropanoylamino) benzenesulfonamide, 4-(3-morpholinopropanoylamino) benzenesulfonamide, 4-(3-pyrrolidinopropanoylamino) benzenesulfonamide and 4-(3-methylpiperidinopropanoylamino) benzenesulfonamide. The structures of synthesized compounds were identified by elemental analysis, FT IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and Mass Spectra. Biological activities of these compounds have also been investigated. Carbonic anhydrase inhibitory activities (*in vitro*) were measured by UV-Vis spectrophotometry. These data were then correlated with various physical properties of the sulfonamides including solubility of the compounds in water and partition coefficient. The synthesized compounds were found to be more potent inhibitor than acetazolamide and sulfanilamide.

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

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının seçimi, planlanma ve yürütülmesinde, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsünden yararlandığım, ve beni sabırla dinleyen, maddi ve manevi konuda şüphesiz yardımda bulunan değerli hocam sayın **Yrd.Doç.Dr. Hasan TÜRKMEN**' e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tezimin hazırlanması sırasında bana gerek bilgi, gerekse maddi-manevi her konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Ömer ŞAHİN' e, Bölüm başkanımız Doç.Dr. Eşref TAŞ'a, Yrd. Doç. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ' ye, Arkadaşlarım Arş.Gör. Nasrettin GENLİ, Arş. Gör. Ahmet KILIÇ, Biyolojik çalışmalar sırasında yardımcı olan Biyoloji Bölümünden Arş. Gör. Zülfü YILDIZ'a ve adını yazamadığım Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Elemanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmamız da başta bazı spektroskopik ölçümler olmak üzere her konuda bize yardımlarını esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Nurettin YAYLI' ya ve Biyolojik Aktivitelerinin ölçülmesin de yardımcı olan Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya anabilim dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Özcan EREL' e teşekkür ederim.

Ayrıca bize bu çalışmamız da maddi olarak destekte bulunan HÜBAK' a teşekkür ederim. Ayrıca bugüne kadar hep yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme özellikle **Emin ağabeyime** ve sevdiklerime teşekkürlerimi sunuyor, bu çalışmayı onlara ithaf ediyorum.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Gözün yapısı.....	4
Şekil 2.2. Gözün yapısı.....	5
Şekil 2.3. Karbonik anhidraz enziminin aktif kısmının sulu çözeltide uygun geometrik şekli.....	15
Şekil 2.4. Karbonik anhidraz enziminin aktif yeri.....	15
Şekil 2.5. İnsanda bulunan karbonik anhidraz KA(II) enziminin polipeptit yapısı. Burada Zn <sup>+2</sup> iyonu, içi dolu olan siyah daire şeklinde gösterilmektedir.....	16
Şekil 2.6. Gözde iyon transferleri.....	17
Şekil 2.7. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması.....	19
Şekil 2.8. Karbonik anhidraz enziminin katalitik reaksiyon adımları.....	20
Şekil 2.9. İnsanda ki KA(I) ve KA(II)' ye asetazolamit' in bağlanmasının X-Ray cihazı ile şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.10. Karbonik anhidraz enziminin aktif kısmının MTS [(4S-trans)-4-(methylamino)-5,6-dihydro-6-methyl-4H-thieno (2,3-B) thiopyran-2-sulfonamide-7,7-dioxide] ile inhibe edilmesi.....	24
Şekil 3.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in sentezi.....	35
Şekil 3.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un sentezi .....	36
Şekil 3.3. 4-(3-morfolinopropanoil amino) benzensülfonamit (10)' un sentezi .....	37
Şekil 3.4. 4-(3-pirolidinopropanoil amino) benzensülfonamit (11)' un sentezi .....	38
Şekil 3.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12)' un sentezi .....	39
Şekil 4.1. p-Nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre blank, sülfanilamit ve asetazolamit varlığında absorbands değişimi .....	56
Şekil 4.2. p-Nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 9 numaralı bileşik varlığında absorbands değişimi.....	57
Şekil 4.3. p-Nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 10 numaralı bileşik varlığında absorbands değişimi.....	57
Şekil 4.4. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 11 numaralı bileşik varlığında absorbands değişimi.....	58
Şekil 4.5. p-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 12 numaralı bileşik varlığında absorbands değişimi.....	58
Şekil 4.6. İnhibitör aktivitesi ve bölme katsayısı arasındaki ilişki.....	60
Şekil 4.7. İnhibitör aktivitesi ve sudaki çözünürlük arasındaki ilişki.....	61
Ek Şekil 1.1. Sülfanilamit' in KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu.....	68
Ek Şekil 1.2. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu.....	68
Ek Şekil 1.3. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu.....	69
Ek Şekil 1.4. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)' un KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu.....	69
Ek Şekil 1.5. 4-(3-pirolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11)' in KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu.....	70
Ek Şekil 1.6. 4-(3-metilpiperidinopropanoil amino) benzensülfonamit (12)' nin KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu .....	70
Ek Şekil 2.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	71
Ek Şekil 2.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	71
Ek Şekil 2.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)' un (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	72
Ek Şekil 2.4. 4-(3-pirolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11)' in (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	72
Ek Şekil 2.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12)' nin (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	73



	Sayfa No
Ek Şekil 3.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	74
Ek Şekil 3.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	74
Ek Şekil 3.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)' un (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	75
Ek Şekil 3.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11)' in (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	75
Ek Şekil 3.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12)' nin (CDCl <sub>3</sub> /DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup> C-NMR spektrumu.....	76
Ek Şekil 4.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in kütle spektrumu.....	77
Ek Şekil 4.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un kütle spektrumu..	77
Ek Şekil 4.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)' un kütle spektrumu.....	78
Ek Şekil 4.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11)' in kütle spektrumu.....	78
Ek Şekil 4.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12)' nin kütle spektrumu.....	79



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Sentezlenen sülfanilamid türevlerinin kapalı formülleri, molekül ağırlıkları (M. A. ), erime noktaları (E.N.), verimleri ve elementel analiz sonuçları.....	54
Çizelge 4.2. Sülfonamid türevlerinin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayıları ve inhibitör aktiviteleri (IC <sub>50</sub> ) sonuçları.....	59

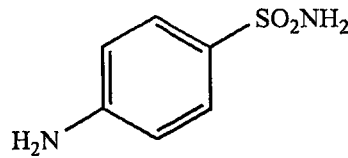


## SİMGELER DİZİNİ

AAG	Açık Açılı Glokom
CAE	Carbonic Anhydrase Enzyme
CAİ	Carbonic Anhydrase Inhibitors
DCM	Diklorometan
GİB	Göz İçi Basıncı
IC <sub>50</sub>	Enzimin %50' sini İnhibe Eden İnhibitörün Molar Konsantrasyonu
IR	İnfraret Spektroskopisi
KA	Karbonik Anhidraz
KAE	Karbonik Anhidraz Enzimi
KAI	Karbonik Anhidraz İnhibitörü
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NTG	Normal Tansiyon Glokomu
OH	Oküler Hipertansiyon
PAAG	Primer Açık Açılı Glokom
PABA	p-Amino Benzoik Asit
PKAG	Primer Kapalı Açılı Glokom
TEA	Trietilamin
THF	Tetrahidrofuran

## 1. GİRİŞ

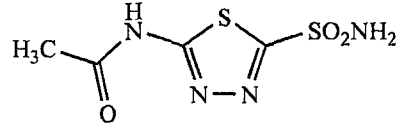
Göz hastalıkları içinde körlüğe en fazla glokom neden olur (% 15-20). Genellikle yüksek göz tansiyonunun neden olduğu glokom hastalığı halen sanayi toplumlarında en önde gelen körlük nedenlerinden biridir. Şu anda dünya üzerinde yaklaşık olarak 67 milyon insan da bu hastalığın mevcut olduğu tahmin edilmektedir (Quigley, 1996). Hasta sayısına bakıldığında (yaklaşık Türkiye nüfusu) hastalığın boyutu ve tehlikesi daha iyi anlaşılacaktır. ABD' de körlerin %10-11 bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir (Liesegang, 1996). 1977`de bu hastalık için 440 milyon dolar harcanmış ve ayrıca işyerlerinde 1.9 milyar dolar kadar da zarar tespit edilmiştir. 1978 yılında yapılan bir araştırmaya göre Amerika da bir milyondan fazla glokom hastası vardır. Glokom halk sağlığı için önemli bir sorun olup tedavi yöntemlerinin bir an önce bulunması gereken bir hastalıktır. Baylara nazaran bayanlarda daha sık görülmektedir. ABD `de her yıl yaklaşık 2 milyon insan bu hastalıktan dolayı göz kliniklerine baş vurmaktadır ve şu anda hala etkin bir tedavi yöntemi ve ilacı bulunamamıştır (Quigley, 1996). Bulunan ve uygulanan tedavi yöntemleri daha çok erken teşhise yöneliktir. Diğer durumlarda kullanılan ilaçlar ise çoğunlukla topikal (damla) olmadığından ve yan etkisi fazla olduğundan sadece acil durumlarda kullanılmaktadır. Bulunan topikal ilaçlar da halen kullanılmakta olup glokom tedavisi için kesin bir çözüm bulunamamıştır. Mann ve Keilin (1940), glokom tedavisi için ilk karbonik anhidraz inhibitörü olan Sülfanilamid (1) bileşiğini sentezlediler.



(1)

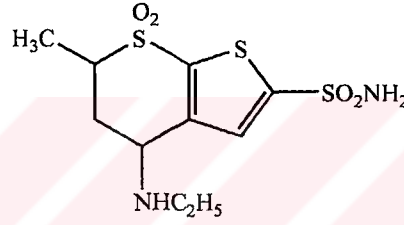
Glokom tedavisi için gözdeki basıncın düşürülmesi için 1956 yılından beri sulfonamidler kullanıldı (Maren, 1987). Başlangıçta diüretik olarak kullanılan oral Karbonik Anhidraz İnhibitörleri` nin Göz İçi Basıncını da azalttığı ilk kez 1954

yılında Becker tarafından bildirilmiştir. Yine aynı yıl glokom tedavisi için karbonik anhidraz inhibitörü olan Asetozolamit (Acetazolamide) (2) sentezlenmiş olup ve halen glokom tedavisi için tablet olarak kullanılmaktadır (Becker,1954).



(2)

İlk topikal karbonik anhidraz inhibitör olan Dorzolamit (3) 1995 yılında Maren tarafından sentezlenmiştir (Maren, 1995).



(3)

Ayrıca bu konu ile ilgili İngiltere'de çalışmalar yapılmış ve şu anda kullanılmakta olan ilaçlardan biyolojik aktivitesi yaklaşık on kat daha iyi olan ilaçlar sentezlenmiştir (Türkmen, 1998). Bu ilaçların *invivo* ve *in-vitro* çalışmaları yapılmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak bugüne kadar yapılan çalışmalardan bazıları kaynaklar kısmında belirtilmiştir (Maren, 1995; Türkmen, 1998; Supuran ve Scozzafava, 2000; Maren, 1967; Sugrue, 2000; Chen ve ark., 2000; Scozzafava ve ark., 1999).

Sentezlenecek bileşiklerin beklenen özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Enzimlere karşı yüksek aktivitede olması,
2. Yağ içindeki çözünürlüğünün istenilen seviyede olması,
3. Su ve yağ' da ki çözünürlüklerin dengede olması,
4. Sudaki çözünürlüğünün en az % 3g/ml seviyesinde olması,
5. Göze uyumlu olması,
6. Yan tesirinin olmaması en azından minimum seviyede olması,
7. Topikal (damla) olması.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

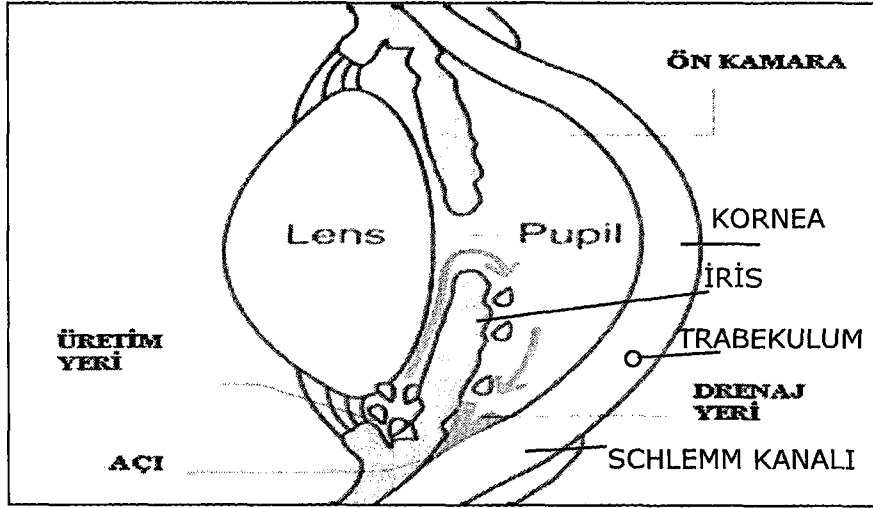
### 2.1. Gözün Yapısı ve Glokom

#### 2.1.1. Gözün yapısı

Glokomun nasıl oluştuğunu anlamak için önce gözün yapısını biraz tanımak gerekir (Şekil 2.1, 2.2). Gözün çevresi sklera denen beyaz, dayanıklı bir zarla çevrilidir. Işık, gözün ön kısmındaki saydam kornea tabakasından gözün içine girer. Bu kornea tabakasının arkasındaki göze rengini veren iris tabakası, otomatik olarak açılıp kapanarak, gözün içine giren ışık miktarını ayarlar. İrisin arkasındaki göz merceği ışığın gözün arka duvarındaki retina tabakasında fokus yapmasını sağlar. Retina tabakasındaki sinir liflerinin bir araya gelmesinden oluşan görme siniri (optik sinir), gözün devamı olarak beyine ulaşır. Göz siniri, retina tabakasının algıladığı görüntüleri, tanımak üzere beyine ulaştırır (Gregory, 1990).

Gözün ön bölümleri saydam göz içi sıvısı (humör aköz) ile doludur. Bu sıvı (humör aköz), aktif metabolik bir olay sonucu iris kökündeki korpus siliyarede salgılanır, burada yapılan humör aköz arka kamaraya gelir, pupilla açıklığından ön kamaraya geçer. ve kornea-iris arasındaki açıdan çıkarak, toplardamar sistemine karışır (Şekil 2.1, 2.2). Göz sıvısının bu oluşumu ve dışarı akışı aktif ve devamlı bir süreçtir ve göz sağlığı için bu oluşum ve dışarı akış denge halinde olmalıdır. Bu göz içi sıvısı ile bildiğimiz göz yaşı arasında hiçbir ilişki yoktur. Göz içi sıvısı yine gözdeki toplardamar sistemine akar, göz dışı ile bir bağlantısı yoktur. Gözün içindeki basınç (göz içi basıncı) gözün içindeki sıvı miktarına bağlıdır (Andaç, 1998).





Şekil 2.2. Gözün yapısı

### 2.1.2. Glokom

Glokom, göz içi basıncının yükselmesi nedeniyle görme sinirinin giderek zayıflamasına ve buna bağlı olarak fonksiyonel bozuklukların ve tahribatın ortaya çıkmasına ve böylece görme kaybına yol açan ciddi bir hastalıktır. Diğer bir deyişle papillada çukurlaşma ve atrofi (organların beslenme bozuklukları veya fonksiyon eksikliği sebebiyle hücrelerin hacminin veya sayısının azalması sonucu küçülmesi) ile görme alanında değişikliklere yol açan bir "optik nöropatidir" (Andaç, 1998; Shields, 1987; Maren ve ark., 1983; Bengisu, 1990; Hitching; 1978).

### 2.1.3. Göz içi basıncı ve glokom oluşumu

Ön ve arka kamarayı dolduran kamaralar sıvısının kornea ve skleraya yaptığı basınca, göz içi basıncı denir. Bu basınç normalde 20-21 mmHg arasındadır. Kamaralar sıvısı korpus siliyarede üretildikten sonra %80'i, iridokornean açıdaki trabeküler yoldan ve Schlemm kanalından, %20'si de uveoskleral yoldan gözü terkeder. Göz içi basıncı arttıkça hasar gelişim riski de artar (Shields, 1987).

Kamaralar sıvısının üretim debisi ve dış akıma karşı olan dirençler, göz içi basıncını etkiler (Goldmann formülü):

$$P = F \times R + P_v \quad (2.1)$$



$P$ : göz içi basıncı,  $F$ : kamaralar sıvısı üretim debisi,  $R$ : kamaralar sıvısı dışa akımdaki direnç,  $P_v$ : episkleral venalar basıncı.

Günümüzde, trabeküler ve uveoskleral dışa akımların ayrı ayrı yer aldıkları formül, Goldmann formülünün yerini almıştır.

$$P = \frac{F \cdot Uve.Skl}{T} + P_v \quad (2.2)$$

$Uve. Skl$  : uveoskleral dışa akım kolaylığı,  $T$ : trabeküler dışa akım kolaylığı.

Glokom çoğunlukla, göz içi basıncının yükselmesi sonucu oluşmaktadır. Yukarıda bahsettiğimiz sıvı sistemi doğru çalışmamaktadır. Bir dengesizlik oluşmuştur. Siliyer cisim, normalde olduğu gibi sürekli göz içi sıvısı oluşturmaktadır, ancak sıvının çıkış yollarında tıkanıklıklar oluşmuştur. Bir başka deyişle; musluk sürekli açıktır, ancak lavaboda tıkanıklık vardır. Mutfakta bu durum, suyun taşmasıyla sonuçlanacaktır, göz içinde ise, bu fazla sıvının kaçacağı bir yer olmadığı için fazla sıvı ile orantılı olarak gözün içindeki basınç yükselecektir. Bu yüksek göz içi basıncı yavaş yavaş göz sinirinde harabiyete neden olabilir. Göz sinirini, görüntüleri beyine taşıyan bir kabloya benzetirsek, bu kablonun zarar görmesi görüntülerde, yani görmemizde bozukluğa, ileriki aşamada körlüğe neden olacaktır (Andaç, 1998; Shields, 1987; Maren ve ark., 1983; Bengisu, 1990; Hitching; 1978).

#### 2.1.4. Glokomun sınıflandırılması

I-Primer (Birincil) glokom

a-Açık Açılı Glokom

b-Kapalı Açılı Glokom

II-Konjenital Glokom

III-Sekonder (İkincil) Glokom

### 2.1.4.1 Primer glokom

Humör aközün yapımı, gözdeki sirkülasyonu ve gözü terk etmesindeki patoloji sonucu ortaya çıkan göz içi basıncı (GİB) artmasına bağlıdır. Humör aköz, aktif metabolik bir olay sonucu korpus siliyarede yapılır. Bu formasyonda siliyer kapillerlerdeki kan basıncı düzeyinin, plazma onkotik basıncının rolü vardır. Burada yapılan humör aköz arka kamaraya gelir, pupilla açıklığından ön kamaraya geçer, ön kamarayı oluşturup ön kamara açısına (iridokorneal açı) gelir (Andaç, 1998; Bengisu, 1990).

Humör aközün % 80'i açıda trabekülüm yolu ile Schlemm kanalı'na, buradan da aköz venler ile venöz dolaşıma katılır. % 20 oranında ise dışa akım uveo-skleral yol ile olur, koroidea, sklera ve korpus siliyaredeki venöz dolaşım ile suprakoroideal aralığa geçer (Andaç, 1998; Bengisu, 1990).

#### a) Primer açık açılı glokom

Göz Tansiyonunun % 90'ı *Açık Açılı Glokom*'dur ( AAG ) ve çok sinsi bir hastalıktır! Yani;

- AAG'li bir göz dışarıdan tamamıyla normal görünür
- AAG' li bir gözün anlaşılabilmesi için mutlaka Göz Tansiyonu' nun ölçülmesi gerekir

Bu tür glokomda, ya korpus siliyarede salgılanan göz içi sıvısının (humör aközün) yapımında fazlalık ya da dışa akımında bir direnç söz konusudur. Dış akıma olan bu direnç de ya trabekulumda, "Schlemm Kanalı"na geçiştir veya trabekülüm fonksiyoneldir, yada toplardamar sistemine geçişte bir direnç vardır. Yani iris-kornea açısında yavaş ilerleyen bir tıkanıklık söz konusudur, göz içi sıvısının dışarı akışına karşı direnç artmıştır. Fakat ön kamara açısı daima geniş ve açıktır (Andaç, 1998; Bengisu, 1990).

#### ***Kimler Risk Altında?***

1. 45 yaşın üstünde olup, düzenli olarak doktora gitmeyenler,
2. Stres altındakiler,

3. Şeker Hastaları,
4. Hipertansiyon Hastaları,
5. Ailesinde Glokom hastası olan kişiler,
6. Sigara kullananlar,
7. Miyop Hastaları (özellikle 3.00 D. nin üzerinde olanlar),
8. Düzenli şekilde kortizon türevi hormon kullananlar,
9. Gözüne darbe almış kişiler,
10. Siyah ırktan olanlar.

### **b) Primer kapalı açılı glokom (Akut açi kapanması glokom)**

Gözün içindeki korpus siliyarede salgılanan göz içi sıvısının (humör aközün) dışı akımının ani olarak tıkanması ile birlikte, göz içi basıncının ani olarak sıklıkla tek taraflı olarak artması, ağrı ve ağır görme kaybıyla ortaya çıkan ve ön kamara açısının kapalı olmasına bağlı olarak ortaya çıkan bir glokom türüdür. Açık kapalı olduğu için humör aközün, mekanik bir blokaj sonucu dışı akımı zorlaşmaktadır. Göz içi basıncında ani ve aşırı yükselme olur (Andaç, 1998; Bengisu, 1990).

**Semptonlar ve Belirtiler;** Prodromal devredeki belirtiler geçici görme keskinliğinin düşmesi, baş ve gözdeki ağrı ve ışıkların çevresindeki renkli hâlelerdir. Akut krizi ani görme kaybı, gözde zonklayıcı tarzda ve sinirin duyu lifleri dağılım bölgesine doğru dağılan ani bir ağrı ile ortaya çıkar. Bulantı ve kusma sıklıkla beraber görülür ve hastaya gastrointestinal hastalık olarak yanlış tanı konulabilir. Üst göz kapağında ödem, göz yaşarması, kornea çevresindeki kızarıklık, göz küresini saran konjunktivada kızarıklık, bir ölçüde genişler ve hareketsiz bir gözbebeği bulunur. Kornea bulanıktır, ön kamara dar ve humör aköz bulanıklık nedeniyle göz dibi görülmez. Göz içi basıncı oldukça yüksektir. Belirtiler tıbbi tedaviden sonra kaybolur fakat tekrar ortaya çıkabilir. Her ani krizde görme azalması ilerlemekte ve görme alanı daralmaktadır. Durum her iki gözde de olabilir (Andaç, 1998; Shields, 1986; Maren ve ark., 1983; Bengisu, 1990; Hitching; 1978).

### 2.1.4.2. Konjenital glokom

Doğuştan ortaya çıkan bir glokom türüdür. En sık neden ön kamara açısında mezodermal doku kalıntısıdır. Sıklıkla intrauterin hayatta olay sonlanmış olup bebekler görme hissine sahip değildirler. Konjenital glokom iki gözde birden görülür, tek gözde görülmesi enderdir. Yeni doğan bebeklerde tek gözde görüldüğünde, konjenital bebeklik çağı tümörlerinden ayırıcı tanı gerektirir. Ön kamara açısındaki rudimente olmayan mezodermal doku çok yoğun değilse, klinik tablo postpartum ortaya çıkar, fakat daima ilk 6 ay içinde semptom ve bulgu verir (Andaç, 1998; Bengisu, 1990; Hitching, 1978).

En erken belirtisi fotofobi (ışık fobisi) dir. Daha sonra yavaş yavaş göz büyümeye başlar. Bebekte 10-10.5 mm olan kornea çapı 12-14 mm'ye kadar ulaşır. Buna '*buftalmus*' denir. Olayın intrauterin hayatta sonlandığı durumlarda, buftalmus doğumda belirgindir. Erişkin glokomunda yüksek GİB, gözde en zayıf bölge olan optik disk ve çevresini area kribrozayı çöktürmektedir. Bebekte ise göz bütünü ile zayıf olduğundan büyümektedir, lens bu büyümeye katılamaz, bu halde iris diaframı sallanır, buna '*iridodonesis*' denir. Ön kamara derinliği normalden geniştir. GİB yüksek olduğundan humör aköz kornea lamelleri arasına sızar, kornea ödemeine yol açar (Andaç, 1998; Bengisu, 1990; Hitching, 1978).

#### **Belirtileri**

1. İri gözlü,
2. Gözün ön kısmı gri renkli olan,
3. Gözleri kırmızı ve yaşlı olan,
4. Işıktan rahatsız olan,
5. Göz bebekleri hızla büyüyen,
6. Az yemek yiyen,
7. Huzursuz ve sürekli ağlayan çocuklar.

### 2.1.4.3. Sekonder glokom

Sekonder glokom'da, gözde göz içi basıncının yükselmesine neden olan bir hastalık vardır. Bu, değişik nedenlerle oluşan göz içi kanamaları, göz içi iltihapları,

şeker hastalığı, göze gelen darbeler (travma), ileri dönemdeki katarakt gibi çok değişik sebeplerle olabilir. Gözdeki geçmişte oluşmuş bir yaralanma, iltihabi göz hastalıkları, kortizon tedavisi, şeker hastalığının göz tahribatı gibi çeşitli durumlar da göz içi basıncının yükselmesine ve glokoma neden olabilirler (Andaç, 1998; Shields, 1987; Bengisu, 1990).

### 2.1.5. Tedavi

Glokom hastalarında tedavi yaklaşımları ve bu konudaki araştırmalar üç noktada yoğunlaşmaktadır;

- 1- Göz iç basıncının düşürülmesi,
- 2- Oküler kan akımı bozukluklarının düzeltilmesi,
- 3- Nöron korunması,

Oküler kan akımının düzeltilmesi ve nöron korunmasına yönelik çalışmalar yoğun şekilde devam etmekte ancak henüz bu konularda net bir tedavi yaklaşımı belirlenmiş değil. Güncel tedavi yaklaşımları göz iç basıncını düşürmek yönündedir.

Göz içi basıncını belirleyen üç temel olay söz konusudur;

- a) Siliyer cisimden hümeör aköz üretim hızı,
- b) Trabeküler ağ ve schlemm kanalından hümeör aköz' ün dışı akımına karşı olan direnç,
- c) Episkleral damarlarda basınç düzeyi

Göz içi basıncını azaltmak için iki yol vardır.

- Hümeör aköz üretim hızını azaltmak,
- Hümeör aköz dışı akımını artırmak.

Tıbbi tedavide kullanılan ilaçlar bu iki şekilde göz içi basıncı düşürmektedir. Aşağıdaki yüksek risk durumlarından en az biri mevcutsa bu hastalarda da tedaviye derhal başlamak gerekmektedir (Bengisu, 1990).

**2.1.6. Glokomda risk faktörleri**

1. Belirgin derecede yüksek göz içi basıncı,
2. Pozitif aile öyküsü,
3. Miyopi,
4. Diabetes mellitus ( Şeker hastalığı),
5. Kardiovasküler hastalık,
6. Irk (Zenciler yüksek risk grubunda),
7. Asimetrik optik disk çanaklaşması,
8. Optik diskte çanaklaşmanın büyük olması,
9. Erken nonspesifik görme alanı değişiklikleri.

Tedavi yaklaşımlarında en az yan etki oluşturacak hasta için en az riskli ilaçlar seçmeye dikkat edilmelidir. Ayrıca seçilen ilacın fayda ve zarar oranını iyi hesaplanmalıdır. Örneğin görme alanında ve optik sinirde belirgin bir zarar saptanan hastada sistematik karbonik anhidraz inhibitörlerini kullanmak yerindeyken, görme alanı kaybı ve optik diskte çanaklaşmanın henüz tam gelişmediği bir hastaya bu ilaçların verilmesi durumunda hasta yan etkiler açısından oldukça riskli konuma düşmektedir (Orağlı, 2001).

Kronik bir hastalık olan glokomda tedavide başarılı olmak için hasta uyumu çok önemlidir. Aşağıda sayacağımız bazı özellikler hasta uyumunun kötü olmasına zemin hazırlamaktadır (Orağlı, 2001).

1. Asemptomatik (belirtisiz) bir hastalıktır. Bu nedenle hasta rahatlıkla tedaviyi inkar edebilir,
2. Kronik bir hastalıktır. Uzun süre tedavi gerektirir,
3. Çoğu olguda birkaç ilacın bir arada kullanılması gerekir,
4. Glokom ilaçları pahalıdır,

5. İlaçların uygulanması zahmetlidir,
6. Tedavinin yararı hasta tarafından açıkça fark edilmiyor,
7. İlaçların mevcut sistematik ve lokal yan etkileri,
8. Tedavi yaklaşımları hastanın uyumunu artıracak yönde olmalıdır.

Tedavide hedef göz içi basıncını optik sinirin daha fazla hasar görmesini engelleyecek düzeye indirmektir. Yakın zamana kadar hedeflenen göz içi basıncı değeri 21 mmHg. idi. Ancak günümüzde bu geçerli değildir. Hedeflenen göz içi basıncı değeri her hasta için bireyselleştirilmelidir. Hastada glokoma bağlı harabiyet ne kadar fazlaysa göz içi basıncını o kadar düşük tutmaya çalışmalıyız. Örneğin çok ileri düzeyde zarar görmüş optik diski olan bir hastada göz içi basıncı 15 mmHg' nin üzerinde olmamalıdır (Andaç, 1998; Shields, 1987; Bengisu, 1990).

#### 2.1.7. Göz içi basıncı (GİB)

Geleneksel anlayışa göre yükselmiş GİB hastalığının esasını oluşturmaktadır. Ancak şu anki bilgilerimize göre GİB glokom da hasara sebep olan tek faktör değil fakat bilinen en önemli risk faktörüdür ve şuan ki bilgilerimiz dahilinde de tedavi edilebilir tek faktördür. Bazı çalışmalar GİB'nin düşürülmesiyle görme alanı kaybı ilerleme hızının azaldığını gösterirken, diğer bazı araştırmalarda ise GİB önemli derecede azaltılsa bile glokomatöz optik nöropatinin (sessizce) ilerlemeye devam ettiği gözlenmiştir (Orağlı, 2001). Bu bağlamda 2 ayrı klinik ayrımının da çok iyi bilinmesi gerekir.

1. Açık açı yüksek GİB normal disk ve normal görme alanı ile karakterize oküler hipertansiyon (OH).
2. Açık açılı normal kabul edilen sınırlar içinde GİB, fakat tipik disk ve görme alanı değişiklikleri ile karakterize normal tansiyonlu glokom (NTG). Bu önemli risk faktörü de bazı değişkenlikler gösterir. GİB 40 yaşına kadar ırk gözetmeksizin sabit iken 40 yaşından sonra ırka bağlı olarak artar (siyah ırk) veya azalır (Japonlar), ancak kadınlarda daha yüksek değerlerdedir. Çok

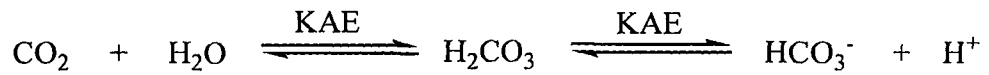
daha yaşlılarda düşme eğilimindedir ve birçok çalışmada erkeklerde daha belirgin olduğu bulunmuştur.

3. 3-6 mmHg'lık diüretik varyasyon normal kabul görürken 10 mmHg' nin üstü patolojik kabul edilmektedir. Ayrıca sabahları daha yüksek, öğleden sonra düşme gösterir.
4. Mevsimsel farklılık olarak yazın daha düşük, kışın daha yüksek değerler bildirilmiştir.
5. Postural değişiklikler de farklılık yaratır. Yatmak veya baş aşağı olma halinde belirgin GİB yüksekliği oluşur ki bu episkleral venöz basınç artışına bağlıdır
6. Egzersiz sonrası GİB düşmektedir. Bunun kan pH düşüklüğü veya serum osmolaritesindeki artışa bağlı olduğu ileri sürülmekle birlikte tam olarak aydınlatılmamıştır. Dickerman ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada halter kaldırma sırasında GİB'nin çok yükseklere çıktığı tespit etmişlerdir (Orağlı, 2001).



## 2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

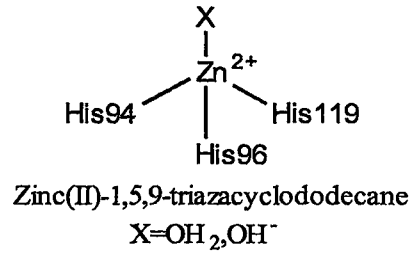
Karbonik Anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) ilk defa 1933 yılında eritrositlerde görüldü. Bu enzim CO<sub>2</sub> nin katalitik hidratasyonundan ve dehidratasyonundan sorumludur ( Maren, 1967). Ayrıca metalloenzimlerin bir üyesi olup eritrositler dahil birçok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilmiştir (Baydemir, 2000). Karbonik anhidraz Zn(II) tipi enzimlerinden en önemli bir enzimdir (Coleman, 1998). Karbonik anhidraz CO<sub>2</sub> nin hidratasyonunda çift yönlü etki yapan ve bikarbonat iyonuna dönüştüren enzimdir (Maren,1967).



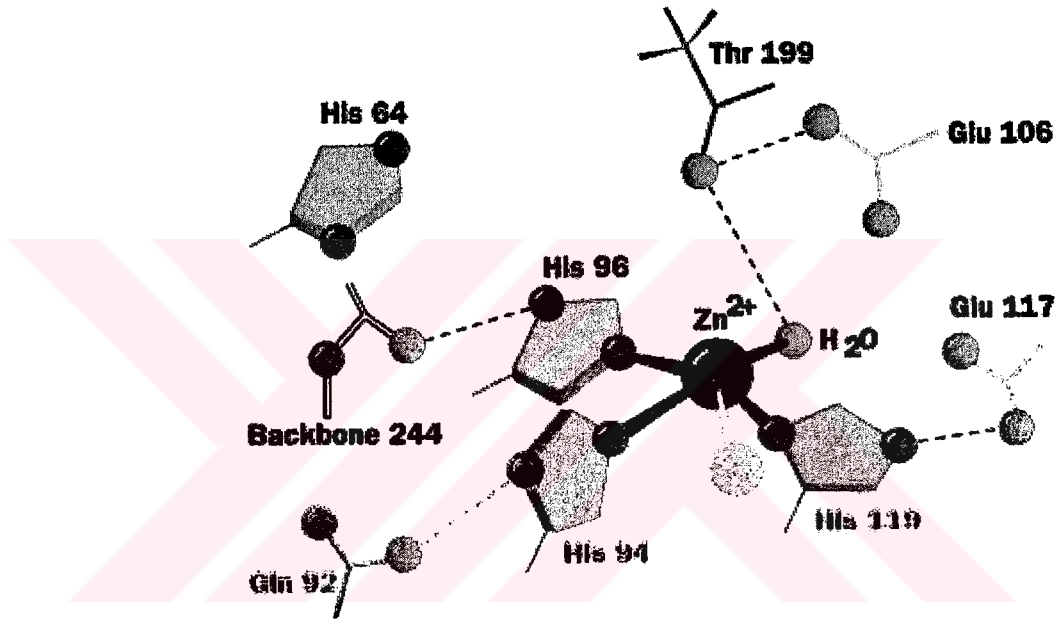
İnsanlarda içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 14 farklı karbonik anhidraz izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre belirlenmiştir (Supuran ve Scozzafava, 2001; Chegwidde ve ark., 2002)

Karbonik anhidraz enziminin etken yeri onu çevreleyen His94, His96, His119 ve su molekülüne bağlı Zn(II) dir. Karbonik anhidraz enziminin reaksiyonlarının katalizinde, Zn<sup>+2</sup> iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir H<sub>2</sub>O veya OH<sup>-</sup> iyonu ve üç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki 15 Å<sup>o</sup> derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir (Şekil 2.4).

Çinkoya bağlı H<sub>2</sub>O, Glu-106 rezidüsünün karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr-199 rezidüsünün hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su moleküllerinin nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO<sub>2</sub> molekülüne doğru hareket etmektedir (Supuran ve Scozzafava, 2001). Aşağıda Karbonik Anhidraz enziminin değişik şekilleri görülmektedir (Şekil 2.3, 2.4, 2.5).



Şekil 2.3. Karbonik anhidraz enziminin aktif kısmının sulu çözeltide uygun geometrik şekli (Kimura, 1994)



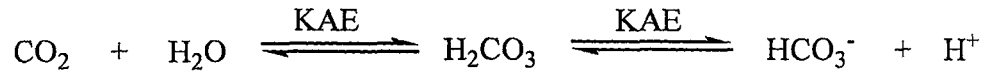
Şekil 2.4. Karbonik anhidraz enziminin aktif yeri



Şekil 2.5. İnsanda bulunan karbonik anhidraz KA(II) enziminin polipeptit yapısı. Burada Zn iyonu, içi dolu olan siyah daire şeklinde gösterilmektedir (Kraulis, 1991)

### 2.2.1. Karbonik anhidraz enziminin metabolizmadaki yeri

Karbonik anhidraz enzimi aşağıdaki reaksiyon zincirinde CO<sub>2</sub>'nin su ile birleşmesini katalize eden enzimdir (Maren, 1967).



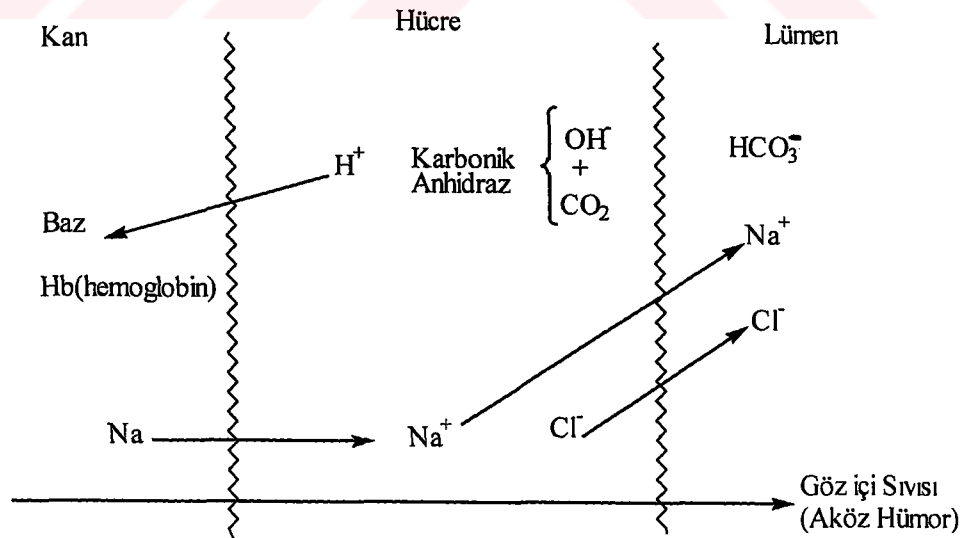
Oluşan H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> kimyaca stabil bir bileşik olmadığından tamama yakın bir kısmı iyonize olur. Bu enzim böbrek korteksinde proksimal ve distal tübül hücrelerinin ve toplayıcı tübül hücrelerinin lumene bakan kısımlarında konsantre olmuştur. Ayrıca eritrositlerde, mide mukozasında, gözde korus siliyare ve beyinde bulunur. Karbonik anhidraz çok önemli bir enzimdir. Çünkü böbreğin alkalileri tasarruf etmesini, asidi, idrar çıkarmasını ve böylece ekstraselüler sıvının asit-baz dengesinin korunmasını sağlar. Gözde korus siliyare'de hümör aközün oluşumu karbonik anhidraz enzimi tarafından sağlanır. Enzimin inhibisyonu hümör aköz salgılanmasının azalmasına neden olur. Mide de salgı hücrelerinde H<sup>+</sup> meydana gelmesi yukarıdaki reaksiyonla olmasıdır. Fakat mide salgı hücrelerindeki karbonik

anhidraz izoenzim türü, asetazolamid ve benzeri ilaçlar tarafından belirgin derecede inhibe edilemez.

Enzim,  $H^+$  ve  $HCO_3^-$  ün böbrekte, midede, kırmızı kan hücrelerinde, akciğerde pankreasta geçişini gerçekleştirir. Vücudun bazı bölgelerinde gerçekleşen bu olay göz içinde retinada, göz hücrelerinde, iristeki epitel dokularda da gerçekleşir.

Aynı proses göz içindeki korpus siliare cisminde görülmektedir. Gözdeki hücrelerden Na,  $HCO_3^-$  iyonlarıyla hümör aköza taşınır. Bu olay ozmotik basınçla olmaktadır. Ozmotik basıncın dengesini sağlamak için su molekülleri de hücrelerden hümör aköza geçerler. Bu iki bölge arasında hümör aköz tarafında üretimine dayalı yükselişten kaynaklanan dengesizlik olursa (yaklaşık  $0,2 \text{ mikrolitre min}^{-1} \text{ mmHg}$ ) göz içi basıncında (GİB) bir yükselme olmaktadır (Maren, 1967).

Bu enzimlerin işleyişi tam olarak bilinmemektedir. Hala enzimin etkisi anlaşılması güç bir hal içinde belirsizliğini korumaktadır. Sistemin basitleştirilmiş uyarlaması aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 2.6). Bu sistem beyin ve omirilikte ki sıvıda ve pankreasta gerçekleşen olaya oldukça benzemektedir (Drance ve Neufeld, 1984).



Şekil 2.6. Gözde iyon transferleri

Şekil 2.6.' da görüldüğü üzere kan, hücre ve lümende gerçekleşen olay basit bir şekilde gösterilmiştir. Burada iyonların hücre zarları arasında bir dengeden kaynaklanabilecek bir geçişleri olduğu açıkça görülmektedir. Karbonik anhidraz enzimi tarafından oluşan  $H^+$  nın bir kısmı lümene çoğu bir kısmı da kanda bulunan bazlar tarafından tutulurlar. Burada proton  $NH_3$  veya diğer asidik tamponlar tarafından bağlanırlar. Böylece ortamda amonyum ( $NH_4^+$ ) ve  $H_3PO_4$  ve benzeri protonlanmış zayıf asitler oluşturabilirler.

### 2.2.2. Karbonik anhidraz enziminin metabolizmadaki katalitik mekanizması

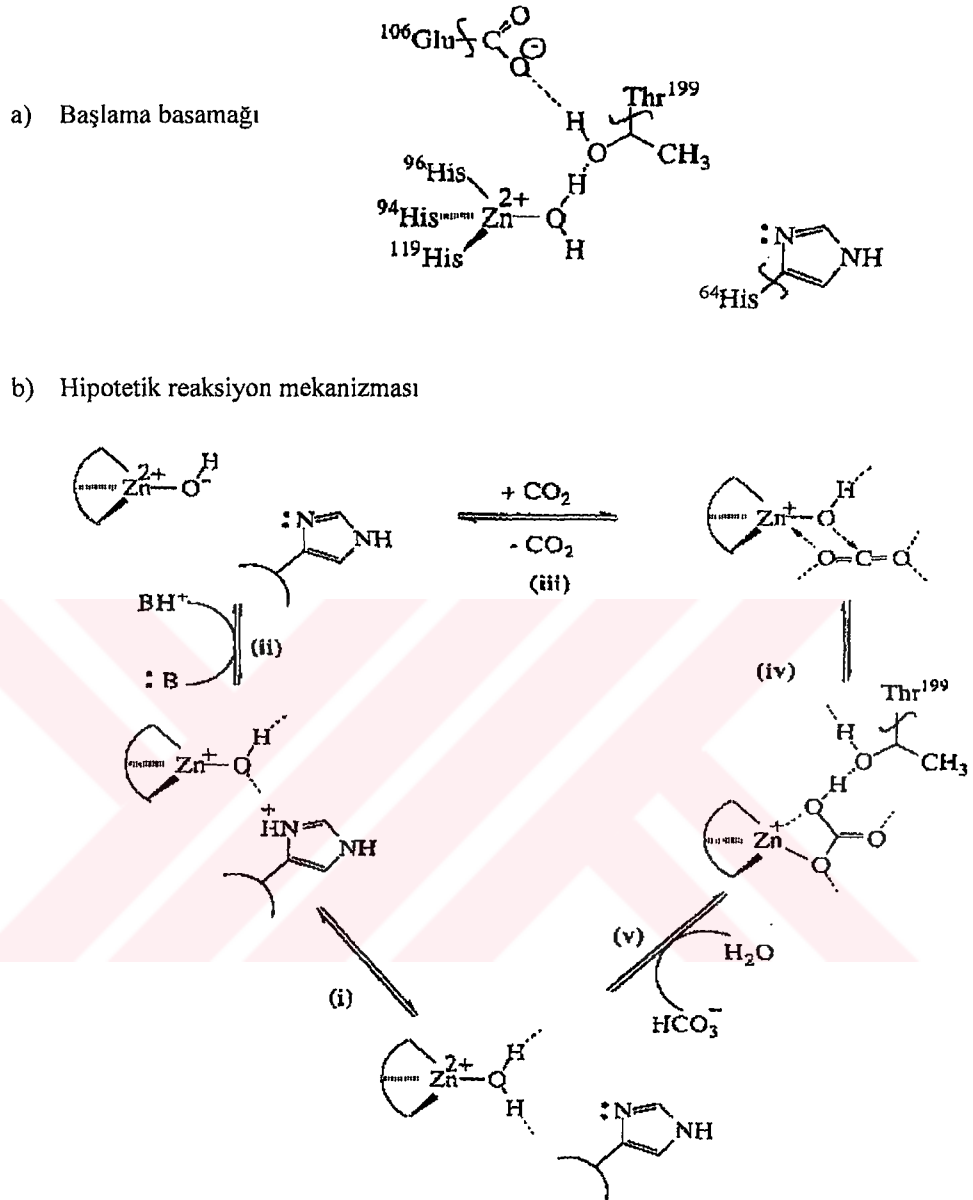
Son altmış yıldır yapılan çalışmalar sonucu, karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre, karbonik anhidraz enziminin metabolizmada son derece önemli olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özellikler sahip olduğu anlaşılmıştır. Bölgede  $Zn^{+2}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. İkinci olarak da, aktif bölge yakınındaki amino asitler, proton verici ve proton gradiyenti oluşturacak şekilde düzenlenmişlerdir (Supuran ve Scozzafava, 2001)

Karbonik Anhidraz Enziminin ilk bulunuşundan sonra onun hakkındaki bilgiler çok hızlı bir şekilde artmıştır. 1940 yılında Mann ve Keilin enzimi öküz kanından elde etmişlerdir (Mann ve Keilin, 1940). 10 litre kandan 250 mg saf protein elde edilmiştir. Enzimin aktivitesinin yukarıda bahsedildiği gibi  $Zn^{+2}$  iyonlarıyla ilgili olduğu belirtilmiştir. Her bir enzimde bir  $Zn^{+2}$  atomu vardır.

Karbonik anhidraz hidrolizleyici etkisine sahip bir enzimdir (Maren ve ark., 1983). Çinkoya bağlı  $H_2O$ , Glu-10 rezidüsünün karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr-199 rezidüsünün hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, çinko bağlı su moleküllerinin nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki  $CO_2$  molekülüne doğru hareket etmektedir (Supuran ve Scozzafava, 2001).

Karbonik anhidraz'ın hidroliz mekanizması daha detaylı olarak aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir. Karbonik anhidraz enziminde bulunan  $Zn(OH)_2$  ve  $H_2O$ 'nun

karbon  $\text{CO}_2$ 'ye nasıl etki ettiği aşağıdaki genel reaksiyon denklemleri üzerinde daha iyi anlaşılacaktır (Şekil 2.7a, b) (Briganti ve ark., 1997).

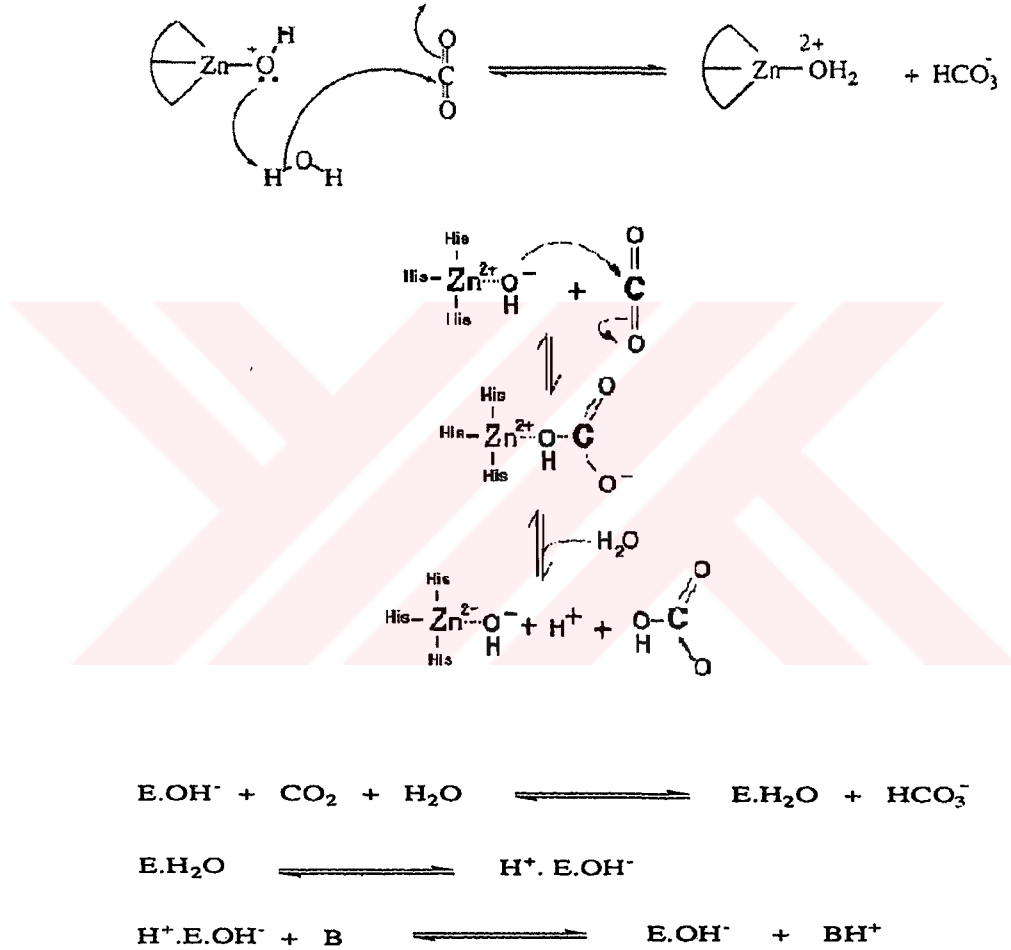


Şekil 2.7. Karbonik anhidraz enziminin katalitik mekanizması

Başlama basamağında Histidin-64 Zn'ye Su molekülü üzerinden bağlanmaktadır. Zn'ye bağlı su molekülünde bulunan bir Proton Histidin-64 proteinine geçmektedir (i). İkinci aşamada ise ortamdaki kuvvetli baz Histidin-64 de bulunan protonu koparmaktadır (ii). Oluşan  $\text{Zn}(\text{OH})^-$  (hidroksit ligandı)  $\text{CO}_2$ 'ye çok hızlı etki eder ve geçiş halini oluşturur (iii). Bu geçiş halinden sonra ürün kompleksi

oluşur (iv). Son olarak ürün kompleksinde bulunan  $\text{HCO}_3^-$  su ile çok hızlı bir şekilde yer değiştirir(v). Bu olay metabolizmada devamlı olmaktadır.

Yukarıda açıklamaya çalıştığımız karbonik anhidraz'ın katalitik reaksiyon mekanizması birkaç reaksiyon adımları üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.8) (Pocker ve Stone, 1967).



Şekil 2.8. Karbonik anhidraz enziminin katalitik reaksiyon adımları. E:enzim,  $\text{H}^+ \cdot \text{E}$ : enzimin protonlanmış şekli, B ve  $\text{BH}^+$  bazik tampon

### 2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

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

Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri, aromatik ve heteroaromatik sülfonamitlerdir. Sülfonamitler kimyasal R-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> yapısına sahiptir. Burada R, genellikle aromatik ve heteroaromatik halka sistemidir. Sülfonamitlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi,



Denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanırlardır. Bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamitler içerdikleri bu hidrofilik bölgeye ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere de sahiptirler. Sülfonamitlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO<sub>2</sub>NH<sup>-</sup> bileşiğindeki N atomunun karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn<sup>+2</sup> ile iyonik bir bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur (Maren, 1987; Arslan, 2001)

#### 2.3.1. Sülfonamitler

Sülfonamitler, bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde sistematik olarak kullanılmış ilk etkin kemoteropitiktir. Penisilin'in tedaviye girmesinden önce bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılabilecek en önemli ve en popüler ilaçları teşkil ediyorlardı. Bakterisit ve daha güçlü olan penisilinlerin ve daha sonra bir çok antibiyotiğin tedavi alanına girmesi ve bakterilerde sülfonamitlere zamanla direnç gelişmesi sonucu önemleri ve kullanılış yerleri zamanla azalmıştır.



Sülfanilamit yada para-amino benzensülfonamit tanınmış ilk sulfa ilacıdır. Organik bileşiklerin mikroorganizmalar için özel toksik özelliğe sahip olabileceği düşünülmüştür. Çünkü bu bileşikler bazı bakterileri boyamada kullanılan maddelerle özel bir benzerliğe sahip bulunan kemoterapi ilaçlarının en iyilerindendi. Bir çok laboratuvar bu düşünce üzerinde yoğunlaştı ve yüzlerce deney yapıldı. Özellikle yüksek antimikrobial aktiviteye sahip olan bileşik Prontosildi. 1930 ortalarında hemen hemen doğudaki tıp araştırma enstitülerinde sülf ilaçları ile ilgili çalışmalar hızla devam ediyordu. Aşağı yukarı 6000 tür sülfanilamit türevidi hazırlandı düşük toksik ve yüksek antimikrobial aktivite dengesine uygun olan ilaçlar bulundu. Bununla birlikte bu sülf ilaçlarının hem tüberküloz, cüzam ve sıtma ya karşı hemde gangren ve strep enfeksiyonlara karşı da antibakteriyal aktiviteye sahip geniş bir alanı vardı. Bu bileşiklerin etkileri II. Dünya savaşında savaş alanında test edildi. Ve açık yaralara bolca “sülf tozları” nı serpiydi. Kesin olarak enfeksiyonları önleyici yönü ile birçok yaşamı kurtardı. Sülf ilaçları kullanım alanı geniş olan antibiyotik grubu arasındadır. Hala veteriner biliminde geniş hayvan grupları üzerinde kullanılmaktadır (Carey, 2003).

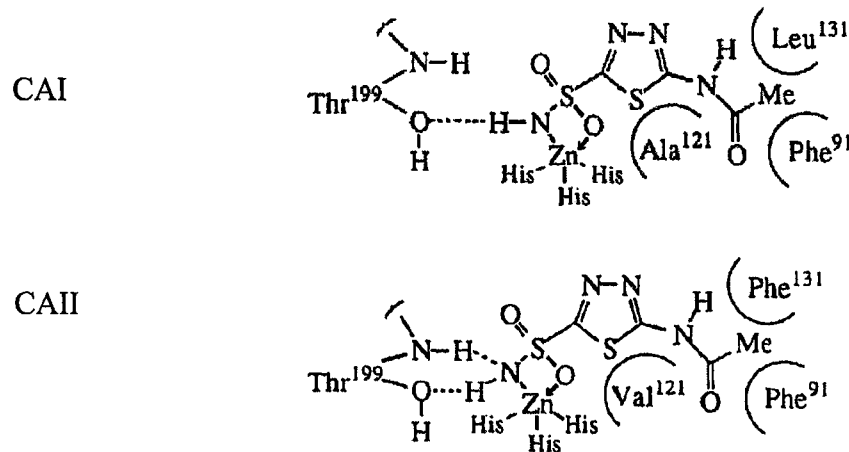
Sülfonamitler insanlarda glokom gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte bazı türevlerinin bir çok tümör hücresinin büyümesini engelleyen güçlü inhibitörler olduğu belirlenmiştir (Sugrue, 2000; Supuran ve Scozzafava, 2000). Sülfonamitler’in metabolizmada birçok etkileri mevcuttur. Gelişen teknoloji ve yapılan çalışmalar ile bu önemli gelişimler ortaya çıkmaktadır. Bizim burada üzerinde çalışma yaptığımız konu glokom tedavisi için kullanılan ve karbonik anhidraz enzimine karşı inhibitör olan sülfonamit grubu taşıyan yeni bileşiklerin sentezlemek ve bu bileşiklerin in vitro biyolojik aktiviteleri ( $IC_{50}$ )’ ni incelemektir.

### 2.3.2. Karbonik anhidraz inhibitörleri olan sülfonamitlerin etki mekanizması

Sülfonamitlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması konusundaki teorik bir çalışmada, ilk olarak  $Zn^{+2}$  tek başına düşünüldüğü zaman, metal iyonuna azot ve oksijen atomlarından koordine olduğu belirlenmiştir. İkinci olarak bu bağlanmaya aktif bölgede bulunan tirozin (Thr-199)’de düşünüldüğünde sülfonamit

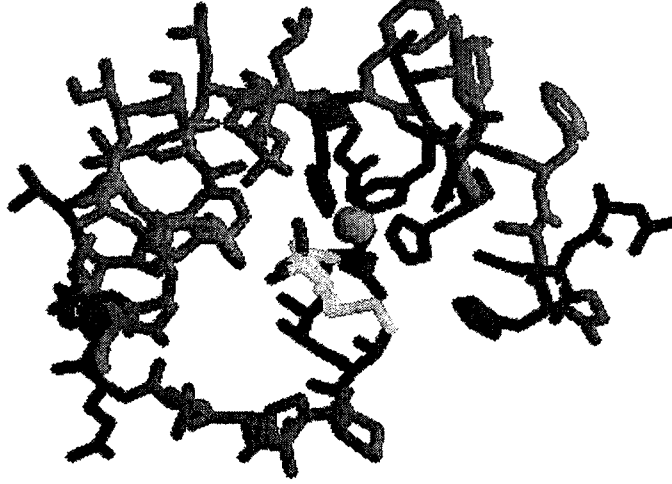
molekülündeki –NH grubu ile Thr-199 arasında bir hidrojen bağı oluşarak daha kararlı yapı meydana gelmektedir. Son olarak, karbonik anhidraz enziminin aktif bölgesindeki bağlanmada rol alan Thr-199' un yanında, üç histidin grubu da düşünülerek yapılan çalışmalarda, Zn-OH bağı kararsız hale geçerek, tetrakoordinasyon metal kompleksi oluşur. Bunun sonucu olarak sülfonamid oksijeni, Thr-199'un –NH grubu ile bir hidrojen bağı yaparak en kararlı konformasyonu meydana getirmektedir (Şekil 2.7, 2.9). Bu teorik hesaplamalar, enzim-inhibitör kompleksinin (HCA-II-Asetazolamit) X-ray yapı analizi ile uyum halindedir. Sülfonamidler arasındaki inhibitör aktivitesi farkını ortaya koyabilmek için, yapı aktivite ilişkileri ve enzim-inhibitör bağlanma serbest enerjileri incelenmektedir.. Elde edilen sonuçlar, sülfonamid türevlerinin enzim ile farklı şekilde Van der wals etkileşimlerinden dolayı  $K_i$  değerlerinde önemli fark olduğunu göstermiştir (Roughton ve Booth,1946).

Eritrosit enziminin ayrıştırılmasından sonra karbonik anhidraz'ın aromatik sülfonamidler tarafından etkili bir şekilde inhibe edildiği bulundu. Ve doğrudan sülfonamid grubunun enzimle bağ yaptığı ileri sürüldü (Mann ve Keilin, 1940). Sülfonamid inhibitörleri'nin kuvvetli şekilde karbonik anhidrazı tutması karbonik anhidrazdaki aktif yerin sülfonamidin farklı kısımlarıyla çok yönlü etkileşmesinin bir sonucudur. Kristal yapısı sülfonamid gruplarının Zn iyonlarıyla bağlanma düzenini açık bir şekilde göstermektedir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. İnsanda ki KA(I) ve KA(II)' ye asetazolamit'in bağlanmasının X-Ray cihazı ile şematik gösterimi (Briganti ve ark.,1997)

Enzimle karbonik anhidraz inhibitörü ile inhibe edilmesive aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.10) (Hansch, 1985).



Şekil 2.10. Karbonik anhidraz enziminin aktif kısmının MTS [(4S-trans)-4-(methylamino)-5,6-dihydro-6-methyl-4H-thieno (2,3-B)thiopyran-2-sulfonamide-7,7-dioxide] ile inhibe edilmesi. Bu şekil PDB programı ile hazırlanmıştır (Hansch, 1985)

Sülfonamid grubundaki oksijen atomlarından biri enzimin aktif kısmındaki Zn(II) iyonu ile 5. koordinasyon bağı yapar. Sülfonamid grubu, Thr-199 un amit ve hidroksil grupları ile hidrojen bağı yaparak etkileşir.

Krebs (1948) açıklamasına göre Karbonik anhidraz inhibitörlerini  $-SO_2NH_2$  grubunda farklı gruplar içermeyen (dallanmamış) aromatik ve hetero halkalı sülfonamidler en güçlü inhibitörlerdir. Aromatik sülfonamidler hayvansal ve bakteriyel karbonik anhidrazların çok kuvvetli ve seçici inhibitörleridir. Sülfonamidin inhibitör etkisini, herhangi bir N-dallanmış kısmı düşürürken, etkin bir inhibitör etkisi için  $-SO_2NH_2$  grubunun dallanmamış olması kabul edilir (Maren, 1967). Büyük olasılıkla bunun sebebi aktif yerin sterik engel tarafından kısıtlanmasıdır.

Mann ve Kelin (1940), Aromatik sülfonamidlerin karbonik anhidraz' ı yüksek derecede etkili inhibe ettiklerini bulmuşlardır. İnhibitörlerdeki dallanmamış  $-SO_2NH_2$  grubu enzimin Zn iyonuna direkt olarak bağlanmaktadır. Son olarak bu yapı X-Ray

difraksiyon ve spektroskopik çalışmalar tarafından desteklenmiştir (Lindskog ve Silverman, 2000; Colemon, 1998).

### 2.3.3. Karbonik anhidraz inhibitörlerin sınıflandırılması

#### 2.3.3.1. Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri arka kamaradaki bikarbonat akımını ve dolayısıyla hümör aköz sentezini azaltarak göz içi basıncını düşürür. Karbonik anhidraz enzimini inhibe eden pek çok inhibitör vardır. En yaygın olanlar aşağıda belirtilmiştir.

- a) Asetazolamit
- b) Diklorofenamit
- c) Metazolamit
- d) Etoksozolamit

Bu ilaçlar hümör aköz yapımını azaltarak göz içi basıncını azaltırlar. Kullanımlarını kısıtlayan durum, yüksek oranda sistemik yan etkilere sahip olmalarıdır. Karbonik anhidraz enziminin değişik izoenzimleri vardır. Siliyer epitelde CAII izoenzimi esas olarak bulunmaktadır. Etkinin oluşması için hedef dokuda enzimin %99'u inhibe olmalıdır.

#### a) Asetazolamit

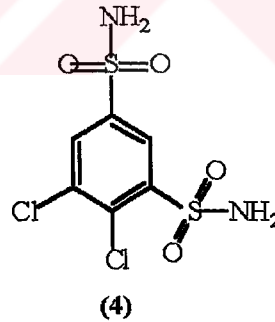
Antimikrobiyal etkinliği olmayan sentetik sülfonamit türevidir. Mide-bağırsak kanalından kolaylıkla absorbe edilirler. Salgılama suretiyle proksimal tübüllerden itrah edilerek elimine edilir. Tübül hücrelerini lumene bakan yüzlerinden etkiler, bu nedenle lumene salgılanması, etkinliği yönünden önemlidir.

Glokom krizlerinde, cerrahi sonrası glokomlarda veya diğer ani göz içi basıncı gösteren kısa süre tedavi gerektiren sekonder glokomlarda günde 1-2 gram Asetazolamit (2) kullanılır. Asetazolamit plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır ve idrarla hiç değişmeden atılır.

Asetazolamit oral olarak alındıktan bir saat sonra etkisini hemen gösterir. 1-2 saatlerinde göz içi basıncını düşürmeye başlar. Tablet olarak alınan asetazolamitin etkisi dördüncü saatte maksimuma ulaşır bu arada 2-4 saatlerinde göz içi basıncı minimum seviyeye gelir. 4-12 saatlerinde ise asetazolamit etkinliğini kaybeder ve göz içi basıncı eski haline döner. Akut durumlarda 500 mg. oral doz göz içi basıncında hızlı bir düşüş sağlar (Aydın, 2003).

### b) Diklorofenamit

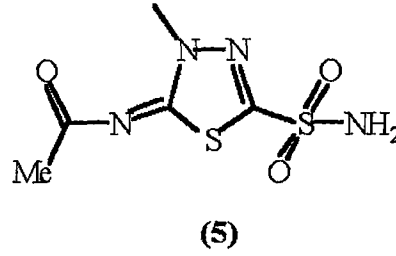
Diklorofenamit (4) diğer karbonik anhidraz inhibitörleri içinden daha etkili olmayan iki sülfonamid grubu taşıyan inhibitördür (Shrader, 1983). Asetazolamit kullanımın yüksek oranda yan etkilere neden olması yan etkisi düşük yeni karbonik anhidraz inhibitörlerini bulma çabası doğurmuştur. Diklorofenamit bu amaçla üretilmiştir. Fakat klinik çalışmalar ilacın asetazolamitten daha etkili olmadığını ve yan etkiler açısından da farkının bulunmadığını göstermiştir. 50 mg tabletlerde kullanılır etkisi 1 saat içinde başlar 3 saatte maksimuma ulaşır etkisi 12 saat kadar sürer (Maren, 1967.; Supuran ve ark.,2000).



### c) Metazolamit

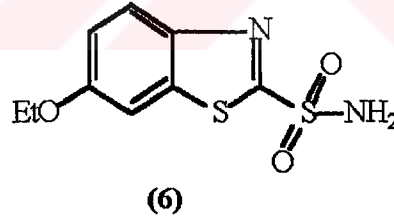
Bu ilaçta daha az yan etkisi olan karbonik anhidraz inhibitörleri bulma çabaları sonucu geliştirilmiştir. Etkisi diğer karbonik anhidraz inhibitörlerinden daha düşük ancak daha iyi tolere edilmektedir. İlacın Neptazane ticari adıyla piyasaya sürülmüş 25 ve 50 mg tabletleri yurt dışında vardır.

Metazolamit (5), asetazolamide kıyasla yağda daha çok çözünür ve plazma proteinlerine daha az oranda bağlanır. Öküler dokulara iyi difüzyon olur. Ayrıca asetazolamitin 500 mg dozu 5-6 mmHg' lik bir göz içi basıncı düşüşü yaparken metazolamit düşük dozlarda 3 mmHg'lik düşüşler yapar (Shields, 1987).



#### d) Etoksozolamit

Etoksozolamit (6) in-vitro klinik çalışmaların da en etkili karbonik anhidraz inhibitörüdür. Bununla beraber onun aktivitesi invivo çalışmalarında plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmasıyla azalmaktadır. 125 mg Etoksozolamit tabletinin alınmasından sonra göz içindeki basınç 2 saat içinde düşmeye başlar, 1-5 saatlerinde minimuma ulaşır, 12 saatten sonra temel haline tekrar döner (Aydın, 2003.)



#### 2.3.3.2. Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri

Karbonik anhidraz enzimi inhibitörlerinin lokal kullanımını 1989 yılında ortaya atılmıştır ve iyi tolere edildiği, göz içi basıncını düşürmede etkili olduğu görülmüştür. 1954 yılından beri sistemik yolla kullanılan asetazolamit, metazolamit, etoksozolamit ve diklorfenamit lokal bir etkiye sahip değildir (Supuran ve ark., 2000).

Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri göz içi basıncını düşürmede oldukça etkilidirler. Ancak oluşturdukları sistematik yan etkiler kullanımlarını sınırlamaktadır. Daha önce bahsedildiği gibi bu ilaçları kullananların %50'si ilacı tolere etmektedir. Göze direk uygulanan topikal bir karbonik anhidraz inhibitörünün daha düşük dozda daha az yan etkiyle göz içi basıncını düşüreceği düşüncesi doğmuştur. Bu amaçla ilk deneysel çalışmalar asetazolamidin topikal bir ajan olarak kullanılması üzerinde yoğunlaşmış ancak başarısız olmuştur. MK 927, Sezolamit (MK 417) ve Dorzolamit (MK 507) üzerinde deneysel çalışmaların yapıldığı topikal karbonik anhidraz inhibitörlerdir. Bunlardan dorzolamit 1995'de Trusopt ticari adıyla piyasaya sürülmüş ilk topikal karbonik anhidraz inhibitörüdür.

#### a) Dorzolamit

İlk topikal karbonik anhidraz inhibitör olan Dorzolamit (3) 1995 Yılında Maren tarafından sentezlenmiştir (Maren, 1995).

Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri gibi KAE' yi bloke ederek hüner aköz prodüksiyonunu azaltmaktadır. Deneysel çalışmalara %2'lik konsantrasyonda maksimum göz içi basıncını düşürücü etkinin geliştiğini göstermiştir. Dorzolamidin etkinliği değişik hasta gruplarında incelenmiş ve en etkili olduğu hasta grubu olarak çocuk hastalar olduğu belirtilmiştir (Sugrue, 2000; Rosenberg ve ark., 1998).

Dorzolamidin sistemik karbonik anhidraz inhibitörlerinde rastlanan majör sistematik yan etkilerinin olmaması, iyi tolere edilmesi, pupil çapını etkilememesi, asit baz ve elektrolit bozukluklarına neden olmaması, kan basıncı ve kardiyak nabızda değişiklik yaratmaması önemli olumlu özelliklerindedir. Diğer olumlu bir özelliği ise yapılan bazı çalışmalarda ilacın retina kan akımını artırdığı gözlenmiştir.

Dorzolamit' in timolol ile birlikte kullanılması ek bir etki doğurmaktadır. Dorzolamit %0.50'lik timolol ile kombine kullanıldığında göz içi basıncında ortalama 4.2 mmHg ek düşüş olmaktadır.

Dorzolamit' in timolol ile birlikte kullanılmasında ek bir etkinin gözlenmesi bu iki ilacın birleştirilerek kullanılması düşüncesini doğurmuş ve timolol %0.50 ile

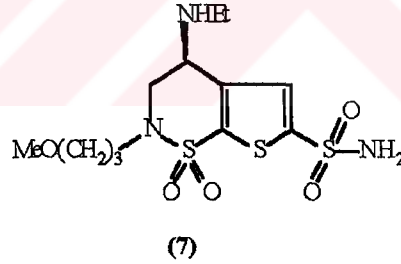


dorzolamit % 2' nin kombinasyonu 1998' de tedaviye sunulmuştur. Topikal karbonik anhidraz inhibitörlerinin sistemik karbonik anhidraz inhibitörleriyle beraber kullanılması önerilmiştir.

Rosenberg ve arkadaşları (1998)'de yayınladıkları çalışmalarında sistemik asetazolamit ve topikal dorzolamit kombinasyonunun göz içi basıncı azalması ve hümör aköz formasyonu üzerindeki birlikte kullanım etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaya PAAG veya oküler hipertansiyon tanısı almış 16 hasta dahil edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada topikal dorzolamit ve sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri aditif bulunmamıştır ve beraber kullanımları önerilmemiştir.

### b) Brinzolamit

1998'de Aicon firması tarafından % 1' lik konsantrasyonda Azopt ticari adıyla tedaviye sunulmuş olan Brinzolamit (7) diğer topikal karbonik anhidraz inhibitörlerindedir. Dorzolamit gibi CAII izoenzimini bloke ederek hümör aköz yapımını azaltan sülfonamid türevi bir ilaçtır (Silver, 2000).



Silver ve arkadaşlarının çalışmalarında PAAG ve oküler hipertansiyon tanılı 572 hastada günde 2 ve 3 kez uygulanan %1' lik Brinzolamit günde 3 kez uygulanan Dorzolamit %2 ve günde 2 kez uygulanan Timolol %0.50 ile karşılaştırılmış. Hastaların bazal ve 3 aylık tedavi sonrasındaki göz içi basınçları ölçülmüştür. Ortalama göz içi basıncındaki azalma günde 2 kez brinzolamit uygulanan hastalarda 3.8-5.6 mmHg bulunmuştur. Dorzolamit uygulananlarda 4.3 - 5.9 mm.Hg'lik ortalama bir düşüş kaydedilmiş. Bu üç sonuç arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmamıştır. Ancak timolol uygulanan grupta göz içi basıncındaki düşüş 5.2 - 6.3



mmHg olarak ölçülmüş. Bu düşüş diğer uygulamalardan istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülmüştür.

Hastalıkların tedavisinde ve teşhisinde, karbonik anhidraz inhibitörlerinin önemi, glokom hastalığı tedavisi için karbonik anhidraz enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmaları sonucu ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, karbonik anhidraz enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış ve bunun sonucunda karbonik anhidraz enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli karbonik anhidraz enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta glokom tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi ve manyetik rezonans belirlenmesinde diagnostik teşhis metaryali, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Bu sebeple, karbonik anhidraz enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük önem kazanmıştır (Supuran, 2001).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler**

- Cam malzeme olarak; çeşitli ebatlarda balonlar, değişik soğutucular, damlatma hunileri, ayırma hunileri, huniler, erlenmayerler, beherler, büretler, kılcal borular, geri soğutucular.
- Manyetik ve mekanik karıştırıcılar, manyetik balıklar.
- Soğutucu olarak su buz banyosu, buz dolabı.
- Tartım için Sartorius BP110S model hassas terazi.
- Sıcaklık ölçümleri için -30 ile 360 °C arasını gösteren dijital termometre.
- Isıtma için; su banyoları, ısıtıcı mantolar, termostat ve yağ banyosu.
- 0,1 ile 1 ml arasında otomatik pipet ve pipet uçları.
- İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) için TLC Aliminyum Plakalar DC-Alufohlen 60F 254 TLC (Merck).
- UV spektroskopisi için Quartz Küvetler.

##### **3.1.2. Kullanılan kimyasallar**

- **Sülfanilamid:** Yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılan madde Merck firmasından temin edilmiştir.
- **3-Kloropropanoil Klorür:** 3-kloropropanoilamino benzen sülfonamidin sentezinde kullanılan madde Merck firmasından temin edildi.
- **Trietilamin (TEA):** Ürün olarak elde edilecek maddelerin sentezinde baz olarak kullanılan madde Aldrich firmasından temin edildi.
- **Sodyum Asetat:** 3-kloropropanoilamino benzen sülfonamidin sentezinde tampon olarak kullanılan madde Aldrich firmasından temin edildi.
- **Asetik Asit:** 3-kloropropanoilamino benzen sülfonamidin sentezinde tampon olarak kullanılan madde Aldrich firmasından temin edildi.

- **Etil Alkol:** Elde edilen ürünlerin kristallendirilmesinde ve bazı sentezlerde çözücü olarak kullanıldı.
- **Dietil Eter:** Sentezlenmiş ürünlerin çöktürülmesinde, kristallendirmede, kullanılan madde Fluka firmasından temin edilmiştir.
- **Kloroform:** Çözücü olarak kullanılan madde Fluka firmasından temin edilmiştir.
- **Tetrahidrofur (THF):** Ürünlerinin elde edilmesinde çözücü olarak kullanılan madde Merck firmasından temin edilmiştir.
- **Diklorometan (DCM):** Ürünlerin saflaştırılmasında ve ince tabaka kromatografisinde kullanılan madde Aldrich firmasından temin edilmiştir.
- **n-Hekzan:** Sentezlenen ürünlerin kolon kromatografisi ile saflaştırmak için ve ince tabaka kromatografisinde kullanılan madde Aldrich firmasından temin edilmiştir.
- **Etil Asetat:** Ürünlerin saflaştırılmasında, ince tabaka ve kolon kromatografilerinde kullanılan madde Aldrich firmasından temin edilmiştir.
- **Morfolin:** Son basamak olarak karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezi için sekonder amin olarak kullanılan madde Merck firmasından temin edilmiştir.
- **1-Metil Piperazin:** Son basamak olarak karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezi için sekonder amin olarak kullanılan madde Merck firmasından temin edilmiştir.
- **Pirrolidin:** Son basamak olarak karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezi için sekonder amin olarak kullanılan madde Merck firmasından temin edilmiştir.
- **4-Metil Piperidin:** Son basamak olarak karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezi için sekonder amin olarak kullanılan madde Merck firmasından temin edilmiştir.
- **Aseton:** Kullanılan cam malzemelerin temizlenmesinde yerli asetone kullanıldı.
- **Sodyum Hidroksit:** Tampon çözelti hazırlanmasında, pH ayarında kullanılan madde Aldrich firmasından temin edildi.
- **Hidroklorik Asit:** Tampon çözelti hazırlanmasında pH ayarında kullanılan madde Aldrich firmasından temin edildi.

- **P-Nitro Fenil Asetat:** Biyolojik çalışmada substrat çözeltisi hazırlamak için kullanılan madde Sigma firmasından temin edildi.
- **Tris Hidroksi Metil Amino Metan:** TRİS tamponunun hazırlanması için kullanılan madde Sigma firmasından temin edilmiştir.
- **Trizma Hidroklorit:** TRİS tamponunun hazırlanması için kullanılan madde Sigma firmasından temin edilmiştir.

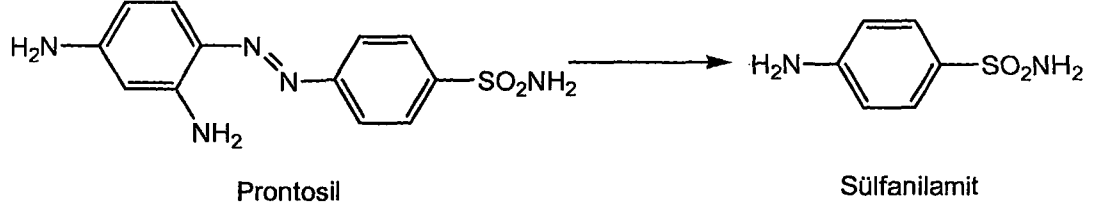
### 3.1.3. Kullanılan cihazlar

- **pH Metre:** Hanna Instruments HI 8314 pH meter.
- **<sup>1</sup>H NMR :** BRUKER DPX-400, 400 MHz Dijital FT-NMR Spektrometre TÜBİTAK Enstrümental Analiz Laboratuvarı.
- **<sup>13</sup>C NMR:** BRUKER Am-400 spektrometre 100 MHz TÜBİTAK Enstrümental Analiz Laboratuvarı.
- **FT-IR:** Perkin elmer spektrum RXI FT-IR spektrometre.
- **Elemental Analiz:** CHNS-932 LECO TÜBİTAK Enstrümental Analiz Laboratuvarı.
- **Kütle Spektrometresi:** Agilen 6890 CC ye bağlı 5973N Mass Seltive dedektör TÜBİTAK Laboratuvarı.
- **UV-Vis Spektrometresi:** Shimadzu 1601 Pc Uv- Vis Spektrofotometre.
- **Etüv:** Nüve F N 500, Safety Termostat.
- **Erime Noktası Tayin Cihazı:** Stuart Scientific Melting Point Apparatus.
- **Rotary Evaporator:** Buchi Rotavapor-Waterbath R-114.
- **UV Lambası:** Camag UV-Lamp (254-366 nm).
- **Hassas Terazı:** Sartorius BP 110 S.

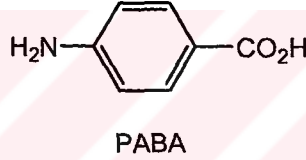
### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Sülf ilaçları

1930 yılların başında, Prontosil adlı azo boyasının antibakteriyel etkinliği bulundu. Bunu izleyen araştırmacılar, Prontosilin antibakteriyel etkisinin bu bileşiğin bozunması ile oluşan sülfanilamitten ileri geldiğini açıkladılar.



Bakteriler, önemli bir büyüme faktörü olan folik asitin sentezi için p-amino benzoik asit'e (PABA) gereksinim duyarlar.



Sülfanilamidit, yapı olarak PABA ya benzediğinden bakteriler tarafından yanlışlıkla alınır ve folik asit sentezi engellenen bakterinin çoğalması durur. Hayvanlar folik asit sentezleyemediklerinden bunu besinlerden alırlar. Bakterilerin çoğalmasını durduran sülfanilamidit, bunu kullanana zarar vermez.

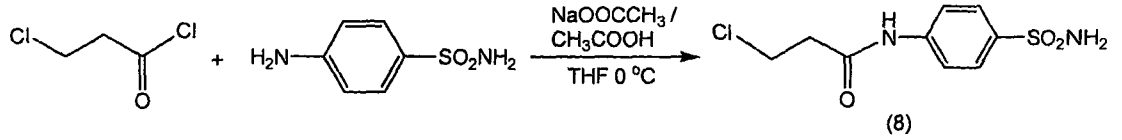
Sülfanilamidit sülf ilaçlarının ilkidir. Penisilin antibiyotiklerinin geliştirilmesine kadar sülf ilaçları en yaygın kullanılan anti bakteriyel ilaçlardı. Bütün sülf ilaçları sülfanilamiditin temel yapısını korurlar. Bu bileşiklerin binlercesi sentezlenmiş ve antibakteriyel etkinliği denenmiştir (Atkins and Carey, 1997).

Burada bizim konumuzla ilgili olarak son zamanlarda gelişen ve sülfanilamiditte bulunan sülfonamidit grubundan kaynaklanan etkileri incelemeye çalıştık. Sülfonamiditler insanlarda Glokom gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte bazı türevlerinin bir çok tümör hücresinin büyümesini engelleyen güçlü inhibitörler olduğu tespit edilmiştir. (Supuran ve ark., 2000).

### 3.2.2. Sentez

#### 3.2.2.1. 4-(3-Kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in sentezi

Amaçladığımız karbonik anhidraz inhibitörüne ulaşmak için Sülfanilamit (1)'i Sodyumasetat/AsetikAsit tamponu ortamında kuru THF çözücüsü içerisinde 3-kloro propanoil klorür ile reaksiyonu gerçekleştirildi 4-(3-Kloropropanoilamino) benzen sülfonamit (8) elde edildi.

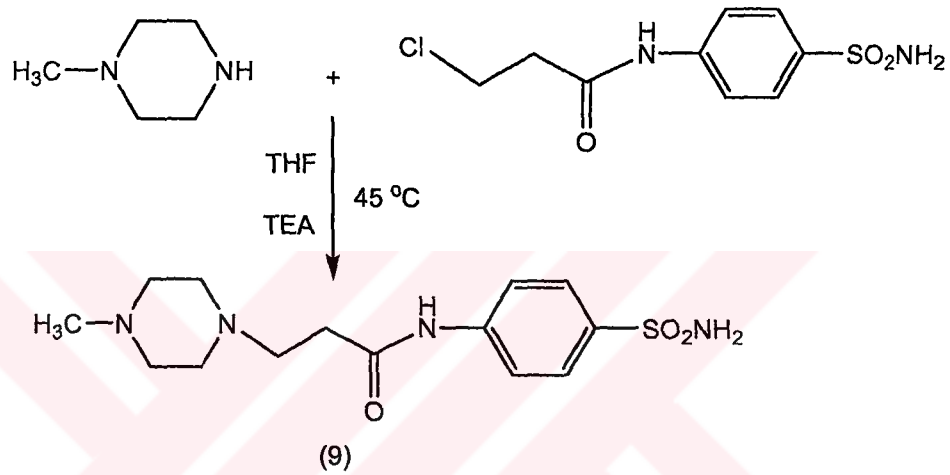


Şekil 3.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in sentezi

Bu reaksiyon için 3-kloropropanoilklorür (1.62 g, 0.012mol) kuru THF (10 mL) çözücüsünde çözülerek damlatma hunisine alındı ve iki boyunlu reaksiyon balonunda kuru THF (100 mL) içinde çözülmüş Sodyumasetat (1.1 g, 0.012 mol) / Asetikasit (1 g, 0.012 mol) tamponu ortamındaki Sülfanilamit'e (1) (2 g, 0.011 mol) 15 dakika süreyle damlatıldı. Ekzotermik reaksiyonun etkisini yok etmek amacıyla bu çalışma 0 °C' nin altında (Tuz-buz banyosunda) yapıldı. Damlama bittikten 30 dakika sonra reaksiyon oda koşullarında devam etti. Bu arada reaksiyon yan ürünü olan Sodyum klorürün de çöktüğü gözlemlendi. Reaksiyonun devam ettiği ve sonlandığı İnce Tabaka Kromatografi yöntemi kullanılarak belirlendi ([DCM]/[Metanol]:3/1). Reaksiyon beklenildiği gibi devam etti ve 3 saat içinde reaksiyon tamamlandı. Çöken sodyumklorür tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltide bulunan çözücü 50 °C de evaporatörde buharlaştırıldı. Daha sonra elde edilen açık sarımsı madde etanol/su (1/5) karışımından kristallendirildi. Elde edilen ürün, 3 defa 10 mL dietileterde yıkanarak süzüldü, vakumlu etüvde 40 °C de kurutuldu. Ürün, aseton, THF, etil alkol, DMSO' da çözünür, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Etilasetat'da az çözünür, suda çözünmez. Elde edilen ürünün kapalı formülü C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>SCl Verim: 2.3 g (% 80), erime noktası: 228-230 °C.

## 3.2.2.2. 4-(3-metilpiperazinpropanoilamino) benzensülfonamit (9)'un sentezi

Amaçladığımız karbonik anhidraz inhibitörüne ulaşmak için yukarıda anlatıldığı şekilde sentezlenen 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)'i TEA ortamında kuru THF çözücüsü içerisinde bir sekonder amin olan 1-Metil Piperazin ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda aşağıda formülü görülen 4-(3-metilpiperazinpropanoilamino) benzensülfonamit (9) bileşiği elde edildi.



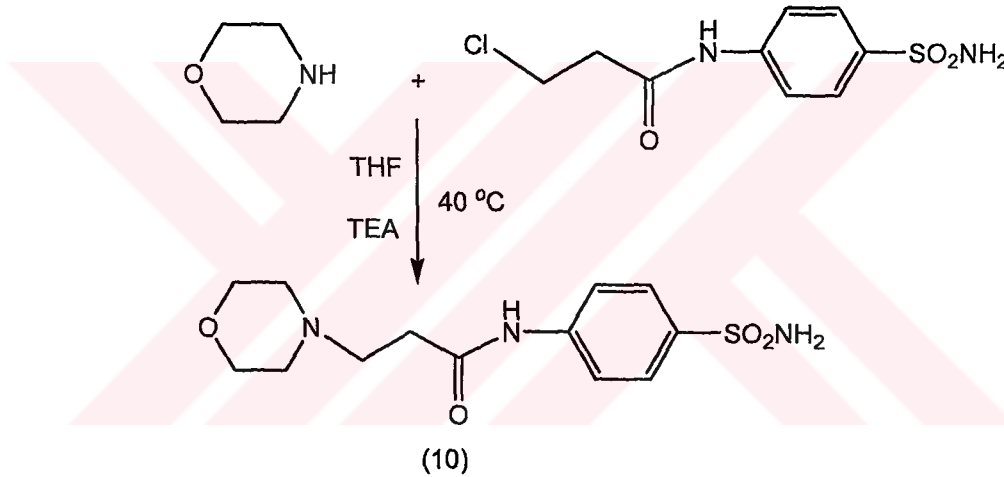
Şekil 3.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un sentezi

4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8). (2 g, 7,6 mmol) 20 mL kuru THF de çözünerek damlatma hunisine alındı ve iki boyunlu balon içerisinde Manyetik karıştırıcı-ısıtıcı yardımıyla karışan kuru THF (100 mL) de çözülmüş TEA (1,5 g, 15,2 mmol) ortamında 1-Metil Piperazine (1,5 g, 15,2 mmol) 15 dakika süreyle damlatıldı. Reaksiyon 0 °C de başladı ve damlama işlemi bittikten sonra oda sıcaklığına getirildi. Reaksiyon oda sıcaklığında çok az yürüdüğü görüldü daha sonra sıcaklık 45 °C' ye çıkarıldı ve geri soğutucu altında karıştırılmaya devam edildi. Yapılan ince tabaka kromatografisinde ([Etilasetat]/[Metanol]:4/1) 4-(3-kloro propanoilamino) benzensülfonamit (8)' in bitmediği görüldü. Reaksiyon ortamına 0,5 mmol oranında 1-metilpiperazin sekonder amini ve TEA eklendi ve reaksiyon 48 saat içinde tamamlandı. Çöken trietilaminhidroklorür tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki THF evaporatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen yağimsı sıvı madde devamlı karışan dietil eter üzerine damla damla ilave edildi. Ürün toz halinde çöktü. Bu işlemi birkaç kez tekrarlandı. Daha sonra ürün (etanol/su:1/5) karışımından kristallendirildi

ve süzüldü. Ürün vakumlu etüvde 40 °C kurutuldu. Ürün, aseton, THF, etil alkol, DMSO' da çözünür, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etilasetat'da az çözünür, suda çözünmez. Elde ettiğimiz ürünün kapalı formülü C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S. Verim: 1.61 g (% 65), erime noktası: 199-200 °C.

### 3.2.2.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)' un sentezi

Amaçladığımız karbonik anhidraz inhibitörüne ulaşmak için yukarıda anlatıldığı şekilde sentezlenen 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)'i TEA ortamında kuru THF çözücüsü içerisinde bir sekonder amin olan Morfolin ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu aşağıda formülü görülen 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10) elde edildi.



Şekil 3.3. 4-(3-morfolinopropanoil amino) benzensülfonamit (10)' un sentezi

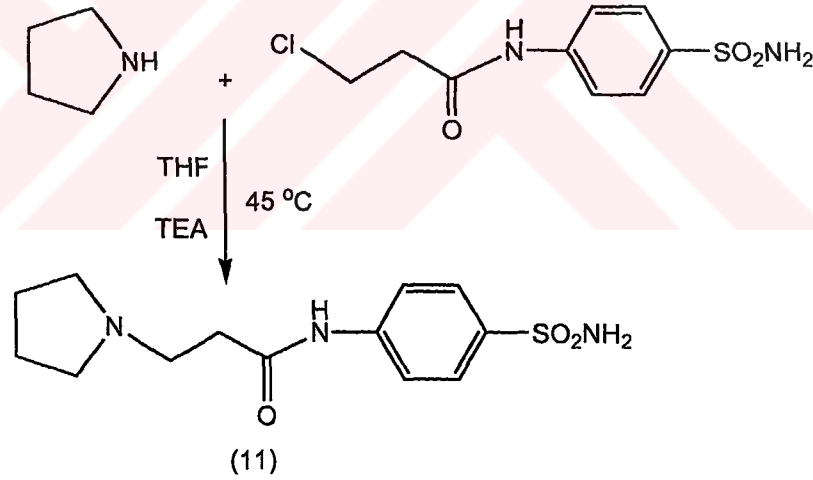
4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8). (2 g, 7,6 mmol) 20 mL kuru THF de çözünerek damlatma hunisine alındı ve iki boyunlu balon içerisinde Manyetik karıştırıcı-ısıtıcı yardımıyla karışan kuru THF (100 mL) de çözünmüş TEA (1,5 g, 15,2 mmol) ortamında Morfolin (1.33 g, 15.2 mmol) 15 dakika süreyle damlatıldı. Reaksiyon 0 °C de başladı ve damlatma işlemi bittikten sonra oda sıcaklığına getirildi. Reaksiyon oda sıcaklığında çok az yürüdüğü görüldü daha sonra sıcaklık 40 °C' ye çıkarıldı ve geri soğutucu altında karıştırılmaya devam edildi. Yapılan ince tabaka kromatografisinde ([DCM]/[Metanol]:4/1) 4-(3-kloropropanoil amino) benzensülfonamit (8)' in bitmediği görüldü. Reaksiyon ortamına 0,5 mmol oranında morfolin ve TEA eklendi ve reaksiyon 48 saat içinde tamamlandı. Çöken



triethylaminhidroklorür tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki THF evaporatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen yağimsı sıvı madde devamlı karışan dietil eter üzerine damla damla ilave edildi. Ürün toz halinde çöktü. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Daha sonra ürün (etanol/su:1/5) karışımından kristallendirildi ve süzüldü. Ürün vakumlu etüvde 40 °C kurutuldu. Ürün, aseton, THF, etil alkol, DMSO' da çözünür, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, etilasetat'da az çözünür, suda çözünmez. Elde ettiğimiz ürünün kapalı formülü C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S. Verim: 1.78 g (% 75), erime noktası: 184-185 °C.

#### 3.2.2.4. 4-(3-pirolidinopropanoil amino) benzensülfonamit (11)' in sentezi

Amaçladığımız Karbonik Anhidraz inhibitörüne ulaşmak için yukarıda anlatıldığı şekilde sentezlenen 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)'i TEA ortamında kuru THF çözücüsü içerisinde bir sekonder amin olan Pirrolidin ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu aşağıda formülü görülen 4-(3-pirolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11) elde edildi.



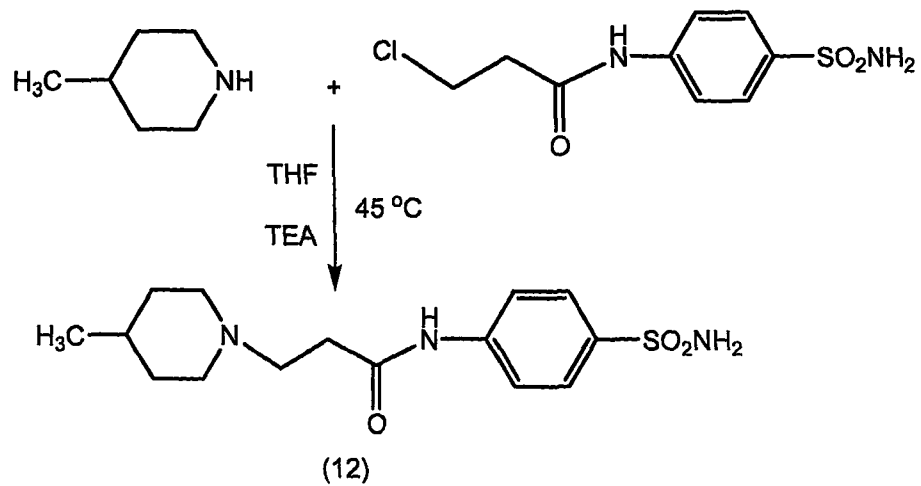
Şekil 3.4. 4-(3-pirolidinopropanoil amino) benzensülfonamit (11)' un sentezi

4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8). (2 g, 7,6 mmol) 20 mL kuru THF de çözünerek damlatma hunisine alındı ve iki boyunlu balon içerisinde Manyetik karıştırıcı-ısıtıcı yardımıyla karışan kuru THF (100 mL) de çözülmüş TEA (1,5 g, 15,2 mmol) ortamında Pirrolidin (1.07 g, 15.2 mmol) 15 dakika süreyle damlatıldı. Reaksiyon 0 °C de başladı ve damlama işlemi bittikten sonra oda sıcaklığına getirildi. Reaksiyon oda sıcaklığında çok az yürüdüğü görüldü daha sonra

sıcaklık 45 °C' ye çıkarıldı ve geri soğutucu altında karıştırılmaya devam edildi. Yapılan ince tabaka kromatografisinde ([DCM]/[Metanol]:4/1) 4-(3-kloropropanoil amino) benzensülfonamit (**8**)' in bitmediği görüldü. Reaksiyon ortamına 0,5 mmol oranında Pirrolidin ve TEA eklendi ve reaksiyon 48 içinde tamamlandı. Çöken trietilaminhidroklorür tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki THF evaporatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen yağimsı sarı sıvı madde devamlı karışan dietil eter üzerine damla damla ilave edildi. Ürün toz halinde çöktü. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Daha sonra ürün (etanol/su:1/5) karışımından kristallendirildi ve süzüldü. Bu arada üründe bulunan sarı renk alkol-su karışımına geçti. Ürün vakumlu etüvde 40 °C kurutuldu. Ürün, aseton, THF, etil alkol, etilasetat, DMSO' da çözünür, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> az çözünür, suda çözünmez. Elde ettiğimiz ürünün kapalı formülü C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S. Verim: 1.3 g (% 60), erime noktası: 166-167 °C.

### 3.2.2.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (**12**)' in sentezi

Amaçladığımız karbonik anhidraz inhibitörüne ulaşmak için yukarıda anlatıldığı şekilde sentezlenen 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (**8**)'i TEA ortamında kuru THF çözücüsü içerisinde bir sekonder amin olan 4-Metilpiperidin ile reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu aşağıda formülü görülen 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (**12**) elde edildi.



Şekil 3.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (**12**)' un sentezi

4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (**8**) (2 g, 7.6 mmol) 20 mL kuru THF de çözünerek damlatma hunisine alındı ve iki boyunlu balon içerisinde manyetik karıştırıcı-ısıtıcı yardımıyla karışan kuru THF (100 mL) de çözünmüş TEA (1.5 g, 15.2 mmol) ortamında 4-metil piperidin (1.5 g, 15.2 mmol) 15 dakika süreyle damlatıldı. Reaksiyon 0 °C de başladı ve damlama işlemi bittikten sonra oda sıcaklığına getirildi. Reaksiyon oda sıcaklığında çok az yürüdüğü görüldü daha sonra sıcaklık 45 °C' ye çıkarıldı ve geri soğutucu altında karıştırılmaya devam edildi. Yapılan İnce Tabaka Kromografisinde ([DCM]/[Metanol]:3/1) 4-(3-kloropropanoil amino) benzensülfonamit (**8**)' in bitmediği görüldü. Reaksiyon ortamına 0,5 mmol oranında 4-metil piperidin amini ve TEA eklendi ve reaksiyon 48 saat içinde tamamlandı. Çöken trietilaminhidroklorür tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki THF evaporatörde uzaklaştırıldı. Elde edilen yağimsı sarı sıvı madde devamlı karışan dietil eter üzerine damla damla ilave edildi. Ürün toz halinde çöktü. Bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Daha sonra ürün (etanol/su:1/5) karışımından kristallendirildi ve süzüldü. Bu arada üründe bulunan sarı renk alkol-su karışımına geçti. Ürün vakumlu etüvde 40 °C kurutuldu. Ürün, aseton, THF, etil alkol, etil asetat, DMSO' da çözünür, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> az çözünür, suda çözünmez. Elde edilen ürünün kapalı formülü C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S. Verim: 1.7 g (% 72), erime noktası: 162-164 °C.

### 3.2.3. Biyolojik çalışma

Sülfonamit inhibitörlerinin 64 yıl önceki keşfinden bu yana RSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> yapısının Karbonik Anhidraz Enzimine karşı güçlü inhibe etkisi olduğu görülmüştür. Burada R Aromatik yada heteroaromatik halkalı bileşiklerdir (Maren, 1967; Mann ve Keilin 1940; Miller ve ark., 1950).

Genelde inhibitörlerin birbiriyle kıyaslanmasında iki sabit vardır, bunlar; inhibitör enzim ayrışma sabiti olan K<sub>i</sub> ve inhibitör enzim bağlanma sabiti IC<sub>50</sub> dir.

Bu çalışmada glokom tedavisinde göz içi basıncın düşürülmesinde kullanılan sülfonamitlerden asetazolamit, sülfanilamit ve yeni sentezlenen sülfonamitlerin in-vitro inhibitör etkileri gösterilmiştir.

Elde edilen yeni bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayısı ve inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. İnhibitör aktivitesi  $IC_{50}$ , bölme katsayısı  $P_{eter}/P_{su}$ , sudaki çözünürlüğü ise g/100 mL olarak verilmiştir.

### 3.2.3.1. Sentezlenen bileşiklerin $IC_{50}$ değerinin saptanması

Her bir maddenin yada ilacın aktivitesi  $IC_{50}$  değeri ile ifade edilir. Bu değer, enzimin %50' sini inhibe eden inhibitörün molar konsantrasyonu olarak verilmektedir.  $IC_{50}$  nin saptanmasında Aldrich Company den alınan Bovine Karbonik Anhidraz Enzimi kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalara uygun olarak, inhibitör aktivitelerinin ölçümünde 348 nm dalga boyunda enzimin etkisiyle p-nitro fenilasetatın hidrolizi incelenmiştir. Burada hidroliz sonunda p-nitro fenol oluşmaktadır. (Pocker ve ark., 1967). Ancak Erel ve Avcı' nın (2002)' de yaptığı çalışmalarda p-nitro fenilasetatın enzimle etkileşmesi sonucu oluşan p-nitro fenolun pH:7.7 ile 9.1 arasında 400 nm dalga boyundaki maksimum absorbansı 348 nm dalga boyundakinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle biz elde ettiğimiz bileşiklerin inhibitör aktivite ölçümlerini ideal pH olan 8.3 de 348 nm yerine 400 nm dalga boyunda Erel ve Avcı (2002) yöntemiyle yapmaya karar verdik.

### 3.2.3.2. Tampon çözeltisinin hazırlanması

İnhibitör aktivitelerinin ölçülmesinde pH 8.3 olan 0.5 mol/L konsantrasyonun da TRİS tamponu kullanılmıştır. Bunun için Tris (hidroksimetil)amino metan bazından (6.06 g, 0.05 mol) alınarak 100 mL deiyonize suda çözüldü. TRİZMA Hidroklorit (Tris (hidroksimetil)amino metan hidroklorit) de (7,88 g, 0,05 mol) 100 mL deiyonize suda çözülmüştür. Bir manyetik karıştırıcı ve pH metre yardımıyla iki çözelti birbirine karıştırıldı ve pH 8.3' e karışım ayarlandı.

### 3.2.3.3. Substrat solusyonun hazırlanması

*p*-nitrofenil asetat (0.0275 g, 0.1518 mol) 1 mL asetonda çözüldü ve deiyonize su ile karıştırılarak 50 mL' ye tamamlandı. Son konsantrasyon 3.0 mmol/L oldu.

#### 3.2.3.4. IC<sub>50</sub> değerinin saptanması

Asetazolamit, sülfanilamit ve sentezlenen yeni bileşiklerin (9, 10, 11, 12) inhibitör aktiviteleri Bovine karbonik anhidraz enzimi üzerinde araştırılmıştır. Bunun için; standart (1000 µg/mL, Sigma) olan Bovine Karbonik Anhidraz enzimi, substrat olarak 3.0 mmol/L p-nitrofenil asetat kullanıldı, asetazolamit, sülfanilamit ve sentezlenen yeni bileşiklerin deiyonize su içerisinde 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM konsantrasyonları hazırlandı.

Blank hazırlanması: 1 tane 400 nm de absorbans vermeyen quartz küvet alındı bu küvet içine 1000 µl tris tamponundan + 100 µl deiyonizesu konuldu + enzim kaynağından 100 µl konuldu. hazırlanan blank küveti UV-VIS 'e konuldu ve 75. saniyede üzerine karbonik anhidraz enziminin substratı 100 µl *p*- Nitrofenilasetat solusyonu eklendi. 100 sn den sonra her 50 saniyede bir 400 nm de absorbans ölçüldü. 600. saniyeye kadar reaksiyon kinetiği gözlemlendi.

İnhibitörlerin enzime karşı absorbansı etkilemesi incelendi bunun için: Küvet içine 1000 µl tris tamponundan + 100 µl inhibitör konuldu + enzim kaynağından 100 µl konuldu. hazırlanan çözelti küveti UV-VIS 'e konuldu ve 75. saniyede üzerine karbonik anhidraz enziminin substratı 100 µl *p*- Nitrofenilasetat solusyonu eklendi. 100 sn den sonra her 50 saniyede bir 400 nm de absorbans ölçüldü. 600. saniyeye kadar reaksiyon kinetiği gözlemlendi.

Bu çalışma hazırlanan tüm sülfanilamit türevleri içerisinde 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mM konsantrasyonları için ayrı ayrı uygulandı ve ortalamaları alındı. IC<sub>50</sub> değerinin saptanması için bilgisayarda % inhibitör değeri kullanılarak Regresyon Analiz Eğrisi çizildi ve sonuçlar IC<sub>50</sub> şeklinde verildi.

#### 3.2.3.5. Bölme katsayısı ölçümü

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

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

Burada  $P$ : bölme katsayısı  $C_o$ : Bileşiğin eter fazındaki konsantrasyonu  $C_w$ : bileşiğin su fazındaki konsantrasyonu  $\alpha$ : bileşiğin sudaki dissosyasyon derecesi. Göz içi dokulara iyi dağılım olması için bölme katsayısı değeri en az 0.01 olmalıdır. Asetazolamidin bölme katsayısı 0.14. Ümit ediyoruz ki elde ettiğimiz bileşiklerin bölme katsayısı daha yüksek olacaktır.

### 3.2.3.6. Bölme katsayısının belirlenmesi

Sülfanilamid türevlerinin eter ve su fazı arasındaki bölme katsayıları, fosfat salin tamponu içinde (PBS, 0.1 M) pH 7.2 ye ayarlanmış çözeltileri hazırlanarak (0.5 % g/mL, 25 mg/5 mL PBS) eşit hacimde 5 mL dietileter ile 5 dakikadan az olmamak koşuluyla çalkalandı. Daha sonra faz ayırımı yapılarak dietil eter açık havada uçuruldu ve geride kalan miktar PBS ile seyreltildi. UV-Vis Spektrofotometre de absorbanları ölçülerek konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 4.2.' de gösterilmiştir.

Konsantrasyonların hesaplanması için öncelikle asetazolamid, sülfanilamid ve sentezlenen bileşiklerin standart eğrileri çizildi. Konsantrasyonları belli olan çözeltilerin absorbanları ölçüldü ve Microsoft Excel programın da Konsantrasyon-Absorbans grafiği çizildi. Bölme katsayısının hesaplanması için PBS çözeltisinde hazırlanan maddelerin su ve dietileter ile ekstraksiyonu sonucu kalan maddenin miktarı konsantrasyonları cinsinden Uv-Vis spektrofotometre de absorbanları ölçülerek hesaplandı.

### 3.2.3.7. İnhibitörlerin sudaki çözünürlüklerinin hesaplanması

Karbonik Anhidraz İnhibitörleri suda iyi çözünmesi gerekmektedir. Etkili bir inhibitörün %1 lik çözeltide iyi çözünmesi gerekmektedir. Maddelerin çözünürlükleri 24,5 °C' de 30 dakikadan az olmamak şartıyla su banyolu çalkalayıcıda çözüldü, çözünmeyen madde süzgeç kağıdı yardımıyla ayrıldı, kurutularak çözünen madde miktarı hesaplandı ve çözünürlük değeri g/100 cm<sup>3</sup> şeklinde verildi.

Bir başka yöntem olarak Uv-Vis spektrofotometre kullanılarak yapıldı. Konsantrasyonların hesaplanması için öncelikle asetazolamit, sülfanilamit ve sentezlenen bileşiklerin standart eğrileri çizildi. Konsantrasyonları belli olan çözeltilerin absorpsanları ölçüldü ve Mikrosöft Excel Programında Konsantrasyon-Absorbans grafiği çizildi. Çözünürlüklerin hesaplanması için saf suda çözünen maddelerin absorpsan değerleri ölçüldü ve konsantrasyonları bulundu oradan çözünen madde miktarına geçildi. Ve çözünürlük değeri  $g/100\text{ cm}^3$  şeklinde sonuçlar Çizelge 4.2.' de gösterilmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

##### 4.1. Sentezlenen Maddelerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması

###### 4.1.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)

Bu çalışmanın 1. basamağında, giriş maddesi olarak sülfanilamit (1) ve 3-kloro propanoil klorür kullanılarak Bölüm 3.2.2.1.' de anlatıldığı gibi 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8) sentezlenmiştir. Literatür de rastlanmayan bu orijinal maddenin yapısı, ince tabaka kromatografisi, elemental analiz, FT IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Bu madde ince tabaka kromatografisi kullanılarak, çeşitli çözücülerde karışım hazırlanarak yürütülmüş ve tek bir madde olduğu safsızlık olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen 8 nolu maddenin Elementel Analiz sonuçları Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Bu maddenin deneysel olarak bulunan yüzde atom ağırlıkları ile teorik olarak hesaplanan değerlerin birbiriyle uyumlu olması Şekil 3.1.' de ki önerilen yapıyı desteklemektedir.

Bu bileşiğin IR spektrumu KBr tabletleri ile alınmıştır. Bu maddenin IR spektrumunda Şekil 3.1.' de verilen yapıyı destekleyen titreşim bantları vardır. Sülfanilamit (1) ve onun türevi olan 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in birbiriyle karşılaştırılmasında (Ek Şekil 1.1, 1.2), sülfanilamitte karakteristik olarak benzen halkasına bağlı  $-\text{NH}_2$  ( $\text{Ar}-\text{NH}_2$ ) den kaynaklanan gerilim bandı  $3375$  ve  $3477\text{ cm}^{-1}$  de iki pikle gözlenmiştir. Sülfonamit grubunda bulunan  $-\text{NH}_2$  den kaynaklanan ( $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) gerilim pikleri  $3267$  ve  $3217\text{ cm}^{-1}$  de görülmüştür burada da H bağından dolayı pik yayvanlaşmıştır.  $3217\text{ cm}^{-1}$  de çıkan pik omuz şeklinde çıkmıştır. Benzen halkasındaki ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ) lerden kaynaklanan pikler  $1500-1595\text{ cm}^{-1}$  de görülmüştür. ( $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) de S=O dan kaynaklanan asimetric gerilme piki  $1143$  ve  $1313\text{ cm}^{-1}$  de görülmektedir. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8) in



spektrumunda karakteristik olarak oluşan amitin (-C=O) dan kaynaklanan gerilim bandı 1672 cm<sup>-1</sup> de, Aromatik halkada ki (-CH=CH-) kaynaklanan gerilim pikleri 1532, 1592 cm<sup>-1</sup> de, Benzen halkasındaki Ar-H de 3063 cm<sup>-1</sup> de, amitleşme reaksiyonu sonucu aromatik halkaya bağlı olan -NH<sub>2</sub> den kaynaklanan iki pik kaybolmuş yerine 3333 cm<sup>-1</sup> de tek pik olarak Amitin -N-H piki görülmektedir. 829 cm<sup>-1</sup> de ise -C-Cl bağından kaynaklanan pik görülmektedir.

8 nolu bileşiğin (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (Ek Şekil 2.1) incelendiğin de  $\delta$  10.3 ppm de bir proton dan kaynaklanan singlet -CONH piki görülmektedir.  $\delta$  7.8 ppm de görülen multipler pik ise Aromatik -C-H lardan kaynaklanan 4 protonu göstermektedir.  $\delta$  7.0 ppm çıkan singlet pik ise -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> deki iki protonu göstermektedir.  $\delta$  3.87 ppm de görülen triplet pik ClCH<sub>2</sub>- den kaynaklanmaktadır burada DMSO dan gelen piklerle çakışmıştır.  $\delta$  2.88 ppm de ise triplet CH<sub>2</sub>CO daki hidrojenlerden kaynaklanan kimyasal kayma görülmektedir.

8 nolu bileşiğin (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (Ek Şekil 3.1) incelendiğin de  $\delta$  167.38 ppm de çıkan kimyasal kayma piki-CONH daki C kaynaklanmaktadır.  $\delta$  140.70 ppm de görülen kimyasal kayma -NH bağlı benzen halkasındaki -C dan kaynaklanmakta,  $\delta$  136.92 ppm de ise -C-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> bağlı olan benzen halkasındaki C dan kaynaklanmaktadır. Ayrıca benzen halkasında ki dört C atomu da iki pik gösterir. Bunlar -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> tarafında olan  $\delta$  125.70 ppm, -NH tarafında olan  $\delta$  117.99 ppm de kimyasal kayma verir.  $\delta$  38.7 ppm de ClCH<sub>2</sub>,  $\delta$  37.87 ppm de ise CH<sub>2</sub>CO kaynaklanan pikler görülmektedir. Bu spektrumda yapıyı desteklemektedir.

Kütle Spektrumu (Ek Şekil 4.1) incelendiğinde elde edilmiş olan 8 nolu bileşiğin molekül ağırlığı 263.21 g/mol dür. Spektrumda, iyon piki olarak [M+1]<sup>+</sup> 264 te görülmektedir. [M-1]<sup>+</sup> Şeklinde de 262.21 olarak pik vermiştir. Yapıda gösterilen amitin (-C-N-) bağı koparak temel pik olarak giriş maddesi olan Sülfanilamit 172 M<sup>+</sup> Şeklinde kalmıştır. Ayrılan diğer gurup ise 91.27 olarak Şekilde görülmektedir.

Yukarıda açıklanan spektroskopik yöntemler maddenin yapısının gösterilen Şekliyle uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensulfonamit (9)

Bu çalışmanın 2. basamağında, giriş maddesi olarak 4-(3-kloropropanoil amino) benzensulfonamit (8) ve 1-metilpiperazin kullanılarak Bölüm 3.2.2.2.' de anlatıldığı gibi 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensulfonamit (9) sentezlenmiştir. Reaksiyon sırasında TEA reaksiyon sonucu oluşan HCl asiti nötralize etmek amacıyla kullanılmıştır. Literatür de rastlanmayan bu orijinal maddenin yapısı, ince tabaka kromatografisi, elemental analiz, FT IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Bu orijinal madde ince tabaka kromatografisi kullanılarak, çeşitli çözücülerde karışım hazırlanarak yürütülmüş ve tek bir madde olduğu safsızlık olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen 9 nolu maddenin Elementel Analiz sonuçları Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Bu maddenin deneysel olarak bulunan yüzde atom ağırlıkları ile teorik olarak hesaplanan değerlerin birbiriyle uyumlu olması Şekil 3.2.'de ki önerilen yapıyı desteklemektedir.

Bu bileşiğin IR spektrumu (Ek Şekil 1.3) KBr tabletleri ile alınmıştır. Bu maddenin IR spektrumunda Şekil 3.2.' de verilen yapıyı destekleyen titreşim bantları vardır. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensulfonamit (9) de karakteristik gruplardan kaynaklanan pikler; amitin (-C=O) dan kaynaklanan gerilim bandı 1681  $\text{cm}^{-1}$  de, aromatik halkada ki (-CH=CH-) kaynaklanan gerilim pikleri 1535, 1592  $\text{cm}^{-1}$  de, 3340 ile 3265 ve 3200 de çıkan pikler amin pikleridir (N-H,  $\text{NH}_2$ ). 2600-2946  $\text{cm}^{-1}$  arasındakiler ise Alifatik -CH pikleridir. Alifatik -C-N lerden kaynaklanan pikler de 1100 1150  $\text{cm}^{-1}$  arasındadır.

9 nolu bileşiğin ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu (Ek Şekil 2.2) incelendiğinde  $\delta$  11.6 ppm de çıkan bir protondan kaynaklanan singlet -CONH piki görülmektedir.  $\delta$  7.6-7.8 ppm de görülen multipler pik ise Aromatik -C-H lardan kaynaklanan dört protonu göstermektedir.  $\delta$  4.9 ppm çıkan singlet pik ise - $\text{SO}_2\text{NH}_2$  deki iki protondan kaynaklanan kimyasal kaymayı göstermektedir.  $\delta$  2.3 ppm de ise triplet  $\text{CH}_2\text{CO}$  daki hidrojenlerden kaynaklanan kimyasal kayma görülmektedir.

$\delta$  2.5-2.8 arasında ortaya çıkan multipllet pikler N- $\underline{\text{CH}}_2$  protonlarından kaynaklanmaktadır.  $\delta$  1.7 ppm de ise N- $\underline{\text{CH}}_3$  protonlarından kaynaklanmaktadır.

9 nolu bileşğin (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (Ek Şekil 3.2) incelendiğinde  $\delta$  170.27 ppm de çıkan kimyasal kayma piki- $\underline{\text{C}}\text{ONH}$  daki C kaynaklanmaktadır.  $\delta$  141.15 ppm de görülen kimyasal kayma -NH bağlanan benzen halkasındaki - $\underline{\text{C}}\text{H}$  dan kaynaklanmakta,  $\delta$  136.99 ppm de ise - $\underline{\text{C}}\text{-SO}_2\text{NH}_2$  bağlı olan benzen halkasındaki C dan kaynaklanmaktadır. Ayrıca benzen halkasında bulunan -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> ye komşu olan  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$  ler den kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  125.70 ppm, -NH a komşu olan - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - lar dan kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  118.12 ppm de görülmektedir.  $\delta$  32,47  $\underline{\text{C}}\text{H}_3$  ün piki,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$  kaynaklanan pik  $\delta$  44.8 ppm, N $\underline{\text{C}}\text{H}_2$  pikleri  $\delta$  51, 52 ve 53 ppm görülmektedir. Bu spektrumda yapıyı desteklemektedir.

Kütle Spektrumu (Ek Şekil 4.2) incelendiğinde elde edilmiş olan 9 nolu bileşğin molekül ağırlığı 327 g/mol dür. Spektrumda, iyon piki olarak (M<sup>+</sup>) 327.45 te görülmektedir. Yapıda gösterilen amitin (-C-N-) bağı koparak temel pik olarak giriş maddesi olan Sülfanilamit 172 M<sup>+</sup> şeklinde ortaya çıkmıştır. Ayrılan diğer gurup ise 255.99 olarak şekilde görülmektedir.

Yukarıda açıklanan spektroskopik yöntemler maddenin yapısının gösterilen şekliyle uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)

Bu çalışmanın 2. basamağında, giriş maddesi olarak 4-(3-kloropropanoil amino) benzensülfonamit (8) ve morfolin kullanılarak Bölüm 3.2.2.3.' de anlatıldığı gibi 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10) sentezlenmiştir. Reaksiyon sırasında kullanılan TEA reaksiyon sonucu oluşan HCl asiti nötralize etmek amacıyla kullanılmıştır. Literatür de rastlanmayan bu orijinal maddenin yapısı, ince tabaka kromatografisi, elemental analiz, FT IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Bu orijinal madde ince tabaka kromatografisi kullanılarak, çeşitli çözücülerde karışım hazırlanarak yürütülmüş ve tek bir madde olduğu safsızlık olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen 10 nolu maddenin Elementel Analiz sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Bu maddenin deneysel olarak bulunan yüzde atom ağırlıkları ile teorik olarak hesaplanan değerlerin birbiriyle uyumlu olması Şekil 3.3.'de ki önerilen yapıyı desteklemektedir.

Bu bileşiğin IR spektrumu (Ek Şekil 1.4) KBr tabletleri ile alınmıştır. Bu maddenin IR spektrumunda Şekil 3.3.' de verilen yapıyı destekleyen titreşim bantları vardır. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamid (10) de karakteristik gruplardan kaynaklanan pikler; amitin (-C=O) dan kaynaklanan gerilim bandı 1697  $\text{cm}^{-1}$  de, Aromatik halkada ki (-C=C-) kaynaklanan gerilim pikleri 1527, 1592  $\text{cm}^{-1}$  de, 3325 ile 3100 ve 3179 de çıkan pikler amin pikleridir (N-H,  $\text{NH}_2$ ). 2600-2946  $\text{cm}^{-1}$  arasındakiler ise alifatik -CH pikleridir. Alifatik -C-N lerden kaynaklanan pikler de 1100 1150  $\text{cm}^{-1}$  arasındadır. Alifatik -C-O lerden kaynaklanan pikler' de 1130-1180  $\text{cm}^{-1}$  arasındadır.

10 nolu bileşiğin ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Ek Şekil 2.3) incelendiğinde  $\delta$  10.5 ppm de çıkan bir protondan kaynaklanan singlet -CONH pikini görülmektedir.  $\delta$  7.6-7.8 ppm de görülen pik ise aromatik -C-H lardan kaynaklanan dört protonu göstermektedir.  $\delta$  7.0 ppm çıkan singlet pik ise - $\text{SO}_2\text{NH}_2$  deki iki protondan kaynaklanan kimyasal kaymayı göstermektedir.  $\delta$  3.84 ppm de ki dört protonu  $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ,  $\delta$  2.70 ve  $\delta$  2.71 ppm de altı H - $\text{NCH}_2$ ,  $\delta$  2.5 ppm de ise,  $\text{CH}_2\text{CO}$  da iki H kaynaklanan kimyasal kayma görülmektedir.

10 nolu bileşiğin ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumu (Ek Şekil 3.3) incelendiğinde  $\delta$  169.96 ppm de çıkan kimyasal kayma pikini-CONH daki C kaynaklanmaktadır.  $\delta$  140.89 ppm de görülen kimyasal kayma -NH bağlanan benzen halkasındaki -C dan kaynaklanmakta,  $\delta$  136.74 ppm de ise -C- $\text{SO}_2\text{NH}_2$  bağlı olan benzen halkasındaki C dan kaynaklanmaktadır. Ayrıca benzen halkasında bulunan - $\text{SO}_2\text{NH}_2$  ye komşu olan  $\text{CH}_2$  lar dan kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  25.75 ppm, -

NH' a komşu olan  $\underline{C}H_2$  ler den kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  117.89 ppm de görülmektedir.  $\underline{C}H_2CO$  kaynaklanan pik  $\delta$  32.41 ppm,  $\underline{N}CH_2$  pikleri  $\delta$  51.8,  $\delta$  52.8 ppm de görülmektedir  $\underline{O}CH_2$  piki de  $\delta$  65.34 ppm de görülmektedir.. Bu spektrum da yapıyı desteklemektedir.

Kütle Spektrumu (Ek Şekil 4.3) incelendiğinde elde edilmiş olan 10 nolu bileşiğin molekül ağırlığı 313 g/mol dür. Spektrumda, iyon piki olarak ( $M^+ + 1$ ) 314.40 ta görülmektedir. Yapıda gösterilen amitin (-C-N-) bağı koparak temel pik olarak giriş maddesi olan Sülfanilamit 171.84  $M^+$  şeklinde ortaya çıkmıştır. Ayrılan diğer gurup ise 145.43 olarak şekilde görülmektedir.

Yukarıda açıklanan spektroskopik yöntemler maddenin yapısının gösterilen şekliyle uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11)

Bu çalışmanın 2. basamağında, giriş maddesi olarak 4-(3-kloropropanoil amino) benzensülfonamit (8) ve pirolidin kullanılarak Bölüm 3.2.2.4.'de anlatıldığı gibi 4-(3-pirolidinopropanoilamino) benzensülfonamit (11) sentezlenmiştir. Reaksiyon sırasında kullanılan TEA reaksiyon sonucu oluşan HCl asiti nötralize etmek amacıyla kullanılmıştır. Literatür de rastlanmayan bu orijinal maddenin yapısı ince tabaka kromatografisi, elemental analiz, FT IR,  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Bu orijinal madde ince tabaka kromatografisi kullanılarak, çeşitli çözücülerde karışım hazırlanarak yürütülmüş ve tek bir madde olduğu safsızlık olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen 11 nolu maddenin Elementel Analiz sonuçları Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Bu maddenin deneysel olarak bulunan yüzde atom ağırlıkları ile teorik olarak hesaplanan değerlerin birbiriyle uyumlu olması Şekil 3.4.'de ki önerilen yapıyı desteklemektedir.

Bu bileşimin IR spektrumu (Ek Şekil 1.5) KBr tabletleri ile alınmıştır. Bu maddenin IR spektrumunda Şekil 3.4.' de verilen yapıyı destekleyen titreşim bantları vardır. 4-(3-pirolidinopropanoilamino) benzenülfonamit (11)' de karakteristik gruplardan kaynaklanan pikler; amitin (-C=O) dan kaynaklanan gerilim bandı 1685  $\text{cm}^{-1}$  de, aromatik halkada ki (-C=C-) kaynaklanan gerilim pikleri 1529, 1592  $\text{cm}^{-1}$  de, 3353 ile 3308 ve 3200 de çıkan pikler amin pikleridir (N-H,  $\text{NH}_2$ ). 2600-2973  $\text{cm}^{-1}$  arasındakiler ise alifatik -CH pikleridir. Alifatik -C-N lerden kaynaklanan pikler de 1100 1150  $\text{cm}^{-1}$  arasındadır.

11 nolu bileşimin ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Ek Şekil 2.4) incelendiğinde de  $\delta$  10.75 ppm de çıkan bir protondan kaynaklanan singlet -CONH pikini görülmektedir.  $\delta$  7.70-7.80 ppm de görülen pik ise aromatik -C-H lardan kaynaklanan dört protonu göstermektedir.  $\delta$  7.68 ppm çıkan pik ise - $\text{SO}_2\text{NH}_2$  deki iki protondan kaynaklanan kimyasal kaymayı göstermektedir.  $\delta$  2.90 ppm deki iki protondan  $\text{NCH}_2$ ,  $\delta$  2.66 ppm de dört protondan  $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$  dört H kaynaklanan kimyasal kayma görülmektedir.

11 nolu bileşimin ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumu (Ek Şekil 3.4) incelendiğinde de  $\delta$  169.52 ppm de çıkan kimyasal kayma pikini -CONH daki C kaynaklanmaktadır.  $\delta$  140.77 ppm de görülen kimyasal kayma -NH bağlanan benzen halkasındaki -C dan kaynaklanmakta,  $\delta$  136.63 ppm de ise -C- $\text{SO}_2\text{NH}_2$  bağlı olan benzen halkasındaki C dan kaynaklanmaktadır. Ayrıca benzen halkasında bulunan - $\text{SO}_2\text{NH}_2$  ye komşu olan  $\text{CH}_2$  ler den kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  125.50 ppm, -NH a komşu olan  $\text{CH}_2$  ler den kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  117.67 ppm de görülmektedir.  $\text{CH}_2\text{CO}$  kaynaklanan pik  $\delta$  34.04 ppm,  $\text{NCH}_2$  pikleri  $\delta$  52.10,  $\delta$  49.81 ppm görülmektedir pirol halkasında ki  $\text{CH}_2$  pikini de  $\delta$  21.92 ppm de görülmektedir.. Bu spektrum da yapıyı desteklemektedir.

Kütle Spektrumu (Ek Şekil 4.3) incelendiğinde elde edilmiş olan 11 nolu bileşimin molekül ağırlığı 298 g/mol dır. Spektrumda, iyon pikini olarak ( $\text{M}^++1$ ) 299.44 de görülmektedir. Yapıda gösterilen amitin (-C-N-) bağı koparak temel pik olarak giriş maddesi olan Sülfanilamit 172.01  $\text{M}^+$  şeklinde ortaya çıkmıştır.



Yukarıda açıklanan spektroskopik yöntemler maddenin yapısının gösterilen şekliyle uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

#### 4.1.5. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12)

Bu çalışmanın 2. basamağında, giriş maddesi olarak 4-(3-kloropropanoil amino) benzensülfonamit (8) ve 4-metilpiperidin kullanılarak Bölüm 3.2.2.5.' de anlatıldığı gibi 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12) sentezlenmiştir. Reaksiyon sırasında kullanılan TEA reaksiyon sonucu oluşan HCl asiti nötralize etmek amacıyla kullanılmıştır. Literatür de rastlanmayan bu orijinal maddenin yapısı ince tabaka kromatografisi, elemental analiz, FT IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir.

Bu orijinal madde ince tabaka kromatografisi kullanılarak, çeşitli çözücülerde karışım hazırlanarak yürütülmüş ve tek bir madde olduğu safsızlık olmadığı anlaşılmıştır.

Elde edilen 12 nolu maddenin Elementel Analiz sonuçları Çizelge 4.1.' de verilmiştir. Bu maddenin deneysel olarak bulunan yüzde atom ağırlıkları ile teorik olarak hesaplanan değerlerin birbiriyle uyumlu olması Şekil 3.5.'de ki önerilen yapıyı desteklemektedir.

Bu bileşiğin IR spektrumu (Ek Şekil 1.6) KBr tabletleri ile alınmıştır. Bu maddenin IR spektrumunda Şekil 3.5.' de verilen yapıyı destekleyen titreşim bantları vardır. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzensülfonamit (12) de karakteristik gruplardan kaynaklanan pikler; amitin (-C=O) dan kaynaklanan gerilim bandı 1682 cm<sup>-1</sup> de, Aromatik halkada ki (-C=C-) kaynaklanan gerilim pikleri 1533, 1594 cm<sup>-1</sup> de, 3345 ile 3307 ve 3200 de çıkan pikler amin pikleridir (N-H, NH<sub>2</sub>). 2600-2973 cm<sup>-1</sup> arasındakiler ise alifatik -CH pikleridir. Alifatik -C-N lerden kaynaklanan pikler de 1100 1150 cm<sup>-1</sup> arasındadır.

12 nolu bileşiğin (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (Ek Şekil 2.5) incelendiğinde de δ 11.85 ppm de çıkan bir protondan kaynaklanan singlet -CONH piki görülmektedir. δ 7.60-7.85 ppm de görülen pik ise aromatik -C-H lardan

kaynaklanan dört protonu göstermektedir.  $\delta$  7.25 ppm çıkan pik ise  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  deki iki protondan kaynaklanan kimyasal kaymayı göstermektedir.  $\delta$  2.72 ppm deki iki protondan  $\text{NCH}_2$ ,  $\delta$  2.55 ppm deki iki protondan  $\text{CH}_2\text{CO}$ ,  $\delta$  2.24 ppm de dört protondan  $\text{CH}_2\text{NCH}_2$ ,  $\delta$  1.05 ile  $\delta$  1.6 ppm arasında multipler olarak alifatik  $\text{CH}_2$ ,  $\delta$  1.01 ppm de  $\text{CH}_3$ - den kaynaklanan duplet yarımlı kimyasal kayma görülmektedir.

12 nolu bileşiğin ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (Ek Şekil 3.5) incelendiğinde  $\delta$  173.28 ppm de çıkan kimyasal kayma piki  $-\text{CONH}$  daki C kaynaklanmaktadır.  $\delta$  144.83 ppm de görülen kimyasal kayma  $-\text{NH}$  bağlanan benzen halkasındaki  $-\text{C}$  dan kaynaklanmakta,  $\delta$  138.24 ppm de ise  $-\text{C}-\text{SO}_2\text{NH}_2$  bağlı olan benzen halkasındaki C dan kaynaklanmaktadır. Ayrıca benzen halkasında bulunan  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  ye komşu olan  $\text{CH}_2$  ler den kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  128.70 ppm,  $-\text{NH}$  a komşu olan  $\text{CH}_2$  ler den kaynaklanan kimyasal kayma  $\delta$  121.18 ppm de görülmektedir.  $\text{CH}_2\text{CO}$  kaynaklanan pik  $\delta$  38.8 ppm,  $\text{NCH}_2$  pikleri  $\delta$  54.97,  $\delta$  55.70 ppm de görülmektedir halkada ki  $\text{CH}_2$  piki de  $\delta$  32-34 ppm arasındadır.  $\delta$  23.01 ppm de ise  $\text{CH}_3$  görülmektedir. Bu spektrum da yapıyı desteklemektedir.

Kütle Spektrumu (Ek Şekil 4.5) incelendiğinde, elde edilmiş olan 12 nolu bileşiğin molekül ağırlığı 326 g/mol dür. Spektrumda, iyon piki olarak ( $M^++1$ ) 327.51 de görülmektedir.  $M^+$  şeklin de de 325 de pik açığa çıkmıştır.Yapıda gösterilen amitin ( $-\text{C}-\text{N}-$ ) bağı koparak temel pik olarak giriş maddesi olan Sülfanilamit 172.01  $M^+$  şeklinde ortaya çıkmıştır. Ayrılan diğer grup ise 155.68 olarak şekilde görülmektedir.

Yukarıda açıklanan spektroskopik yöntemler maddenin yapısının gösterilen şekliyle uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.



Çizelge 4.1. Sentezlenen sülfanilamit türevlerinin kapalı formülleri, molekül ağırlıkları (M. A. ), erime noktaları (E.N.), verimleri ve elementel analiz sonuçları

Kod Numarası	Bileşikler Kapalı Formülü	Molekül Ağırlığı g/mol	Erime Noktası °C	Verim %	Elementel Analiz Sonuçları (Teorik) Deneysel			
					%C	%H	%N	%S
8	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> SCI	263	229	80	(41.15)	(4.22)	(10.66)	(12.21)
					41.27	4.47	10.43	11.42
9	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	327	200	65	(51.51)	(6.79)	(17.16)	(9.82)
					51.30	7.49	16.89	9.18
10	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	313	185	75	(49.83)	(6.11)	(13.41)	(10.23)
					49.59	6.54	13.00	9.47
11	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	298	166	60	(52.51)	(6.44)	(14.13)	(10.78)
					51.63	7.72	13.43	9.86
12	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	326	163	72	(55.36)	(7.12)	(12.91)	(9.85)
					55.17	7.44	12.70	9.13

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

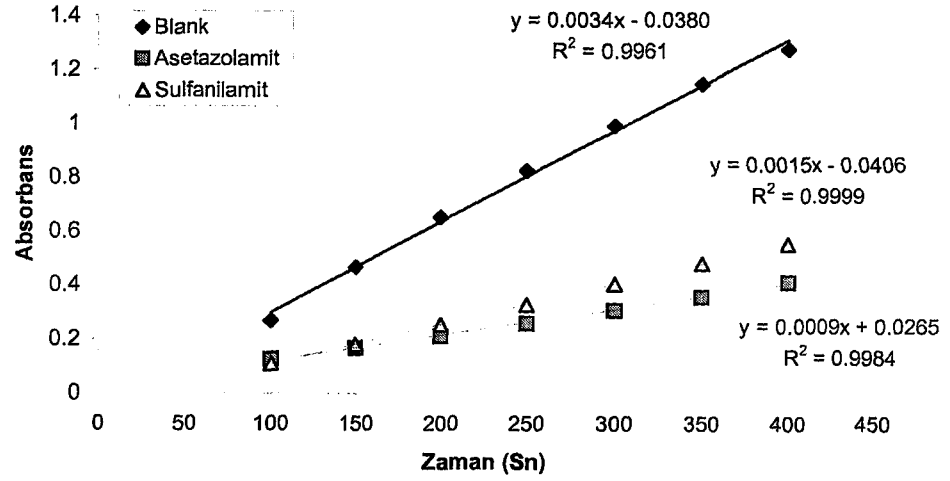
Ana sülfonamidler (örneğin; asetazolamid, diklorofenamid ve etoksozolamid) 60 yıldır glokom tedavisinde göz içi basıncını azaltmak için kullanılmaktadır. Burada ki tüm bileşiklerde genel olan özellik bir sülfonamid ( $-SO_2NH_2$ ) grubuna sahip olmalarıdır. ( $-SO_2NH_2$ ) grubu, bu ilaçlarda inhibitör etkisinde büyük rol oynamaktadır.

Krebs (1948)' in, açıklamasına göre karbonik anhidraz inhibitörlerini  $-SO_2NH_2$  grubunda farklı gruplar içermeyen (dallanmamış) aromatik ve hetero halkalı sülfonamidler en güçlü inhibitörlerdir. Aromatik sülfonamidler hayvansal ve bakteriyel karbonik anhidrazların çok kuvvetli ve seçici inhibitörleridir. Sülfonamidin inhibitör etkisini, herhangi bir N-dallanmış kısmı düşürürken, etkin bir inhibitör etkisi için  $-SO_2NH_2$  grubunun dallanmamış olması kabul edilir (Maren, 1967). Büyük olasılıkla bunun sebebi aktif yerin sterik engel tarafından kısıtlanmasıdır.

Bir maddenin yada ilacın aktivitesi sık sık  $IC_{50}$  değeri ile ifade edilir. Bu değer, enzimin %50 sini inhibe eden inhibitörün molar konsantrasyonu olarak verilmektedir.  $IC_{50}$  nin saptanmasında Aldrich Company den alınan Bovine karbonik anhidraz enzimi kullanılmıştır.

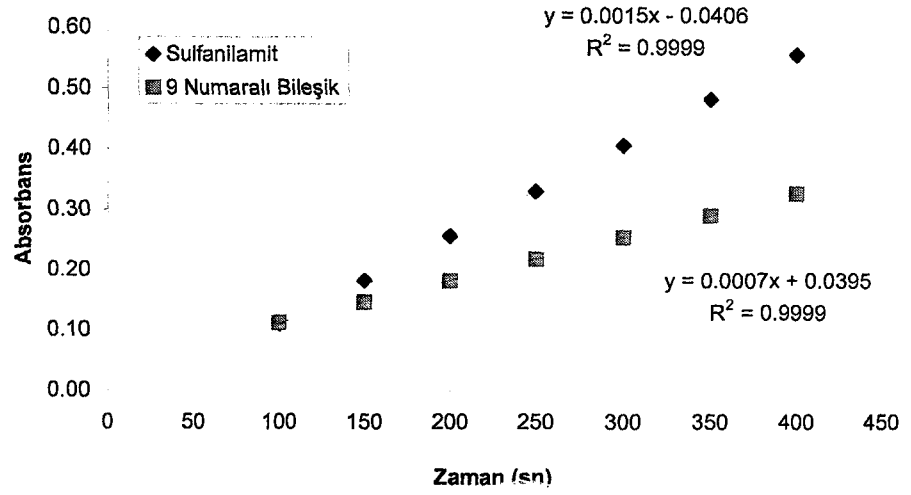
Materyal ve Metod kısmında anlatılan şekliyle  $IC_{50}$  değerleri saptandı.  $IC_{50}$  değerinin saptanması için bilgisayarda % inhibitör değeri kullanılarak Regresyon Analiz Eğrisi çizildi ve sonuçlar  $IC_{50}$  şeklinde verildi.

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

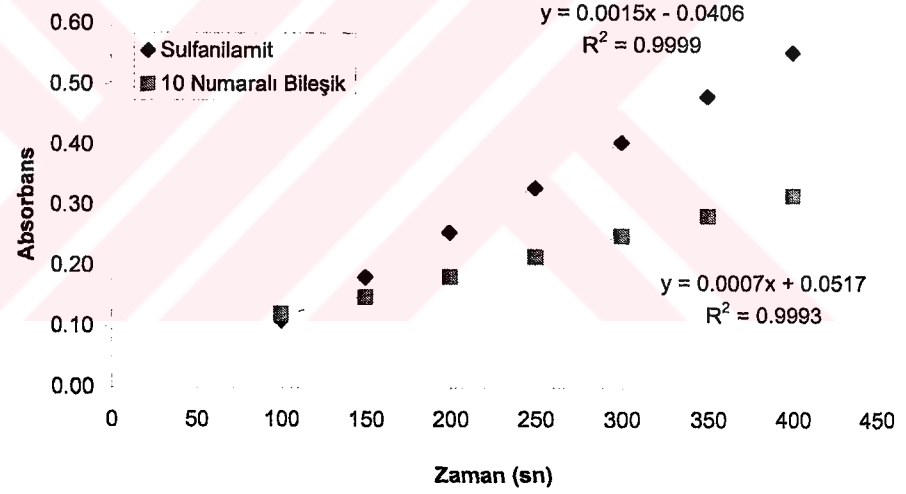


Şekil 4.1. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre blank, sülfanilamit ve asetazolamit varlığında absorban değişimi

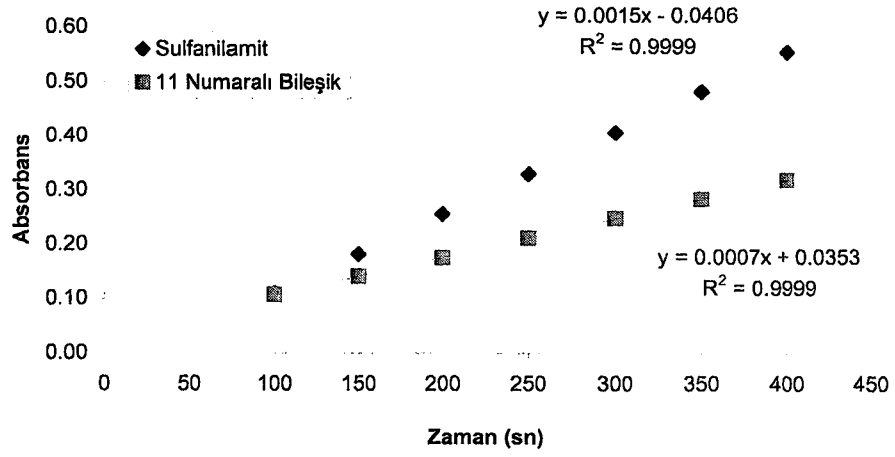
Şekil 4.1. de görüldüğü gibi Blank ortamında zamanla enzimin etkisiyle 400 nm de *p*-nitrofenol konsantrasyonu artarken; asetazolamit ve Sülfanilamitli ortamda aynı süre içerisinde absorbanının düştüğü, dolayısıyla konsantrasyonunun düştüğünü söyleyebiliriz. Bu da ilave edilen inhibitörlerin enzime bağlanması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



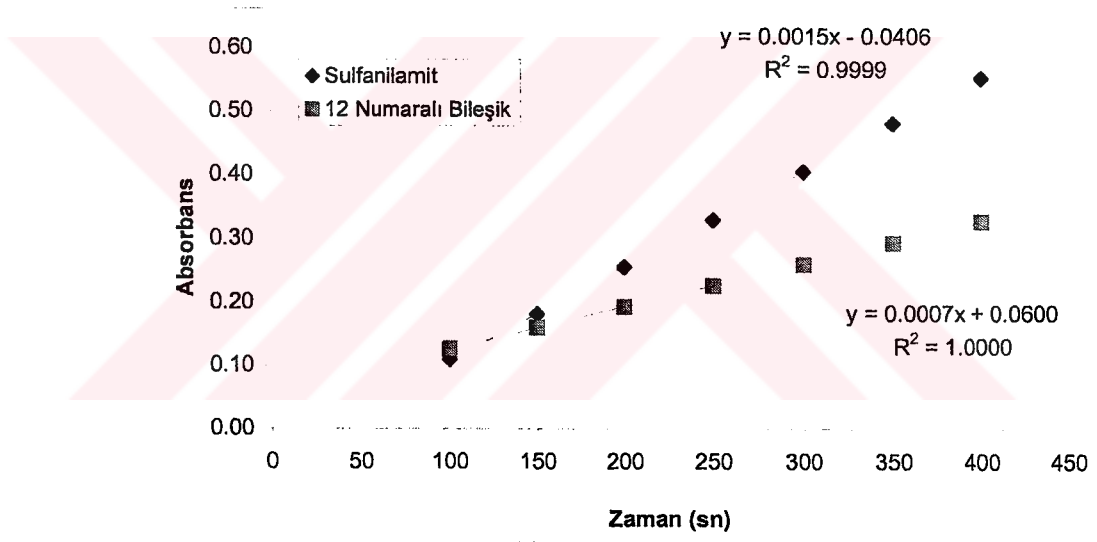
Şekil 4.2. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 9 numaralı bileşik varlığında absorbans değişimi



Şekil 4.3. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 10 numaralı bileşik varlığında absorbans değişimi



Şekil 4.4. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 11 numaralı bileşik varlığında absorbens değişimi.



Şekil 4.5. *p*-nitrofenilasetatın, enzimin etkisiyle 400 nm de zamana göre sülfanilamit ve 12 numaralı bileşik varlığında absorbens değişimi.

Elde edilen yeni bileşiklerin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayısı ve inhibitör aktivitesi araştırılmıştır. İnhibitör aktivitesi  $IC_{50}$ , bölme katsayısı  $P_{eter}/P_{su}$ , sudaki çözünürlüğü ise g/100mL olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sülfonamit türevlerinin sudaki çözünürlükleri, bölme katsayıları ve inhibitör aktiviteleri IC<sub>50</sub> sonuçları

Beleşikler	Sudaki Çözünürlükleri (g/100 cm <sup>3</sup> )	Bölme Katsayıları (P) (pH=7.2)	Inhibitor Aktivitesi IC <sub>50</sub> (nm)
Sülfanilamit	0.75±0.05	0.08	72
Asetazolamit	0.085	0.13	62
9	0.099±0.05	0.040	58
10	0.15±0.05	0.044	57
11	0.10 ±0.05	0.185	58
12	0.031±0.05	0.56	57

İnhibitör aktivite sonuçları gösteriyor ki, bir bileşiğin küçük IC<sub>50</sub> değerine sahip olması onun güçlü inhibe etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar ile sentezlenen bileşiklerin tümünün iyi inhibitör olduğu görülmektedir. 9, 10, 11, 12 bileşikleri, asetazolamit ve sülfanilamitten daha iyi inhibitörlerdir. Klinik olarak kullanılan ve satılan ilaçlardan daha iyi etkiye sahip inhibitörlerin ortaya çıkması bu tür bileşiklerin önemini daha da artırmaktadır.

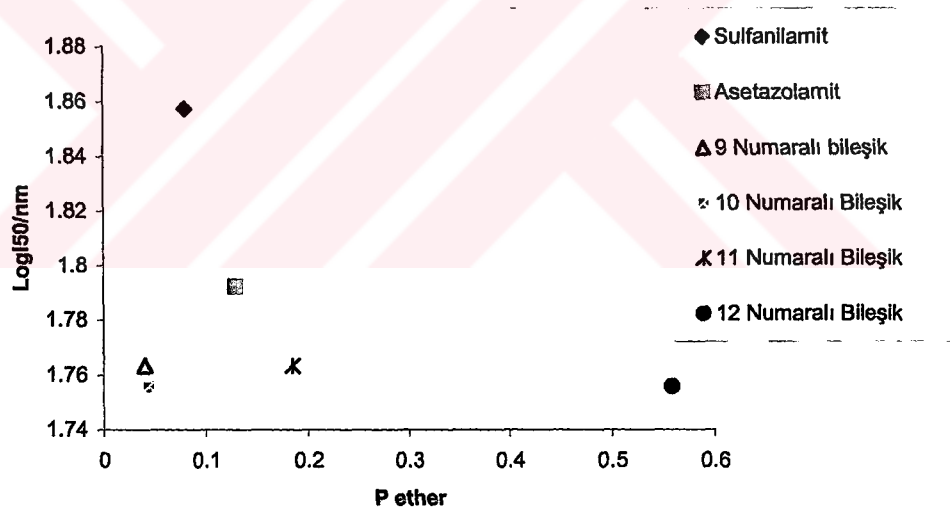
Bölme katsayısı ölçümünde, Asetazolamit, sülfanilamit, ve sentezlenen maddelerin eter-su çözücü sistemi kullanılarak (Hansch, 1964) tekniği ile ölçülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına göre sülfanilamit türevlerinin bölme katsayıları 0.044-0.56 arasında değişmektedir. Buda göz içi dokulara iyi dağılım olması için en az bölme katsayısı değeri olan 0.01 aşmıştır. 9 ile 10 bileşikleri asetazolamit ve sülfanilamitten daha küçük değere, 11 ve 12 bileşiklerinin bölme katsayısı ise asetazolamit ve sülfanilamitten daha büyüktür.

Bir bileşiğin etkili olması isteniyorsa hem güçlü inhibitör aktivitesi göstermeli hemde bölme katsayısı iyi olmalıdır. Elde edilen bu sonuçlara göre 11 ve 12 bileşiklerinin bölme katsayısı değerleri oldukça güzeldir.

Enzim inhibitörü olarak bölme katsayısı ve bir inhibitör aktivitesi arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı belirlenmesi için eter bölme katsayısının hesaplanması gerekmektedir. Sülfanilamit türevleri içinde açıkça görülmektedir ki

inhibitörler için  $IC_{50}$  ve  $P_{eter}$  arasında doğrusal bir korrelasyon yoktur. Örneğin asetazolamitin  $P_{eter}$  0.13 ve onun inhibitör aktivitesi 62 nM dir. 9 bileşiğinin  $P_{eter}$  0.04 ve onun inhibitör aktivitesi 58 nM dir. Buda asetazolamitten daha iyidir. Bir başka örnek olarak 10 bileşiğinin  $P_{eter}$  0.044 ve onun inhibitör aktivitesi 57 nM dir. 12 bileşiğinin  $P_{eter}$  0.56 ki buda 13 kez 10 bileşiğinden daha iyidir. Bununla birlikte bu bileşiklerin inhibitör aktiviteleri aynı olup 57 nM dir. Bir başka örnek olarak 11 ve 12 bileşikleri aynı karbonik anhidraz inhibitör aktivitesine sahip olup 12 bileşiği 11 bileşiğinden bölme katsayısı olarak 3 kez daha büyüktür. Ayrıca asetazolamit 10 bileşiğinden bölme katsayısı bakımından 3 kez daha yüksektir. Ancak asetazolamit 10 bileşiğinden daha az aktiftir.

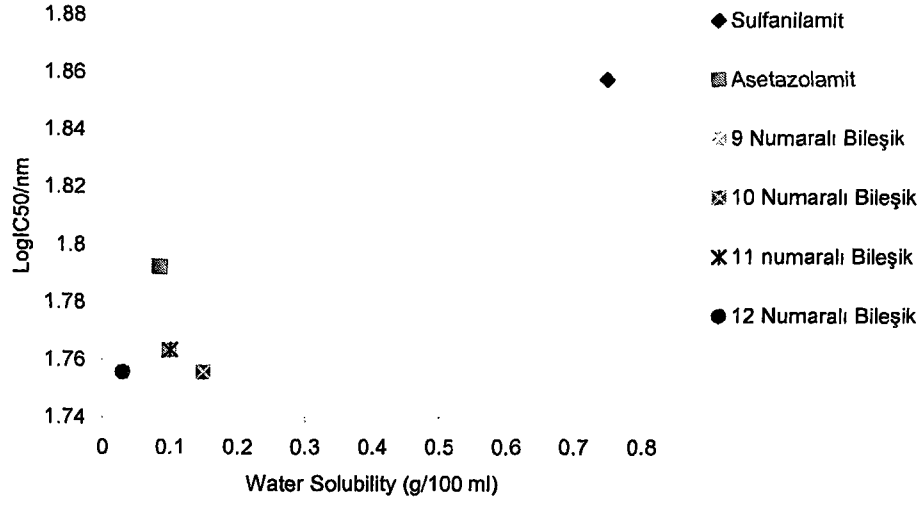
Sülfanilamit, asetazolamit ve sülfanilamit türevlerinin,  $IC_{50}$  ve  $P_{eter}$  arasındaki korelasyon aşağıdaki şekilde gösterilmiş olup inhibitör aktivitesi ile bölme katsayısı arasında direk bir ilişki yoktur.



Şekil 4.6. İnhibitör aktivitesi ve bölme katsayısı arasındaki ilişki

Bileşiklerin sudaki çözünürlüğü ile  $IC_{50}$  sonuçları; inhibitör etkisi ile sudaki çözünürlük arasında bir ilişki olmadığını gösteriyor. Önemli bir sonuç çıkarılabilir ki sülfonamitlerin suda iyi çözünmesi, onun iyi bir inhibitör özelliği göstermesini sağlamaz. Çünkü asetazolamit türevleri suda daha az çözünen bileşiklerdir. Sonuç olarak bileşiklerin çözünürlüğü, inhibitör aktifliğinde az bir etkiye sahiptir. Suyun çözünürlüğü, bölme katsayısı ve aktivite arasında görünen bir ilişki yoktur.

Bileşiklerin sudaki çözünürlüğü ile  $IC_{50}$  arasındaki korelasyon aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 4.7. İnhibitör aktivitesi ve sudaki çözünürlük arasındaki ilişki



## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sülfonamid inhibitörlerinin 64 yıl önceki keşfinden bu yana  $RSO_2NH_2$  yapısının Karbonik Anhidraz Enzimine karşı güçlü inhibe etkisi olduğu görülmüş ve glokom tedavisinde göz içi basıncını azaltmak için kullanılmaktadır. Burada R Aromatik yada heteroaromatik halkalı bileşiklerdir (Maren, 1967; Mann ve Keilin 1940; Miller ve ark., 1950). Bizimde üzerinde çalıştığımız bu konuda Aromatik yada heterohalkalı bileşiklerin karbonik anhidraz enzimine karşı güçlü inhibe etkisini bildiğimiz için aromatik sülfonamidlerden olan sülfanilamitin türevleri sentezlenmiş, sentezlenen bu orijinal bileşiklerin in-vitro çalışmaları yapılmıştır.

Glokom tedavisi ve karbonik anhidraz inhibitörleri için dört yeni sülfanilamid türevi sentezlendi ve bu bileşiklerin, elemental analiz, FT IR,  $^1H$  NMR ve  $^{13}C$  NMR, Kütle spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatılarak karakterize edildi. Reaksiyon sırasında hiçbir problemle karşılaşılmadı ve elde edilen ürünlerin yüksek verimde ve saflıkta olduğu görüldü.

Elde edilen bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri UV-Vvis spektrofotometre ile incelendi bu sonuçlar ile sentezlenen bileşiklerin tümünün iyi inhibitör olduğu görülmektedir. 9, 10, 11, 12 bileşikleri, asetazolamit ve sülfanilamitten daha iyi inhibitörlerdir. Klinik olarak kullanılan ve satılan ilaçlardan daha iyi etkiye sahip inhibitörlerin ortaya çıkması bu tür bileşiklerin önemini daha da arttırmaktadır.

Ayrıca sudaki çözünürlükleri ve bölme katsayıları gibi fiziksel özellikleri incelemiştir. Sentezlenen tüm bileşiklerin asetazolamitten daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu görülmüş ve bazılarının da uygun bölme katsayılarına sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, sentezlediğimiz yeni bileşiklerin bir kısmının in vitro aktivite sonuçlarının klinik olarak kullanılan ilaçlardan daha güçlü olması nedeniyle in vivo aktivite çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu bağlamda sağlık bilimleri alanında çalışan araştırmacılarda yeni bilimsel çalışma yapma imkanları sağlanabilir.

Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda bu tür bileşiklerin antibakteriyel, antifungus, antiglokom özellikleri yanında antiobezit ve antikanser özelliklerinin de bulunduğu göz önüne alınırsa bu türden bileşiklerin önemi anlaşılacaktır. Bu nedenle aromatik ve hetero halkalı yeni sülfonamidlerin sentezleri yapılarak daha güçlü inhibitörler elde edilmesi durumunda glokom, kanser, obezite, vb. gibi çağımızın büyük hastalıklarının tedavisi için önemli adımlar atılmış olabilir düşüncesindeyiz.

Sentezlenen bu bileşiklerin en azından birinin glokom tedavisi için aday ilaç olacağını umuyoruz. Yeni araştırmacıların bu türden bileşikleri sentezlemesi ve bu bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- ANDAÇ, K., 1998. Göz Hastalıkları Ders Notları, Glokom. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, No: 3881469, İzmir.
- ARSLAN, O., 2001. Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds. *Biochemistry (Moscow)*, 66 (9): 1206-1208.
- ATKINS, R.C., and CAREY F. A., 1997. *Organic Chemistry: A Brief Course. Second Edition*, The McGraw-Hill Companies, North America, 522p.
- AYDIN, P., 2003. Glokom. Pharma, İstanbul, 550s.
- BECKER, B., 1954. Decrease in Intraocular Pressure in Man by Carbonic Anhydrase Inhibitor Diamox. *Am J Ophthalmol*, (37): 13-25.
- BENGİSU, Ü., 1990. Göz Hastalıkları. Beta Yayıncılık, 3. Baskı, İstanbul, 225s.
- BEYDEMİR, S., ÇİFTÇİ, M., ÖZMEN, İ., OKUROĞLU M.E.B., ÖZDEMİR H., and KUFREVİOĞLU O. İ., 2000. Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in vitro and from Rat Erythrocytes in vivo. *Pharmacological Research*, (42):187-191.
- BRIGANTI, F., MANGANI, S., ORIOLI, P., SCOZZAFAVA, A., VERNAGLIONE, G., and SUPURAN, C.T., 1997. Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations for the Interaction of Isozymes I and II with Histamine. *Biochemistry*, (36):10384-10392.
- CAREY F., 2003. *Organic Chemistry. 5<sup>th</sup> Edition*, University of Virginia Charlottesville, Virginia, 1360p.
- CHEGWIDDEN, W. R., DODGSON, S. J., and SPENCER, I. M., 2000. The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals, p. 343-364. *In* W. R. Chegwidden, N. D. Carter, and Y. H. Edwards (ed.), *The carbonic anhydrases: new horizons*. Birkhäuser, Basel, Switzerland
- CHEN, H. H., GROSS S., LIAO, J., MCLAUGHLIN, M., DEAN T.R., SLY W.S., and MAY J.A., 2000. 2H-Thieno[3,2-e]- and [2,3-e]-1,2- thiazine-6-sulfonamide 1,1-dioxides as Ocular Hypotensive Agents: Synthesis, Carbonic Anhydrase Inhibition and Evaluation in the Rabbit. *Bioorg Med Chem.*,(8):957-975.
- COLEMAN, J.E., 1998. Zinc Enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol*, (2): 222-234.
- DANIEL, V., MARCO, F., ENZO, G., JAROMIR P., ANDREA, S., SILVIA, P., and SUPURAN C.T., 2003. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of the Tumor-associated isozyme IX with Aromatic and Heterocyclic Sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 6 (13):1005-1009 .
- DRANCE S.M., and NEUFELD A.H., 1984. *Glaucoma: Applied Pharmacology in Medical Treatment*. Orlando, Grune & Stratton, Chapt (17):395-428.
- DREW, 2000. *Drug Discovery. A Historical Perspective*. (287):1960-1964.
- EREL, Ö., and AVCI. S., 2002., Semi-Automated Enzymatic Measurement of serum Zinc Concentration. *Clinical Biochemistry*, (35):41-47.
- GREGORY, R. L., 1990. *Eye and Brain: The Psychology of Seeing*. Oxford University Press Inc., 4. ed., New York Oxford.

- HANSCH, C., MCCLARIN, J., KLEIN, T., and LANGRIDGE, R. A., 1985. Quantitative Structure-Activity Relationship and Molecular Graphics Study of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Mol. Pharmacol.*, (27):493-498.
- HANSCH, C., FUJITA, T., and IWASA, J., 1964. A New Substituent Constant  $\pi$ , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.*, (86): 5175-5180.
- HITCHING, R. A., 1978. *Glaucoma. The Way Ahead*, MCS Consultant, Kent.
- KIMURA, E., 1994. In *Progress in Inorganic Chemistry*: Kartin, K.D. Ed.; John Wiley & Sons, New York (41): 443-491.
- KREBS H.A., 1948. Inhibition of Carbonic Anhydrase by Sulfonamides. *Biochem J* (43): 525-528.
- KRAULIS, P.J., 1991. A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *J. Appl. Crystallogr.*, (24):946-950.
- LIESEGANG, T. J., 1996. *Glaucoma: Changing Concepts and Future Directions*. *Mayo Clin. Proc.*, (71):689-696.
- LINDSKOG S., and SILVERMAN D. W., 2000. The Catalytic Mechanism of Mammalian Carbonic Anhydrases. In: Chegwidde WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases—New Horizons*; Basel: Birkhäuser Verlag; pp 175-196.
- MANN, T. and KEILIN, D., 1940. Sulphanilamide as a Specific Carbonic Anhydrase Inhibitor. *Nature*, (146):164-165.
- MAREN, T.H., 1967. Carbonic anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. *Physiol Rev.*, (47): 595-781.
- MAREN T.H., JANKOWSKA L., SANYAL G., and EDELHAUSER H.F., 1983. The Transcorneal Permeability of Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors and Their Effect on Aqueous Humor Secretion. *Exp Eye Res.*, (36): 457-480.
- MAREN, T.H., 1987. Carbonic Anhydrase: General Perspectives and Advances in Glaucoma Research. *Drug Dev. Res.* (10): 255-276.
- MAREN, T.H., and CONROY, C.W., 1993. A New Class of Carbonic Anhydrase Inhibitor. *J. Biol. Chem.*, (268): 26233-26239.
- MAREN, T. H., 1995. The Development of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Glaucoma*, (4):49-62.
- ORAĞLI, K. M., 2001. *Klinik Oftalmoloji*. Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Ştd., İstanbul, 65s.
- OWA, T., OKAUCHI, T., YOSHIMATSU, K., SUGI, N.H., OZAWA, Y., NAGASU, T., KOYANAGI, N., OKABE, T., KITO, K., and YOSHINO, H. A., 2000. Focused Compound Library of Novel N-(7-Indolyl) Benzene Sulfonamides For The Discovery of Potent Cell Cycle Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11(10): 1223-1226
- POCKER, Y., and STONE, J.T., 1967. The Catalytic Versatility of Erythrocyte Carbonic Anhydrase . III. Kinetic Studies of The Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of P- Nitrofenil Acetat. *Biochemistry*, (6): 668-678.
- QUIGLEY H. A., 1996. Number of People with Glaucoma Worldwide. *British Journal of Ophthalmology*, (80): 389-393.
- ROSENBERG et. all. 1998. Combination of Systemic Asetazolamide and Topical Dorzolamide in Reducing Intraocular Pressure and Aqueous Humor formation, (105): 88-93.

- ROUGHTON, F.J.W., and BOOTH, V.H., 1946. The Effect of Substrate Concentration pH and Other Factors Upon the Activity of Carbonic Anhydrase. *J. Biochem.*, (40):319-330.
- SCOZZAFAVA, A., MENABUONI, L., MINCIONE, F., BRIGANTI, F., MINCIONE, G., and SUPURAN, C.T., 1999. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of Water-Soluble, Topically Effective, Intraocular Pressure-Lowering Aromatic/Heterocyclic Sulfonamides Containing Cationic or Anionic Moieties: Is the Tail more Important than the Ring ?. *J Med Chem*, (42): 2641–2650.
- SHIELDS, M. B., 1987. Textbook of Glaucoma Study Guide for glaucoma, 2<sup>nd</sup> ed., Williams&Wilkins, Baltimore, 549p.
- SILVER L.H., 2000. Dose-response Evaluation of the ocular hypotensive effect of brinzolamide ophthalmic suspension (Azopt). Brinzolamide dose-response study group. *Surv Ophthalmol*, (44):147–153.
- SUGRUE M.F., 2000. Pharmacological and Ocular Hypotensive Properties of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Progr Ret Eye Res*, (19): 87–112.
- SUPURAN, C.T., and SCOZZAFAVA, A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors – part94. 1,3,4-thiadiazole-2-sulfonamide Derivatives as Antitumor Agents. *Eur. J.Med.Chem.*, (35): 867-874.
- SUPURAN, C.T., and SCOZZAFAVA, A., 2000. Carbonic Anhydrase inhibitors and Their Therapeutic Potential. *Exp. Opin. Ther. Patents*, (10): 575–600.
- SUPURAN, C.T., and SCOZZAFAVA, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors *Curr. Med.chem.*, 363 (1): 61-97.
- TÜRKMEN, H., 1998. New Functionalised Sulfonamides as Inhibitors of Carbonic Anhydrase for Glaucoma Therapy. University of Sheffield, PhD Thesis, U.K., 144p.

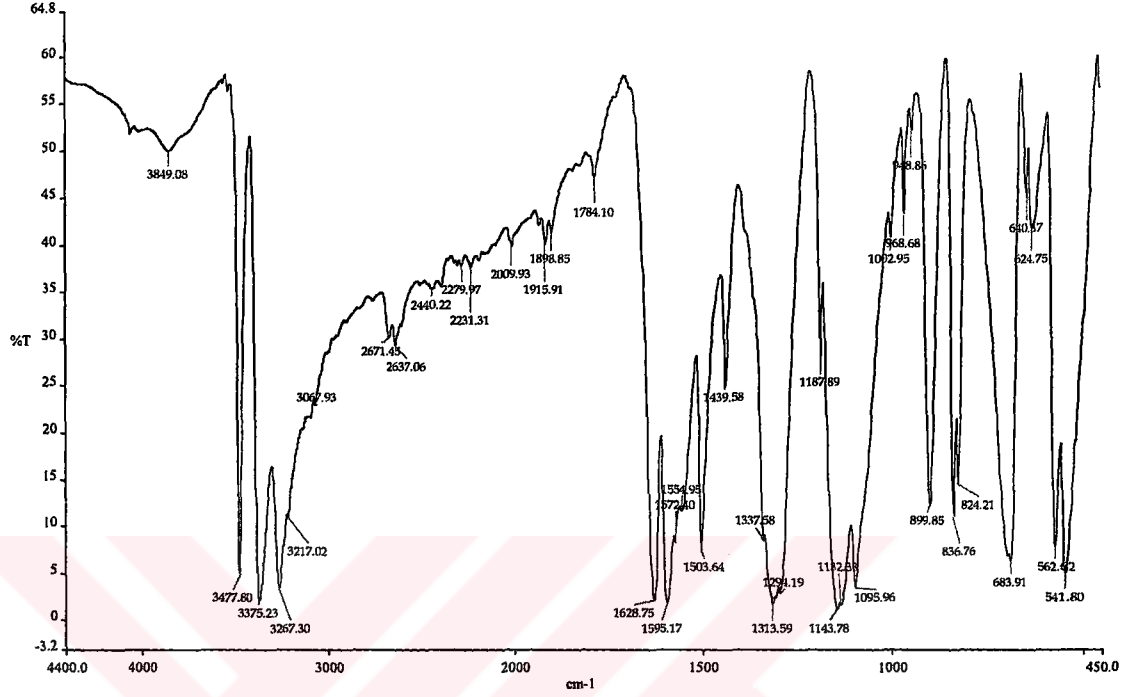
## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana iline bağlı Kozan-Bucak Köyünde doğdu. İlkokul öğrenimini Bucak Köyü İlk Okulunda, ortaokul öğrenimini Bucak Köyü İlk Öğretim Okulunda, lise öğrenimini de Bucak Lisesinde tamamladı. 1997 yılında Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı ve 2001 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında açılan yüksek lisans sınavını kazandı. 08.01.2002’ de Fen Bilimleri Enstitüsünün 50/d maddesi gereği üniversitenin Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Ekim 2002 de Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde açılan Araştırma Görevliliği sınavını kazandı. Halen belirtilen bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmalarını devam ettirmektedir.

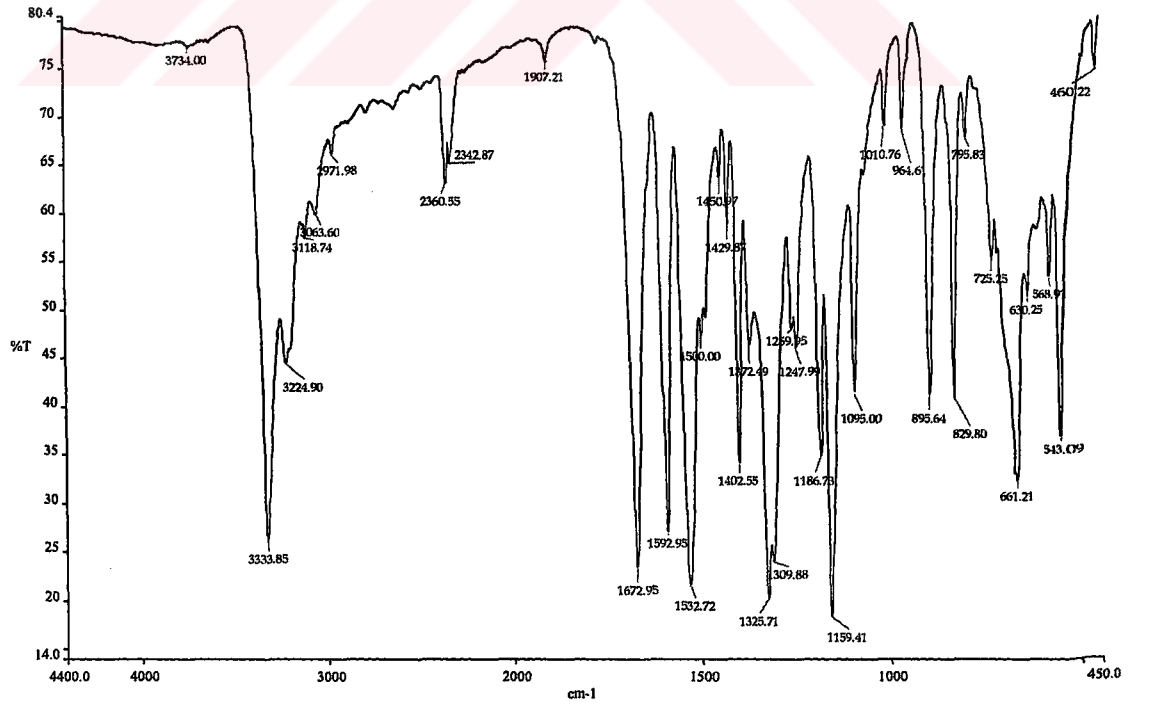


## EKLER

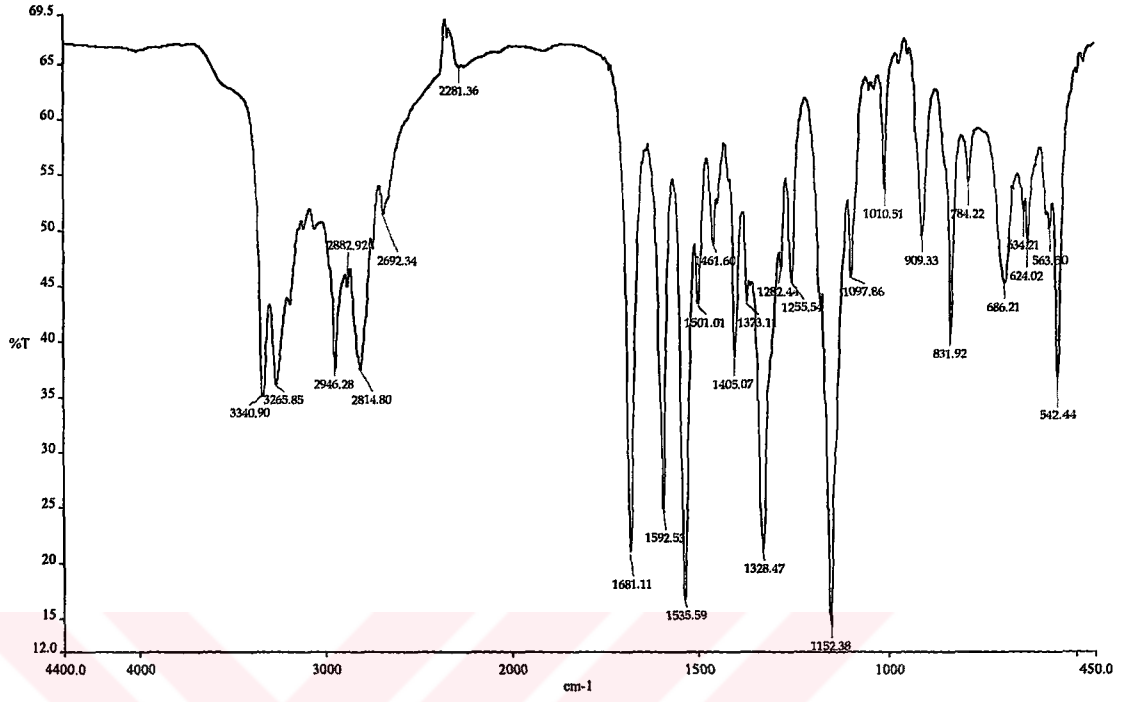
### EK 1 Sentezlenen Sülfanilamit Türevlerinin FT IR Spektrumları



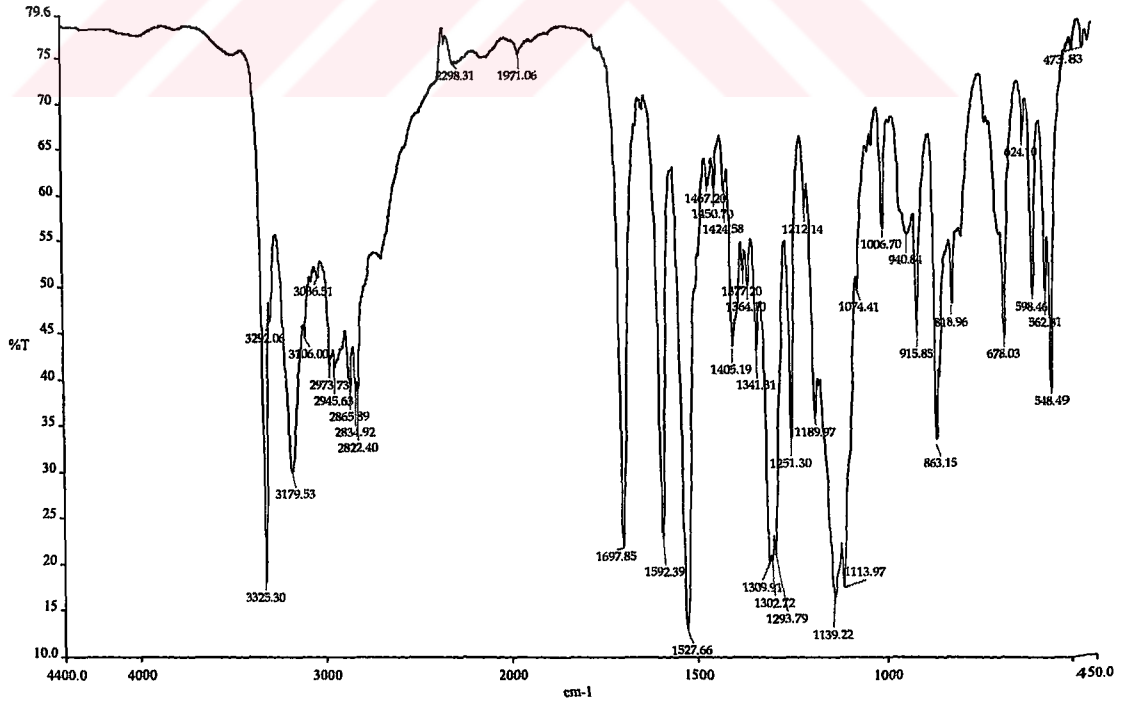
Ek Şekil 1.1. Sülfanilamit' in KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu



Ek Şekil 1.2. 4-(3-kloropropanoilamino) benzensülfonamit (8)' in KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu

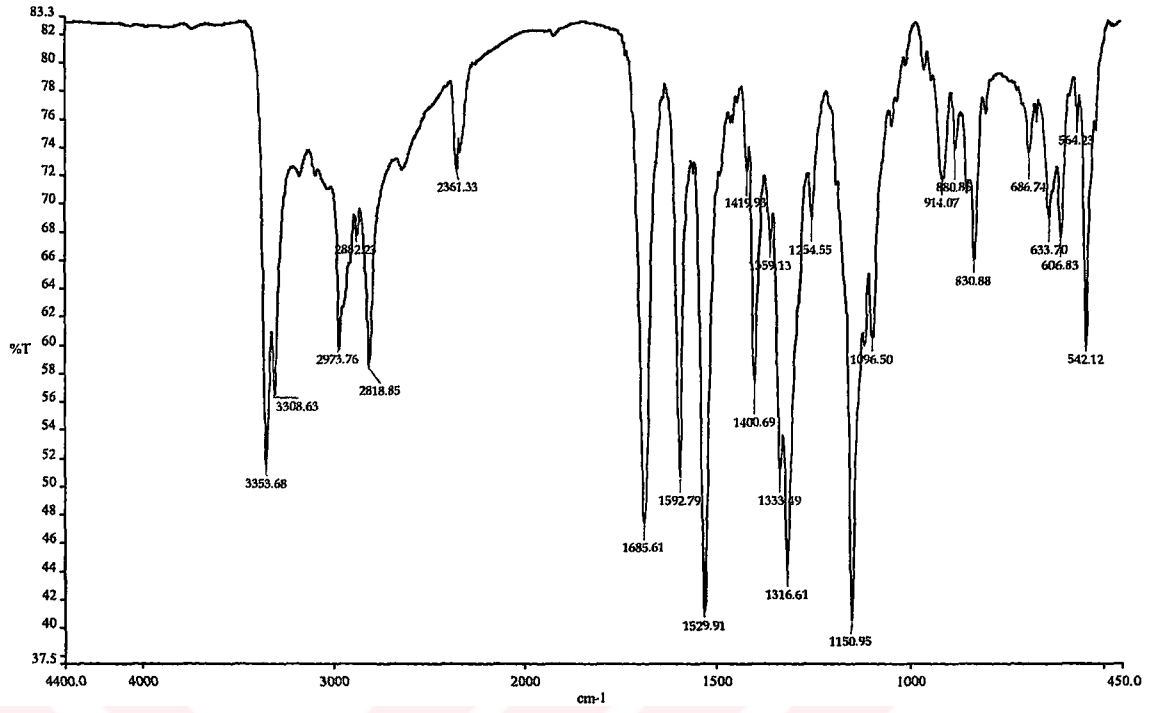


Ek Şekil 1.3. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzensülfonamit (9)' un KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu

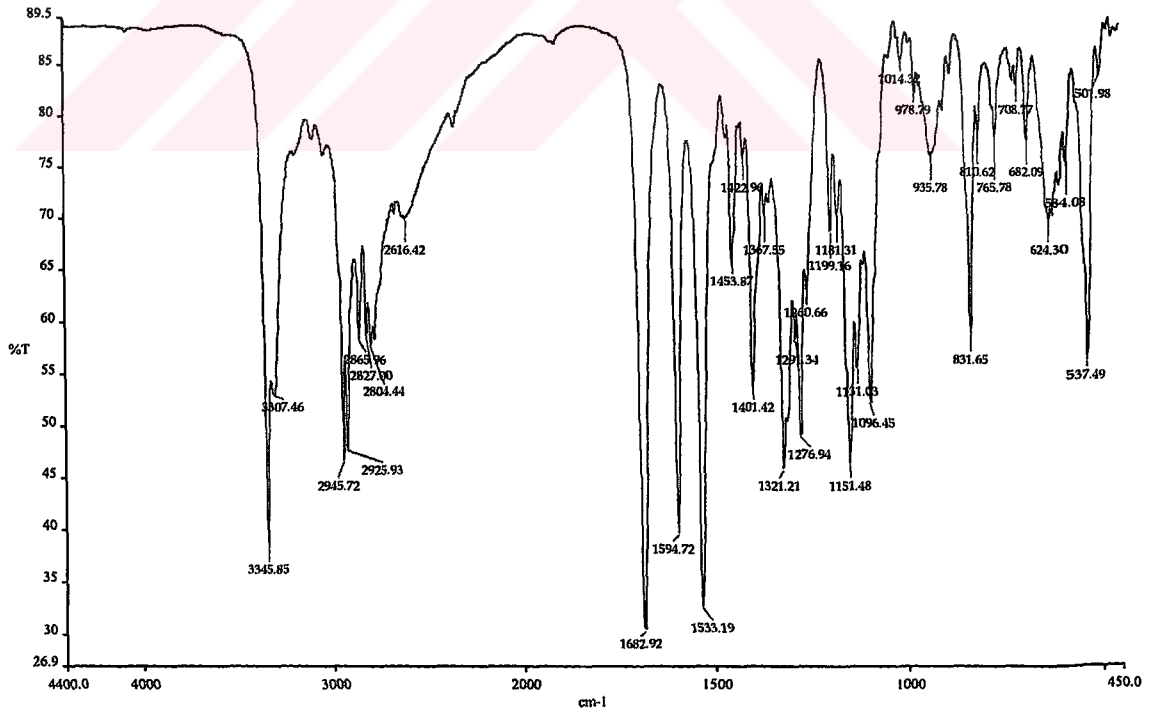


Ek Şekil 1.4. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzensülfonamit (10)' un KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu



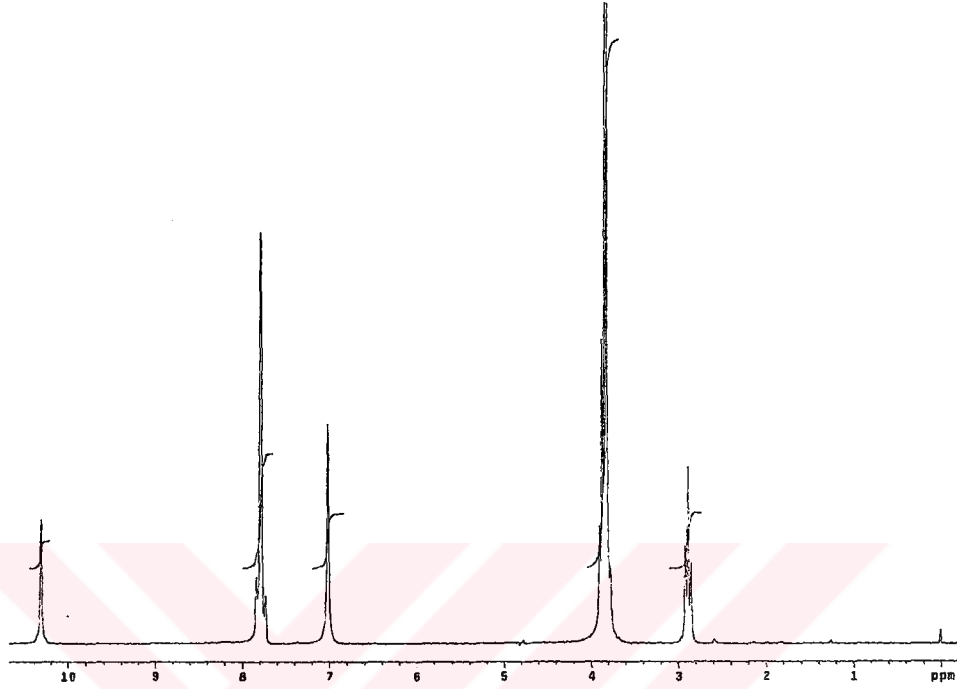


Ek Şekil 1.5. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzenesülfonamit (11)' in KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu

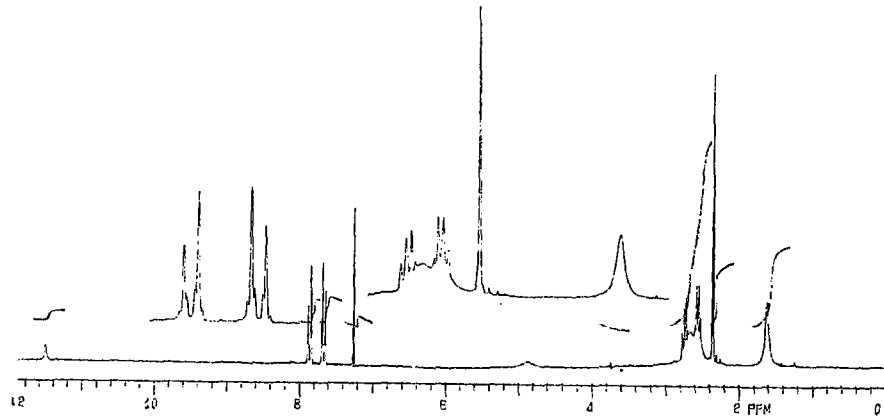


Ek Şekil 1.6. 4-(3-metilpiperidinopropanoilamino) benzenesülfonamit (12)' nin KBr tabletleri ile hazırlanmış FT IR spektrumu

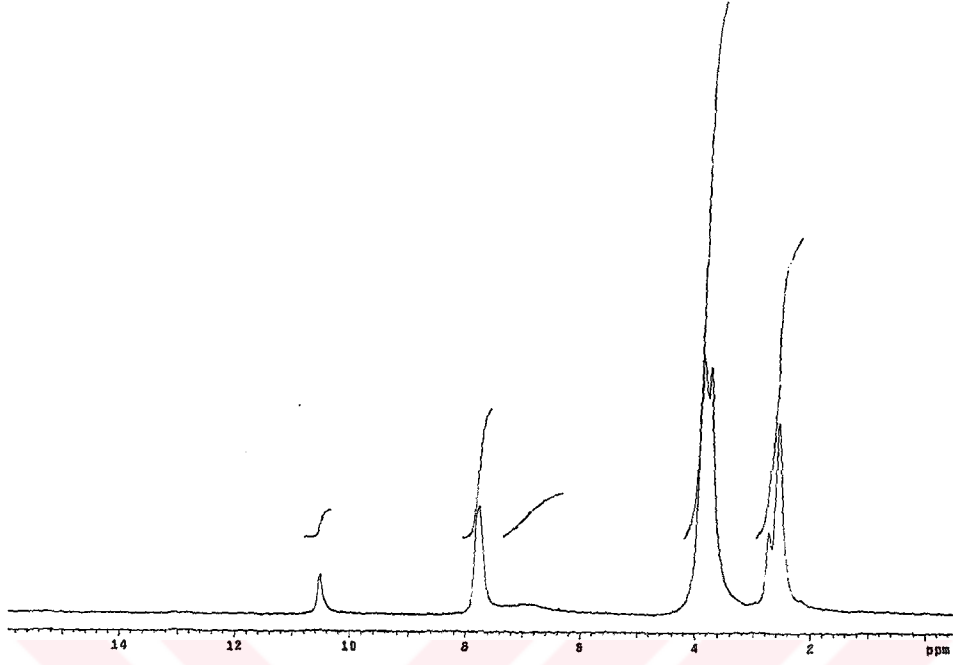
## EK 2 Sentezlenen Sülfanilamit Türevlerinin <sup>1</sup>H NMR Spektrumları



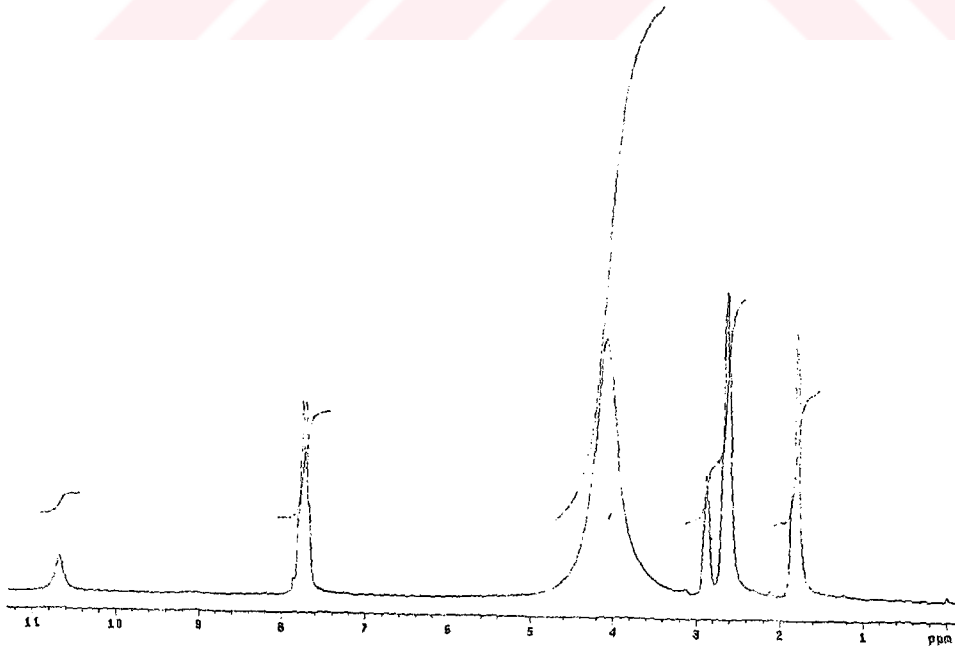
Ek Şekil 2.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzen Sülfonamit (8)' in (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



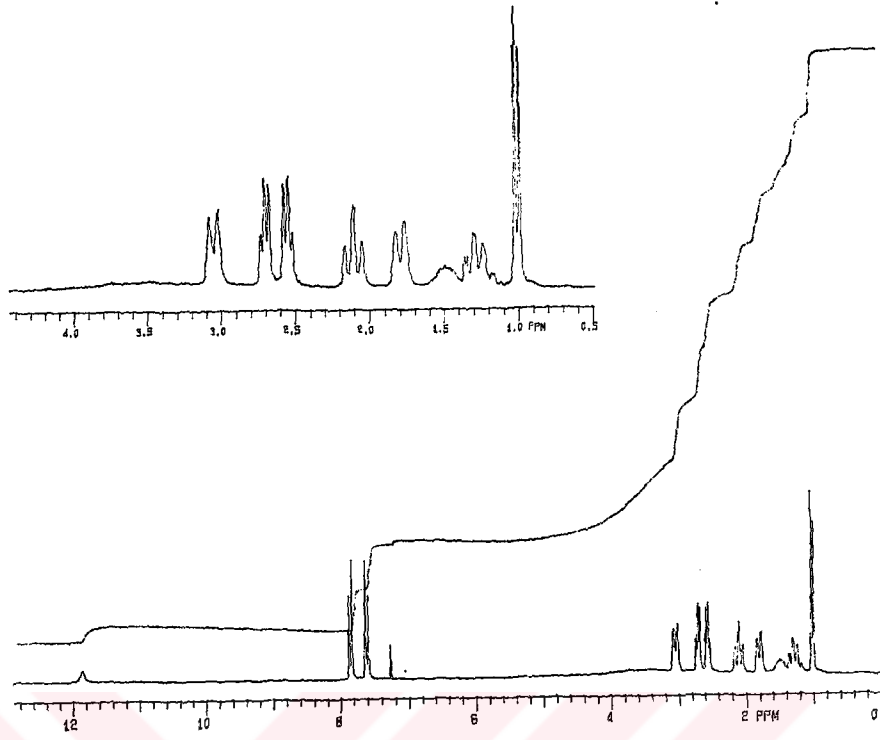
Ek Şekil 2.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzen Sülfonamit (9)' un (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



Ek Şekil 2.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzenülfonamit (10)' un ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

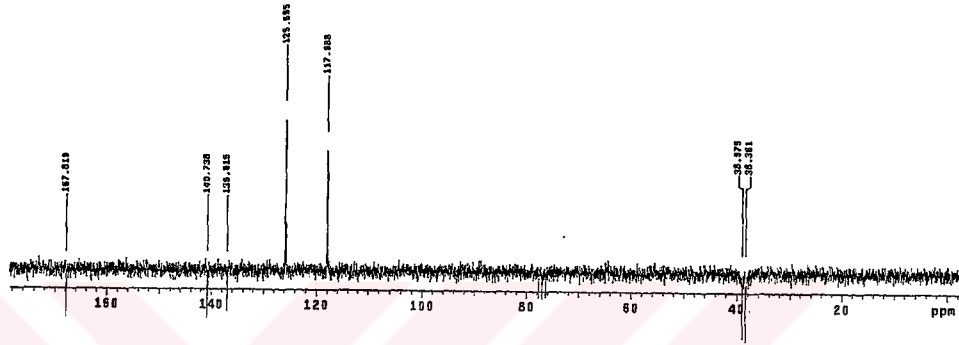


Ek Şekil 2.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzenülfonamit (11)' in ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

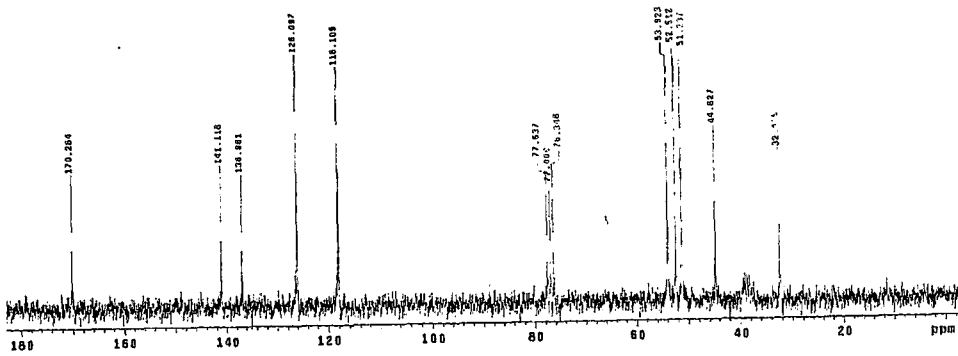


Ek Şekil 2.5. 4-(3-metilpiperidinopanoilamino) benzenesülfonamit (12)' nin (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

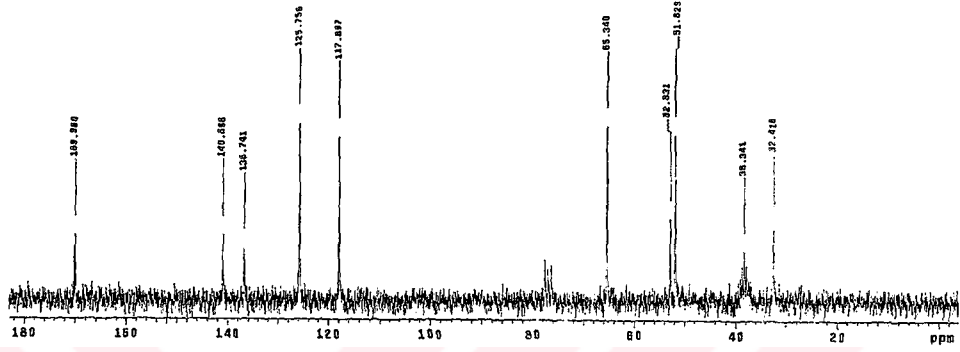
### EK 3 Sentezlenen Sülfanilamit Türevlerinin $^{13}\text{C}$ NMR Spektrumları



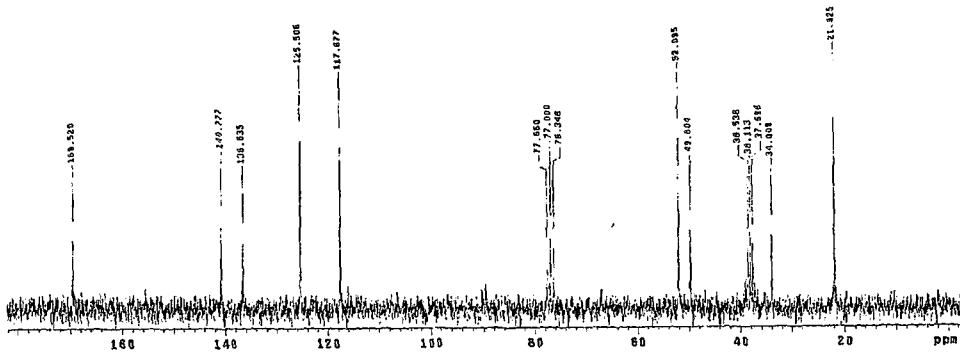
Ek Şekil 3.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzen Sülfonamit (8)' in ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



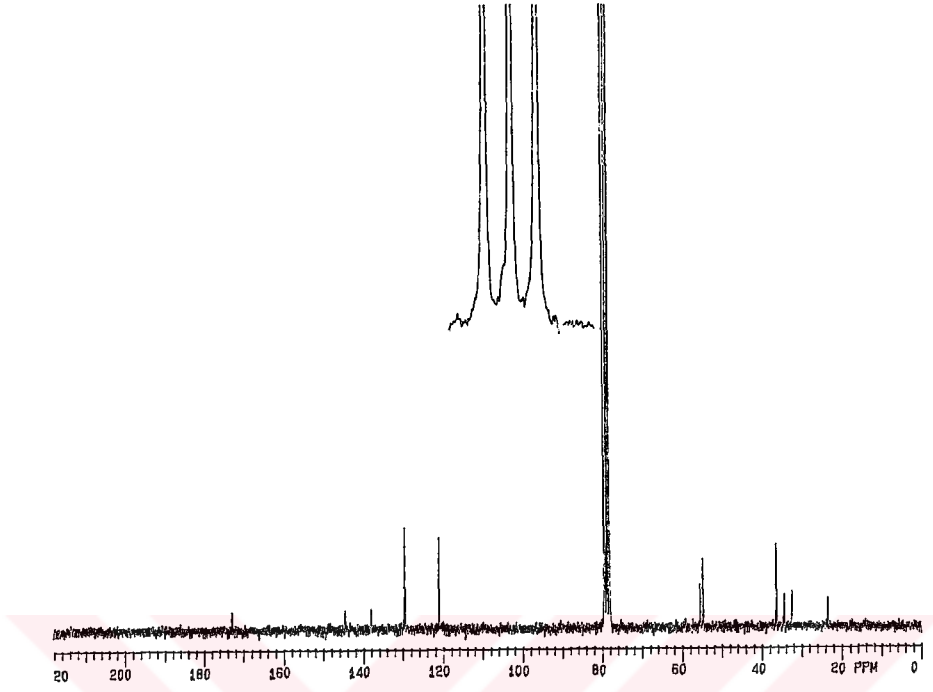
Ek Şekil 3.2. 4-(3-metilpiperazino)propanoilamino) benzen Sülfonamit (9)' un ( $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}:4/1$ ) içerisinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



Ek Şekil 3.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzenülfonamit (10)' un (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup>C-NMR spektrumu

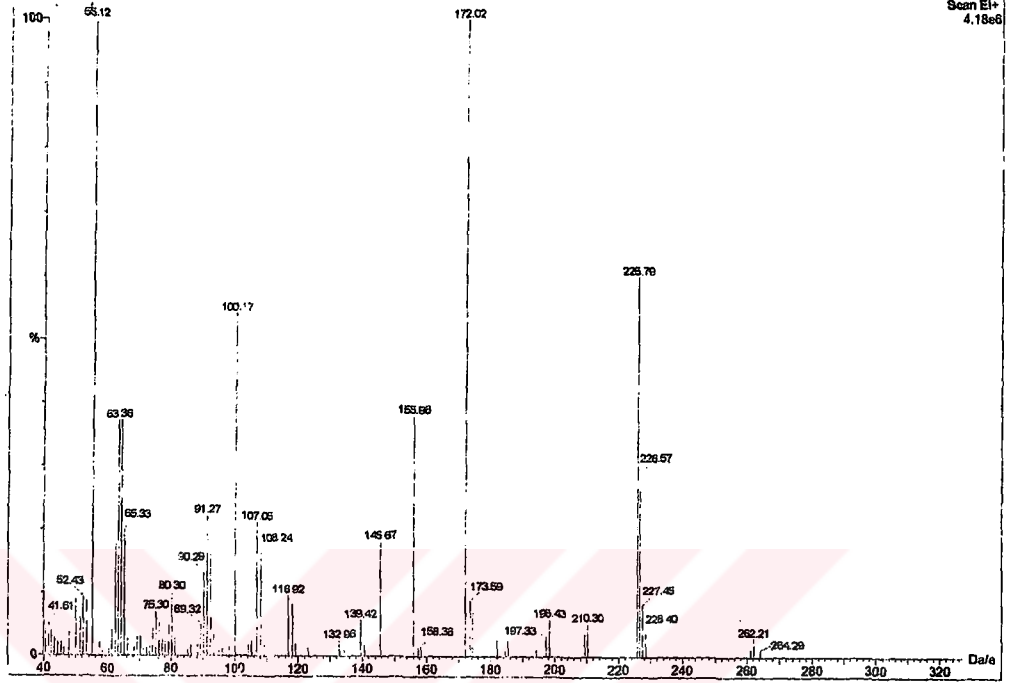


Ek Şekil 3.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzenülfonamit (11)' in (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup>C-NMR spektrumu

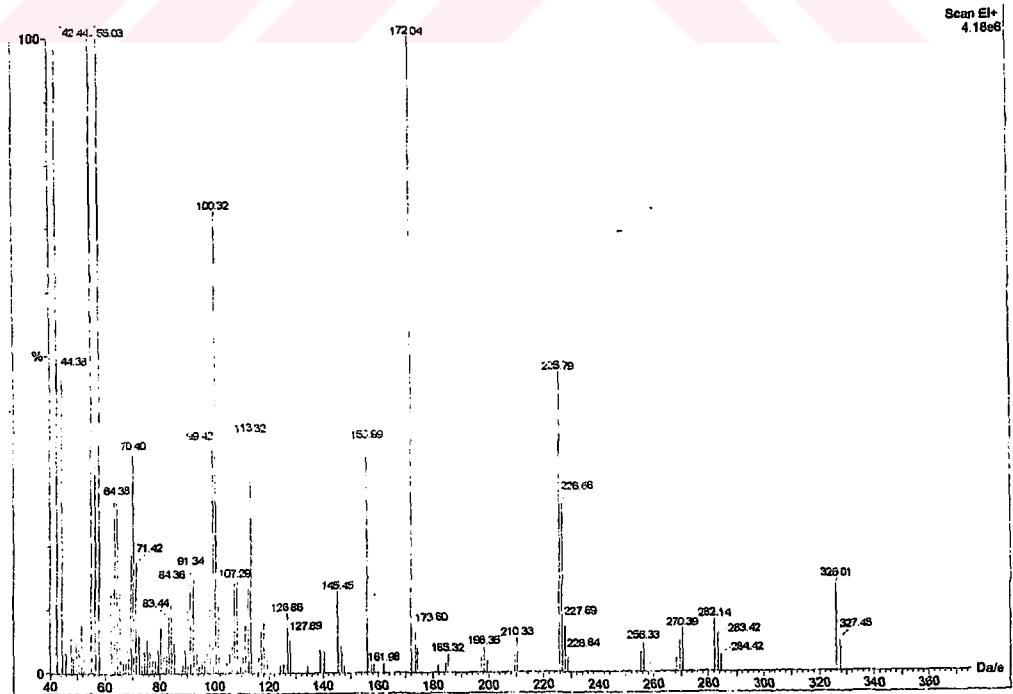


Ek Şekil 3.5. 4-(3-metilpiperidinopanoilamino) benzenşulfonamit (12)' nin (CDCl<sub>3</sub>/DMSO:4/1) içerisinde alınan <sup>13</sup>C-NMR spektrumu

## EK 4 Sentezlenen Sülfanilamit Türevlerinin Kütle Spektrumları

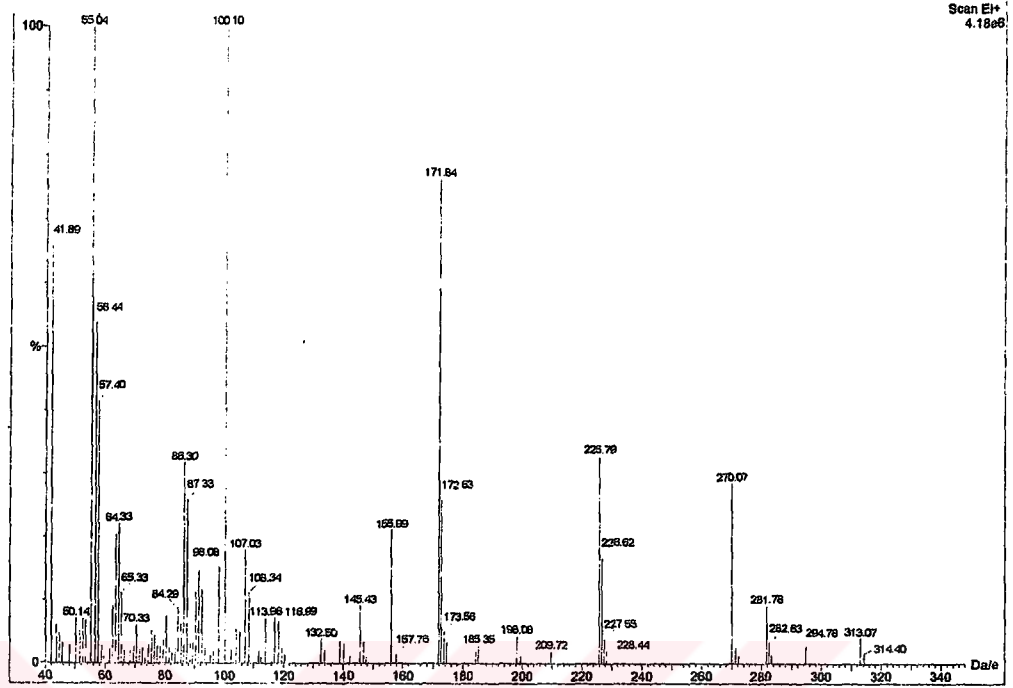


Ek Şekil 4.1. 4-(3-kloropropanoilamino) benzen Sülfonamit (8)' in kütle spektrumu

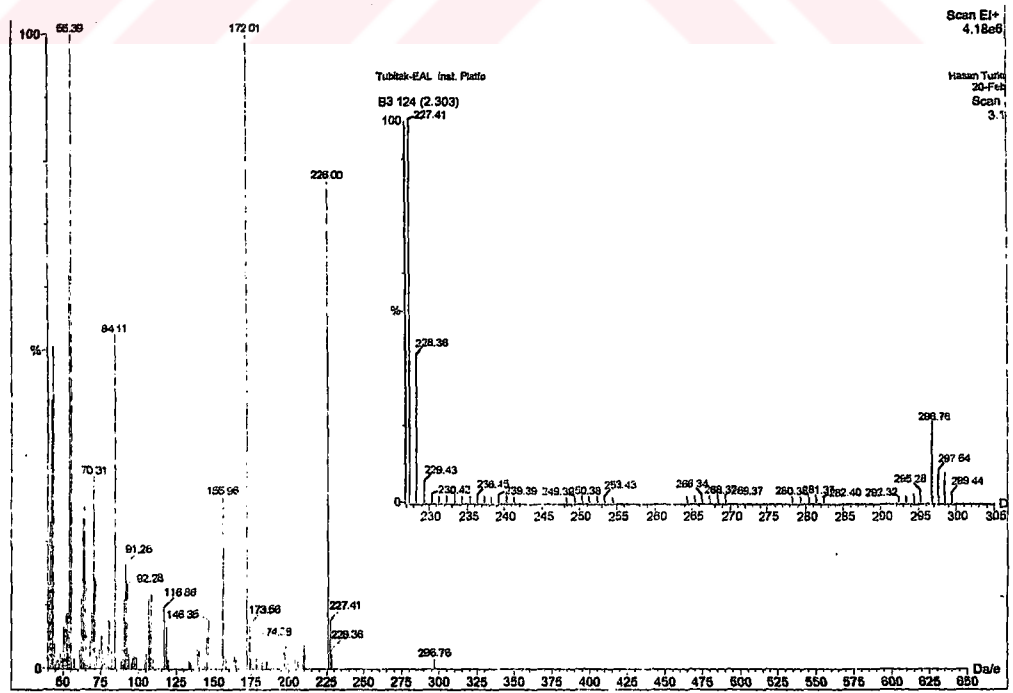


Ek Şekil 4.2. 4-(3-metilpiperazinopropanoilamino) benzen Sülfonamit (9)' un kütle spektrumu

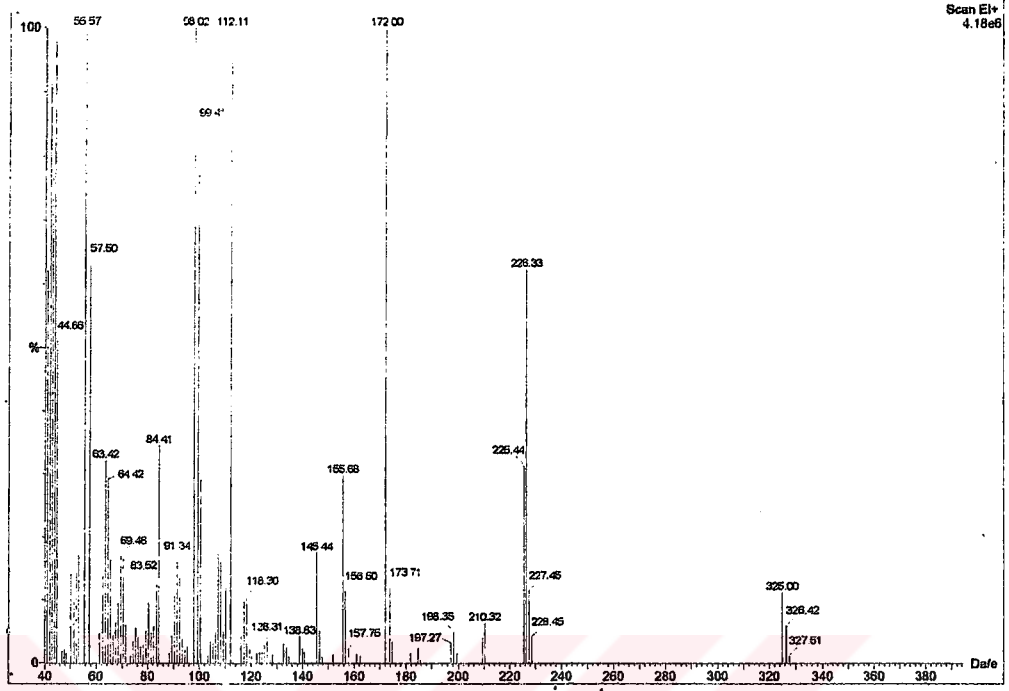




Ek Şekil 4.3. 4-(3-morfolinopropanoilamino) benzenülfonamit (10)' un kütle spektrumu



Ek Şekil 4.4. 4-(3-pirrolidinopropanoilamino) benzenülfonamit (11)' in kütle spektrumu



Ek Şekil 4.5. 4-(3-metilpiperidinopanoilamino) benzenşülfonamit (12)' nin kütle spektrumu

## ÖZET

Karbonik anhidraz inhibitörleri 1954 den beri glokom tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak karbonik anhidraz inhibitörlerinin sistematik yan etkileri olduğundan dolayı araştırmacılar yıllarca karbonik anhidraz inhibitörlerinin topical (damla) şeklini geliştirmeye çalışmışlardır.. Bu alandaki uzun çalışmalar sonucunda ilk topikal karbonik anhidraz inhibitörü olan Dorzolomit, Maren tarafından 1995 yılında sentezlenmiştir.

Sülfanilamit Mann ve Keilin tarafından 1940 yılında sentezlenmiş ve uzun bir zaman klinik alanlarda kullanılmış ilk karbonik anhidraz inhibitörüdür. Karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılan sülfonamidler başlıca antiglokom ilaçları, anti troid ilaçları ve bazı türevleride antikanser ilaçlar olarak kullanılmaktadır (Supuran ve Scozzafava, 2000; Maren, 1967; Drew, 2000; Owa ve ark., 2000). Aromatik ve heteroaromatik sülfanilamidlerin tümör hücrelerinin büyümesine engel olduğu görülmüştür (Chegwidden ve ark., 2000).

Karbonik anhidraz inhibitörlerini  $-RSO_2NH_2$  grubunda farklı gruplar içermeyen (dallanmamış) aromatik ve hetero halkalı sülfonamidler en güçlü inhibitörlerdir. Sülfonamidin inhibitör etkisini, herhangi bir N-dallanmış kısmı düşürürken, etkin bir inhibitör etkisi için  $-SO_2NH_2$  grubunun dallanmamış olması kabul edilir (Krebs, 1948). Büyük olasılıkla bunun sebebi aktif yerin sterik engel tarafından kısıtlanmasıdır.

Yaptığımız bu çalışmanın amacı, glokom tedavisinde kullanılan yeni sülfanilamit türevlerinin sentezi ve bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin araştırılmasıdır.

Bu çalışmada karbonik anhidraz inhibitörleri olan yeni sülfanilamit türevleri yüksek verim ve saflıkta sentezlendi. Bu bileşikler 4-(3-metilpiperazin propanoilamino) benzensulfonamid, 4-(3-morfolinpropanoilamino) benzen sulfonamid, 4-(3-pirrolidinpropanoilamino) benzensulfonamid ve 4-(3-metilpiperidin propanoilamino) benzensulfonamid' dir.

Sentezlenen bileşiklerin yapıları, elemental analiz, FT IR,  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR, Kütle spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

Elde edilen bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri de araştırıldı. Karbonik anhidraz inhibitör aktiviteleri (*in vitro*) UV-Vis spektrofotometre ile ölçüldü. Bu verilerle birlikte sülfanilamidlerin bölme katsayısı, sudaki çözünürlükleri gibi çeşitli fiziksel özellikleri de incelendi. Sentezlenen bileşiklerin asetazolamid ve sülfanilamitten daha güçlü inhibitör oldukları bulunmuştur. Bu bileşiklerin klinik çalışmaları da yapılmaktadır. Ümit ediyoruz ki bu bileşiklerin en az biri glokom tedavisi için kullanılacaktır.



## SUMMARY

Carbonic anhydrase inhibitors have been used for glaucoma therapy since 1954. However, because of the side systematic effects of carbonic anhydrase Inhibitors, Scientists have tried to develop topical form of Carbonic Anhydrase Inhibitors for years. At the end of a long period of studies on this area, First topical CAI, Dorzolamide, was synthesised by Maren in 1995.

Sulfanilamide is a first carbonic anhydrase inhibitor which was synthesised by Mann and Keilin in 1940 and has been in clinical use for a long time. The Sulfonamides with C.A.I properties mainly used as antiglaucoma agents, to some anti-thyroid drugs, to the hypoglycemic sulfonamides, and ultimately to some novel types of anticancer agents (Supuran and Scozzafava, 2000; Maren, 1967; Drew, 2000; Owa et al., 2000). There are many connections between CA and cancer. Several hundred aromatic/heterocyclic sulfonamides were assessed *in vitro* as potential inhibitors of growth of a multitude of tumor cell lines (Chegwidden et al., 2000).

The report of Krebs (1948), that mainly the unsubstituted aromatic sulfonamides of type  $\text{ArSO}_2\text{NH}_2$  act as strong CAIs, and that the potency of such a compound is drastically reduced by *N*-substitution at the sulfonamide moiety, constituted the beginning of extensive structure-activity correlations, that led to some valuable drugs in a short period.

The objective of the research project is the synthesis of novel derivatives of Sulfanilamide and investigation of their biological activity for glaucoma therapy.

Novel sulfanilamide derivatives as inhibitors of carbonic anhydrase was synthesized in the work. All novel sulfonamides were synthesized in high yield and purity. These compounds are 4-(3-methylpiperazinopropanoylamino) benzenesulfonamide, 4-(3-morpholinopropanoylamino) benzenesulfonamide, 4-(3-pyrrolidinopropanoylamino) benzenesulfonamide and 4-(3-methylpiperidino propanoylamino) benzenesulfonamide.

The structures of synthesized compounds were identified by elemental analyses, FT IR,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR and Mass Spectra.

Biological activity of these compounds have also been investigated. Carbonic anhydrase inhibitory activities (*in vitro*) were measured by uv-vis spectrophotometry. These data were then correlated with various physical properties of the sulfonamides including solubility of the compounds in water and partition coefficient. The synthesized compounds were found to be more potent inhibitor than acetazolamide and sulfanilamide. Clinical studies of these compounds should be studied. We hope that at least one of these compounds will be useful for glaucoma therapy.

