



**1-(4-AMİ NOSÜLFONİLFENİL)-3-(4-SÜBSTİTÜEFENİL)-5-(TİYOFEN-2-İL)-2-PİRAZOLİN BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBE EDİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Birnur CÖMEZ**

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Doç.Dr. Ebru METE**

**Yüksek Lisans Tezi-2016**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**1-(4-AMİNOSÜLFONİLFENİL)-3-(4-SÜBSTİTÜEFENİL)-5-  
(TİYOFEN-2-İL)-2-PİRAZOLİN BİLEŞİKLERİNİN  
SENTEZİ VE KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBE EDİCİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Birnur CÖMEZ**

**Farmasötik Kimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Ebru METE**


**ERZURUM  
2016**


T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI


1-(4-AMİNOSÜLFONİLFENİL)-3-(4-SÜBSTİTÜEFENİL)-5-  
(TİYOFEN-2-İL)-2-PIRAZOLİN BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE  
KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBE EDİCİ ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI


Birnur CÖMEZ


Tez Savunma Tarihi : 12.07.2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ebru METE 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. İlhami GÜLİN 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Hilmi GÜL 

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Mesen TÜRKER 

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Sinan BİLGİNER 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM  
Enstitüsü Müdürü

Yüksek Lisans Tezi  
ERZURUM- 2016

# İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi.....	3
2.1.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması .....	5
2.1.2. İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri.....	7
2.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri .....	11
2.3. Sülfonamidler.....	13
2.3.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Sülfonamidlerin Yapı-Aktivite İlişkileri.....	17
2.4. Pirazolinler.....	18
2.4.1. Pirazolinlerin Farmakolojik Aktiviteleri Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	20
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>23</b>
3.1. Materyal .....	23
3.1.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar .....	23
3.1.2. Yöntemler .....	23
3.1.2.1. Kromatografik Analizler.....	23
3.1.2.2. Spektral Analizler .....	23
3.1.2.3. Erime Noktası Tayinleri.....	23

3.2. 1,3-Diaril-2-propen-1-on Yapısındaki Şalkonların (A1-A8) Genel Sentez Yöntemi .....	24
3.3. 1-(4-Aminosülfonilfenil)-3-(4-süstitüefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin Bileşiklerinin (B1-B8) Genel Sentez Yöntemi .....	24
3.3.1. 4-(3-Fenil-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)benzensülfonamid'in Sentezi, B1 .....	25
3.3.2. 4-(5-Tiyofen-2-il)-3-(p-tolil)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il)benzensülfonamid'in Sentezi, B2 .....	25
3.3.3. 4-(3-(4-Metoksifenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B3 .....	26
3.3.4. 4-(3-(4-Klorofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B4 .....	26
3.3.5. 4-(3-(4-Florofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B5 .....	27
3.3.6. 4-(3-(4-Bromofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B6 .....	27
3.3.7. 4-(3-(4-Nitrofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B7 .....	28
3.3.8. 4-(3-(4-Hidroksifenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B8 .....	28
3.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	29
3.4.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve II) Saflaştırılması ve Karakterizasyonu .....	29
3.4.2. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibisyon Aktivitesinin Tayini.....	29
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>31</b>

<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>44</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>48</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>49</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>56</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>56</b>
<b>EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU</b> .....	<b>57</b>



## TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aŐamalarında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, destek olan ve tezimin her aŐamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ebru METE'ye ve tez çalışmamda bana her türlü olanağı sağlayan, anlayış ve hoşgörüsüyle çalışmalarımı destekleyen ikinci tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. İnci GÜL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez kapsamında NMR spektrumlarını alan Sayın Prof. Dr. Cavit KAZAZ ve Sayın Uzm. Dr. Barış ANIL'a, HRMS analizleri için Sayın Doç. Dr. Yusuf ÖZKAY ve Sayın Uzm. Serkan LEVENT'e, biyoaktivite çalışmalarındaki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN ve ekibine, tez çalışmamı destekleyen Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na (BAP proje No: 2013/289) en derin teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve katkıda bulunan tüm arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen, her türlü özveriği gösteren, bana güvenen annem ve babama çok teşekkür ederim.

**Birnur CÖMEZ**

## ÖZET

### **1-(4-Aminosülfonilfenil)-3-(4-süstitüefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin Bileşiklerinin Sentezi ve Karbonik Anhidraz İnhibe Edici Etkilerinin Araştırılması**

**Amaç:** Bu tez çalışmasında yapısında sülfonamid grubu içeren 1-(4-aminosülfonilfenil)-3-(4-süstitüefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin bileşiklerinin sentezlenmesi ve sentezlenen bileşiklerin hCA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibe edici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** İlk kademede Claisen-Schmidt Kondenzasyon yöntemi ile A1-A8 şalkon türevleri sentezlenmiştir. İkinci kademede katalitik miktarda glasiyel asetik asit içeren etanol içinde çözünmüş A1-A8 bileşiklerinin, 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür ile kondenzasyon reaksiyonu sonucunda benzensülfonamid içeren 1,3,5-trisüstitüe pirazolin türevi B1-B8 bileşikleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin CA inhibisyon aktivitesi, hCA I ve II izoenzimleri üzerine esteraz aktivitesi ölçülerek araştırılmıştır.

**Bulgular:** B1-B8 bileşikleri %41-85 verimle sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve HRMS ile doğrulanmıştır. Bu bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerleri hCA I için 299.48-521.84 nM, hCA II için 427.25-523.02 nM aralığında bulunmuştur. Bileşiklerin K<sub>i</sub> değerlerinin hCA I için 232.16-637.70 nM, hCA II için 342.07-455.80 nM aralığında olduğu tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Sentezlenen bileşikler, klinikte kullanılan referans bileşik asetazolamid ile karşılaştırılabilir inhibisyon etkinliği göstermiştir. Bu çalışmada hCA I ve II'ye karşı orta derecede etkinlik gösteren yeni sülfonamidler sentezlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fenoller, karbonik anhidraz inhibisyonu, pirazolinler, şalkonlar.



## ABSTRACT

### Synthesis and Investigation of Carbonic Anhydrase Inhibitory Activities of The Compounds 1-(4-Aminosulfonylphenyl)-3-(4-substituephenyl)-5-(thiophene-2-yl)-2-pyrazolines

**Aim:** In this study, it was aimed to synthesize the compounds of 1-(4-aminosulfonyl phenyl)-3-(4-substituephenyl)-5-(thiophen-2-yl)-2-pyrazolines having the sulfonamid scaffolds in their structures and to investigate the inhibitory effects of the synthesized compounds toward hCA I and II isoenzymes.

**Material and Method:** In the first step, chalcone derivatives (A1-A8) were synthesized by Claisen-Schmidt Condensation method. In the second step, the compounds 1,3,5-trisubstitue pyrazoline derivatives (B1-B8), which have benzenesulfonamide scaffolds, were synthesized by the condensation of A1-A8 with 4-hydrazinobenzenesulfonamide hydrochloride in ethanol in the presence of catalitic amount of glacial acetic acid. CA inhibitory activities of the synthesized compounds were investigated by measuring esterase activities towards hCA I and II isoenzymes.

**Results:** The compounds B1-B8 were synthesized with yields of 41-85%. Chemical structures of the synthesized compounds were confirmed by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and HRMS.  $\text{IC}_{50}$  values of the compounds were found in the range of 299.48-521.84 nM towards hCA I and the range of 427.25-523.02 nM towards hCA II.  $\text{K}_i$  values of the compounds were in the range of 232.16-637.70 nM towards hCA I while it was in the range of 342.07-455.80 nM towards hCA II.

**Conclusion:** The synthesized compounds showed comparable inhibitory activity with the reference compound, clinically used asetazolamide. In this study, a new sulfonamides which showed moderate activity towards hCA I and hCA II were sytnthesized.

**KeyWords:** Carbonic anhydrase inhibition, chalcones, phenols, pyrazolines.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AZA</b>	: Asetazolamid
<b>CA</b>	: Karbonik Anhidraz
<b>CA I</b>	: Karbonik Anhidraz I izoenzimi
<b>CA II</b>	: Karbonik Anhidraz II izoenzimi
<b>CAI</b>	: Karbonik Anhidraz İnhibitörü
<b>CARP</b>	: Karbonik Anhidraz İlişkili Protein
<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	: <sup>13</sup> C Nükleer Manyetik Rezonans
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>Co<sup>+2</sup></b>	: Kobalt (II) İyonu
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	: Dötorodimetilsülfoksit
<b>Glu 106</b>	: Glutamik asit 106
<b>hCA I</b>	: İnsan Karbonik Anhidraz I izoenzimi
<b>hCA II</b>	: İnsan Karbonik Anhidraz II izoenzimi
<b>hCA IX</b>	: İnsan Karbonik Anhidraz IX izoenzimi
<b>hCA XII</b>	: İnsan Karbonik Anhidraz XII izoenzimi
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	: Bikarbonat
<b>HIF</b>	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör
<b>His</b>	: Histidin
<b>HOMO</b>	: En Yüksek Dolu Moleküler Orbital
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	: <sup>1</sup> H Nükleer Manyetik Rezonans
<b>IC<sub>50</sub></b>	: % 50 İnhibisyona Sebep Olan İnhibitör Konsantrasyon
<b>IOP</b>	: İntraoküler Basınç
<b>İTK</b>	: İnce Tabaka Kromatografisi
<b>K<sub>i</sub></b>	: İnhibisyon Sabiti

<b>L<sub>3</sub></b>	: Üç Protein Ligandı
<b>L<sub>3</sub>-M<sup>+2</sup>-OH<sup>-</sup></b>	: Karbonik Anhidraz Enziminin Metal Hidroksit Türevi
<b>M<sup>+2</sup></b>	: Metal (II) İyonu
<b>NPA</b>	: para-Nitrofenil asetat
<b>QSAR</b>	: Kantitatif Yapı-Aktivite İlişkileri
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>Thr 199</b>	: Tirozin 199
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>ZBF</b>	: Çinko Bağlama Fonksiyonu
<b>Zn<sup>+2</sup></b>	: Çinko (II) İyonu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Karbondioksitin bikarbonata ve protona geri dönüşümlü hidrasyonu .....	3
Şekil 2.2. Karbondioksit hidrasyon reaksiyonunun iki basamaklı gösterimi .....	3
Şekil 2.3. CA II izoenziminin aktif bölgesinin şematik olarak gösterimi .....	5
Şekil 2.4. $\alpha$ -Karbonik anhidrazların katalitik ve inhibisyon mekanizması .....	6
Şekil 2.5. Karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmalarının şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.6. Sülfonamid inhibitörü ile hCA II arasındaki etkileşimin şematik gösterimi..	15
Şekil 2.7. Klinikte kullanılan antiglokom ilaçların açık yapıları.....	16
Şekil 2.8. hCA II aktif bölgesi ile benzensülfonamidin bağlanma şeklinin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.9. 2-Pirazolinin açık formülü.....	18
Şekil 2.10. Pirazolinlerin kısmi olarak indirengenmiş üç formu.....	19
Şekil 2.11. Hidrazinler ile şalkonların siklizasyon reaksiyonu ile 2-pirazolinlerin oluşumu.....	20
Şekil.3.1. Şalkon (A1-A8) ve pirazolin (B1-B8) türevlerinin genel sentez yöntemi ....	25
Şekil 4.1. B1 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	35
Şekil 4.2. B1 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.....	35
Şekil 4.3. B2 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	36
Şekil 4.4. B2 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu .....	36
Şekil 4.5. B3 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	37
Şekil 4.6. B3 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.....	37
Şekil 4.7. B4 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	38
Şekil 4.8. B4 bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.....	38
Şekil 4.9. B5 bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu .....	39

<b>Şekil 4.10.</b> B5 bileşiğinin $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.....	39
<b>Şekil 4.11.</b> B6 bileşiğinin $^1\text{H}$ -NMR spektrumu.....	40
<b>Şekil 4.12.</b> B6 bileşiğinin $^{13}\text{C}$ -NMRspektrumu .....	40
<b>Şekil 4.13.</b> B7 bileşiğinin $^1\text{H}$ -NMR spektrumu .....	41
<b>Şekil 4.14.</b> B7 bileşiğinin $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.....	41
<b>Şekil 4.15.</b> B8 bileşiğinin $^1\text{H}$ -NMR spektrumu.....	42
<b>Şekil 4.16.</b> B8 bileşiğinin $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu.....	42



## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 4.1.</b> B1-B8 bileşiklerinin <sup>1</sup> H-NMR verileri .....	32
<b>Tablo 4.2.</b> B1-B8 bileşiklerinin <sup>13</sup> C-NMR verileri .....	33
<b>Tablo 4.3.</b> B1-B8 bileşiklerinin HRMS verileri.....	34
<b>Tablo 4.4.</b> B1-B8 bileşiklerinin deneysel verileri .....	34
<b>Tablo 4.5.</b> B1-B8 bileşiklerinin hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon değerleri.....	43



# 1. GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA) izoenzimleri tüm canlı organizmalarda yaygın olarak bulunan metaloenzimlerdir.<sup>1,2</sup> Karbonik anhidrazlar basit bir reaksiyon olan karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) arasındaki dönüşümü katalizler. Bu reaksiyon sayesinde pH kontrolü, iyon taşınması ve sıvı salgılanması ile ilişkili birçok fizyolojik işlem gerçekleşir.<sup>3,4</sup>

Birçok hastalıkta karbonik anhidraz izoenzimlerinin etkilerinin olduğunun keşfedilmesi sonucunda bu enzimler potansiyel ilaç hedefi olarak düşünülmüştür ve bu konu üzerine yapılan araştırmalar büyük oranda artmıştır.<sup>5</sup> Karbonik anhidraz izoenzimleri antiglokom, antiobezite, antidiüretik, antiepileptik, analjezik, anti-inflamatuvar ve antitümör etkiler gösteren terapötik ajanlar olarak klinikte uygulanabilen ve en çok araştırılan proteinlerden biridir.<sup>6,7</sup>

Memelilerde şimdiye kadar 16 farklı karbonik anhidraz izoenzimi tanımlanmıştır. Karbonik anhidraz I (CA I) ile karbonik anhidraz II (CA II) eritrositlerde ve sitozolde yüksek konsantrasyonlarda bulunan iki temel karbonik anhidraz izoenzimleridir. CA II tüm karbonik anhidrazlar içinde en aktif olandır.<sup>2,4,8</sup> Ayrıca CA I ve CA II inhibitörlerinde antiglokom ve diüretik etkiler yaygın olarak görülmektedir.<sup>9</sup>

Sülfonamidler ilk olarak keşfedilen organik karbonik anhidraz enzim inhibitörleridir. Primer sülfonamid grubu içeren aromatik veya heterosiklik bileşikler yeni karbonik anhidraz inhibitörleri keşfedebilme amacıyla yaygın olarak çalışılmıştır. Bu yapıdaki sülfonamid türevlerinin üyelerinden olan asetazolamid (AZA), metazolamid (MZA), etoksizolamid (EZA) klinikte yaygın olarak kullanılan karbonik anhidraz inhibitörleridir.<sup>6</sup>

Pirazolinler beş üyeli halkada iki azot atomu içeren önemli bir heterosiklik bileşik sınıfıdır.<sup>10</sup> Antimikrobiyal, antimikobakteriyel, antifungal, antiamebik, anti-

inflamatuvar, analjezik, antidepresan ve antikanser aktivitesi gibi önemli bazı biyolojik etkilere sahiptirler.<sup>11</sup> Bu bileşikler genellikle alkol içerisinde hidrazin ve hidrazin türevleri ile şalkonların siklizasyon reaksiyonu yoluyla hazırlanır. Literatür incelemesi pirazolin çekirdeklerinin oldukça kararlı yapılar olduğunu ve biyolojik aktiviteye sahip yeni bileşikler sentezlemek amacıyla tercih edildiklerini gösterir.<sup>12</sup> 2-pirazolinlerin literatürde üzerinde en sık çalışılan pirazolin türevi bileşikler olduğu görülür.<sup>10</sup>

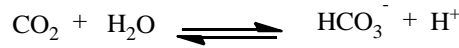
Bu tez çalışmasında 1-(4-aminosülfonilfenil)-3-(4-süstitüefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin bileşikleri sülfonamid grubu içerdiğinden CA I ve II enzimleri üzerinde inhibe edici etkilerini araştırılması tasarlanmıştır. Böylece, CA inhibitörleri olabilecek sülfonamid yapısında yeni bileşikler bulunması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

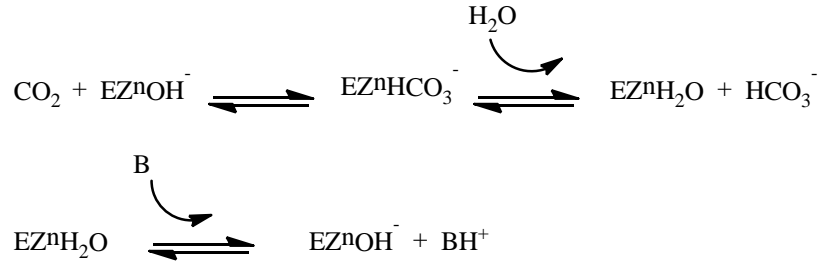
### 2.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidrazlar, genetik olarak altı farklı sınıf olan  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ - ve  $\eta$ - aileleri şeklinde tüm canlı aleminde bulunur. Karbonik anhidrazlar, basit ama tüm canlı aleminde önemli bir reaksiyonu; yani  $\text{CO}_2$ 'nin bikarbonat ve protona ( $\text{H}^+$ ) hidrasyonunu katalizler (Şekil 2.1).<sup>2,4</sup>



#### Şekil 2.1. Karbondioksitin bikarbonata ve protona geri dönüşümlü hidrasyonu

Karbondioksitin bikarbonata geri dönüşümlü hidrasyonu iki basamaklı bir reaksiyonla gerçekleşir. Hidrasyonun ilk basamağı çinko (II) iyonuna ( $\text{Zn}^{+2}$ ) bağlanan nükleofilik bir hidroksinin atağı sonucu  $\text{CO}_2$ 'nin  $\text{HCO}_3^-$ 'e dönüşümüdür. Bundan sonra bir su molekülü çinkoya bağlanmış bikarbonatın yerine geçer ve bikarbonatı ortama salar. İkinci basamakta bir proton, çinko bağlı su molekülünden bir akseptöre transfer olur (Şekil 2.2).<sup>1</sup>



#### Şekil 2.2. Karbondioksit hidrasyon reaksiyonunun iki basamaklı gösterimi

$\text{CO}_2$ , bikarbonat ve protonlar, filogenetik ağaçtaki tüm organizmalarda birçok fizyolojik işlemde yer alan önemli moleküllerdir. Sonuçta, bu proteinler yüksek miktarlarda çeşitli dokularda ve hücrelerde bulunur. Bu proteinleri kodlayan ilk genetik aile,  $\alpha$ -CA, omurgalılarda, protozoalarda, alglerde ve yeşil bitkiler ile bakterilerin sitoplazmasında bulunur.<sup>4,13</sup>  $\beta$ -CA büyük oranda bakteri, algler ile mono- ve dikotiledonların kloroplastlarında bulunur, fakat aynı zamanda bazı alg ve mantarlarda

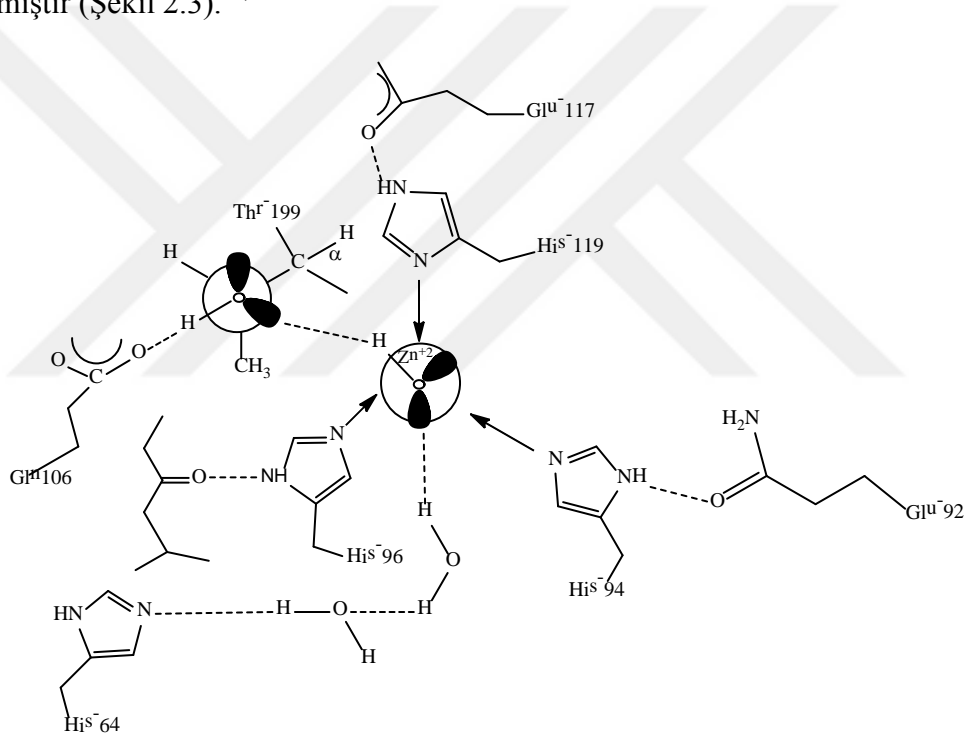
da bulunur.  $\gamma$ -CA, alglerde ve bazı bakterilerde bulunur, oysa  $\delta$ - ve  $\zeta$ -CA'nın yalnızca deniz diatomlarında bulunduğu görülmüştür. Tüm bu organizmalarda, karbonik anhidrazlar; solunum, metabolize edici dokular ve akciğerler arasında CO<sub>2</sub>/bikarbonat taşınması, pH ve CO<sub>2</sub> homeostazisi, çeşitli doku/organlarda elektrolit sekresyonu, biyosentetik reaksiyonlar (glukojenez, lipojenez ve ürojenez), kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve diğer fizyolojik veya patolojik işlemler ile bağlantılı fizyolojik işlemlerde yer alır.<sup>13</sup>

Şimdiye kadar keşfedilmiş tüm karbonik anhidrazlar metaloenzimlerdir.  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\delta$ -CA aktif bölgelerinde Zn<sup>+2</sup> iyonu bulunur,  $\gamma$ -CA'da muhtemelen demir (II) iyonu (Fe<sup>+2</sup>) vardır fakat Zn<sup>+2</sup> veya kobalt (II) iyonlarına (Co<sup>+2</sup>) bağlandığı zaman da aktiftir.  $\zeta$ -CA sınıfı fizyolojik reaksiyonları katalizlemek için kadmiyum (II) iyonu (Cd<sup>+2</sup>) veya Zn<sup>+2</sup> kullanır. Bu beş enzim ailesinin üç boyutlu yapısı oligomerizasyonları nedeniyle birbirinden çok farklıdır.  $\alpha$ -CA normalde monomer ve nadir olarak dimer halindedir (CA IX ve XII).  $\beta$ -CA dimer, tetramer veya oktamere halinde;  $\gamma$ -CA trimer halinde  $\delta$ - ve  $\zeta$ -CA ise muhtemelen monomer halinde bulunur.<sup>13</sup>

Memelilerde şimdiye kadar izole ve karakterize edilen 16 farklı  $\alpha$ -CA izoenzimi vardır. Bunlar sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII, CA XIII), membrana-bağlı (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV, ve CA XV), mitokondriyel (CA VA ve CA VB) ve salgı (CA VI) enzimlerdir. Ayrıca, CA-ilişkili proteinler (CARP) olarak adlandırılan ve katalitik olmayan sitozolik üç tane formu vardır: Bunlar CARP VIII, CARP X ve CARP XI'dir.<sup>2,7,13</sup>

## 2.1.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Yapısı ve Reaksiyon Mekanizması

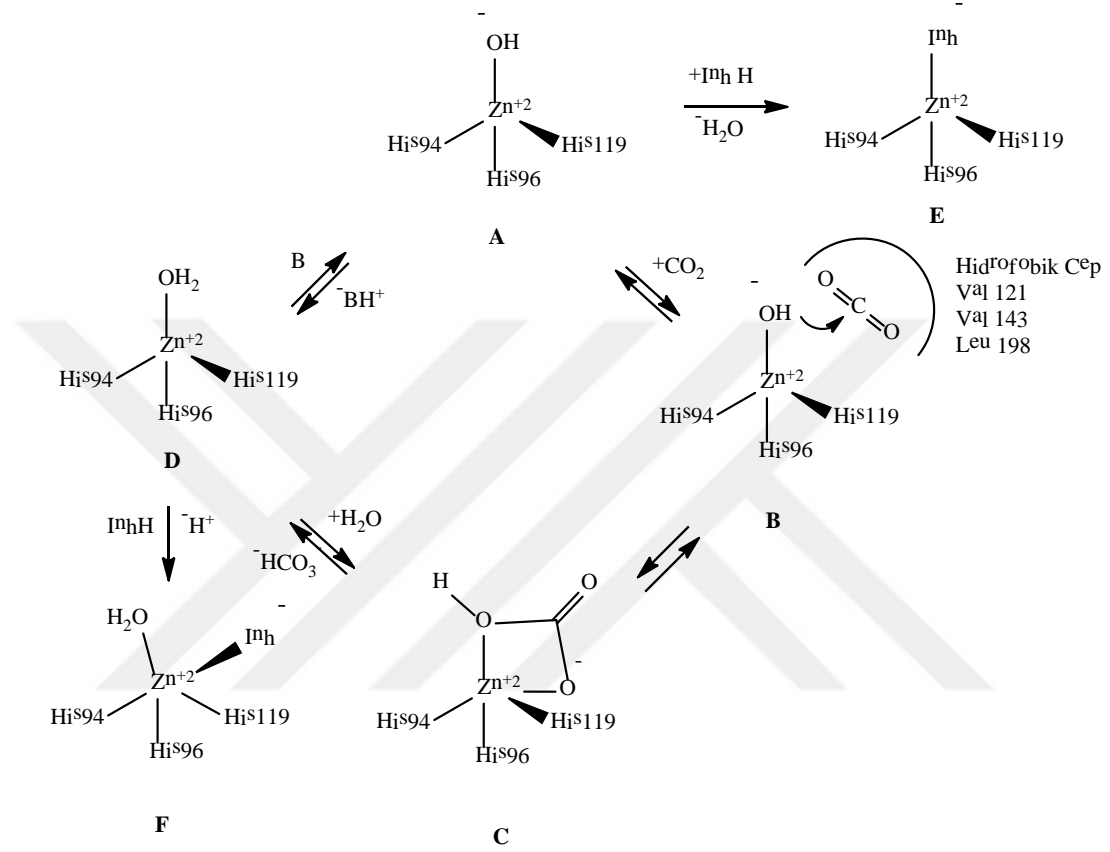
Katalitik olarak aktif tüm izoenzimler aktif bölgelerinde, korunmuş üç histidin rezidüsü (His 94, His 96 ve His 119) ve bir su molekülü/hidroksil iyonu ile tetrahedral şekilde bağlanan bir çinko iyonu içerir.<sup>5</sup> Enzim, yaklaşık 15 Å<sup>0</sup> derinlikte bir konik yarıklık oluşturan aktif bölgesi ile küresel bir yapıya benzemektedir. Kavitenin bir tarafı hidrofobik rezidülerden oluşmuştur. Diğer tarafı tirozin 199 (Thr 199) ve glutamik asit 106 (Glu 106) içeren hidrofilik rezidüler içerir. Çinko iyonu bu kavitenin alt kısmına yerleşmiştir (Şekil 2.3).<sup>14,15</sup>



Şekil 2.3. CA II izoenziminin aktif bölgesinin şematik olarak gösterimi

Karbonik anhidrazların katalitik mekanizması yapılan çalışmalarla detaylı olarak araştırılmıştır. Tüm enzim sınıflarında enzimin metal hidroksit türevleri (L<sub>3</sub>-M<sup>+2</sup>-OH<sup>-</sup>) katalitik olarak aktif türleridir ve nötral pH'da güçlü bir nükleofil olarak hidrofobik cebin yakınına bağlı CO<sub>2</sub> molekülüne atak eder.<sup>16,17</sup> Bu metal hidroksit türleri aktif bölge kavitesinin altında bulunan metal iyonuna koordine olan sudan oluşturulur (Şekil 2.4).<sup>17</sup> Aktif merkez, su molekülü/hidroksil iyonu ile birlikte üç protein ligandı (L<sub>3</sub>) ve

metal (II) ( $M^{+2}$ ) iyonlarından tetrahedral yapıda oluşur, fakat  $\gamma$ -CALarda  $Zn^{+2}$  ve  $Co^{+2}$  aynı zamanda trigonal biprimal veya oktahedral koordinasyon geometrisinde de gözlenmiştir. Birçok enzimde, metal-bağlı su molekülünden metal hidroksitin üretimi katalitik dönüşümde hız belirleyici basamaktır.<sup>16,17</sup>



**Şekil 2.4.**  $\alpha$ -Karbonik anhidrazların katalitik ve inhibisyon mekanizması

$\alpha$ -Sınıf enzimlerde  $CO_2$  substratı  $Zn^{+2}$  iyonunun yakınında bulunan Val 121, Val 143 ve Leu 198 rezidülerinden oluşan hidrofobik bir cebe bağlıdır (Şekil 2.4.B). Nükleofilik atak için tercih edilen bir pozisyona yönlendirilen  $CO_2$ , Şekil 2.4.C'de gösterildiği gibi  $Zn^{+2}$  iyonu ile iki bağ oluşturarak bikarbonata dönüşür. Bikarbonatın çinkoya bağlanması daha kararsızken, ara ürün C su molekülü ile reaksiyona girerek kolayca ürün D'ye dönüşür ve çözeltiye bikarbonat salar. Bu sayede enzimin asidik formu olan metal iyonuna bağlı su molekülü oluşturulur (Şekil 2.4.D) ve katalitik olarak aktif değildir.<sup>17</sup>

Enzim A'nın nükleofilik olarak aktif türlerinin oluşumu çinko-koordine su molekülünden (D türleri) tampon ortamına bir protonun verilmesiyle gerçekleştirilir, aynı zamanda tüm prosesin hız belirleyici basamağıdır. Birçok CA izoenziminde ve muhtemelen birçok enzim sınıfında proton taşıma işlemine katılabilen bir aktif bölge rezidüsü bulunur. İnsan karbonik anhidraz II (hCA II) ve diğer insan izoformları için bu rezidü His 64'tür. hCA II'de His4, His3, His10 ve His15 rezidülerinden oluşan bir histidin kümesi de proton taşınma işlemine yardımcı olmaktadır.<sup>17</sup>

### **2.1.2.İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri**

Memeliler 16 tane  $\alpha$ -CA'ya sahiptir; bunlar CA I-XV, iki adet V-tip izoenzimi, CA VA ve CA VB'dir. Primatlarda CAXV yoktur, bu yüzden sadece 15 tane karbonik anhidraz bulunmaktadır. Bunların 12 tanesi katalitik aktiviteli (CA I-IV, IX ve XII-XIV), kalan üçü ise (CA VIII, X ve XI) CA-ilişkili proteinler (CARP) olarak adlandırılır ve katalitik aktiviteleri yoktur.<sup>5</sup>

Bir organizmada birden fazla CA izoenzimi bulunmaktadır. Birçok dokuda farklı izoenzimler bir arada bulunur, fakat aynı zamanda sadece birinin baskın olduğu birkaç doku ve organ da vardır. Memeli karbonik anhidrazları aktive veya inhibe edilebilme özellikleri nedeniyle birçok hastalığı tedavi etmek için terapötik hedef oluşturur. Şu anda, CA inhibitörü oluşu bilinen diüretik, antiglokom, antiepileptik, antiobezite ve antikanser ilaçları mevcuttur ve çeşitli memeli  $\alpha$ -CA izoenzimlerini hedeflemektedirler.<sup>13</sup>

1961 yılında insan eritrositlerinden enzimin saflaştırılması sonucunda iki form açığa çıkmıştır. Birincisi, diğerinden daha fazla miktarda bulunduğu halde daha az aktiviteye sahiptir. İkinci form ise daha az miktarlarda bulunsa da, sığır CA enzimininkine benzer şekilde yüksek aktiviteye sahiptir. Bu yüksek ve düşük aktiviteli izoenzimler, sırasıyla CA II ve CA I olarak bilinmektedir.<sup>14</sup>

CA II, CO<sub>2</sub> hidrasyonu için  $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$  maksimum dönüşüm hızı ile yüksek aktiviteli bir izoenzimdir ve neredeyse her doku veya organdaki bazı hücre tiplerinin sitozolünde eksprese edildiğinden insan vücudunda en geniş dağılıma sahiptir.<sup>14</sup>

Bazı hücrelerde CA II asit-baz homeostazisine katkı sağlamada temel bir rol oynar. Gastrik paryetal hücrelerin, üriner asidifikasyonu oluşturan renal tübüler hücrelerin ve kemik-rezorbe edici kompartmanlarda pH'yı asite çeken osteoklastların H<sup>+</sup> salgılamalarını sağlar. CA II pankreatik kanal hücrelerinde, göz sıvısını üreten siliyer cisimcik epitelinde, serebrospinal sıvıyı üreten koroid pleksusta, tükürük bezi asinar hücrelerinde ve elektrolit ve su dengesinin oluşmasına yardımcı olan distal kolon epitelinde HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salgılanmasını sağlar. CA II aynı zamanda böbrekte proksimal tübüllerde, eritrositlerde ve akciğerde CO<sub>2</sub> değişimine katkıda bulunur. Ayrıca CA II'nin yağ asidi ve aminoasit sentezinde de rol oynadığı bildirilmiştir.<sup>14</sup>

CA II'nin seçici aktivasyonu,  $\beta$ -adrenerjik stimülasyon sonucu siliyer cisimciklerinde sıvı oluşumunu artırır ve bununla birlikte gözün arka odasına sıvının taşınmasını da artırır, böylece göz içi basıncı (IOP) artar. Bu nedenle IOP'u azaltmak için CA II'yi inhibe eden ilaçlar kullanılmaktadır.<sup>18</sup>

CA I insan eritrositlerinde CA II'ye göre 5-6 kat daha çok bulunur, fakat yaklaşık olarak %15'i kadar aktiviteye sahiptir. Böylece, eritrositlerde CA I toplam CA aktivitesinin yaklaşık %50'sine katkı sağlar. CA I, Cl<sup>-</sup> ve diğer halojen iyonları ile inhibisyona CA II'den çok daha duyarlıyken sülfonamid inhibitörlerine daha az duyarlıdır. CA I kırmızı kan hücrelerinde hemoglobin haricinde en yaygın bulunan protein olmasına rağmen eksikliğinden kaynaklanan hematolojik bir anormallik yoktur.<sup>14</sup>

CA I ve II izoenzimlerinin aktif bölge yapısındaki temel farklılık CA I'de çok sayıda histidin rezidüsü bulunmasıdır. Böylece, çinko ligandlarına (His 94, His 96 ve

His 119) ek olarak, His 64 katalizde önemli bir rol oynar. His 64, CA II'nin aktif bölgesinde bulunan diğer histidin rezidüsüdür, oysa CA I'de böyle üç tane rezidü vardır; His 67, His 200 ve His 243. İki izoenzim arasındaki bir diğer önemli farklılık CA II'nin histidin kümesi içermesidir. Bu histidin kümesi CA I'de olmayan His 64, His 4, His 3, His 10, His 15 ve His 17 (aktif bölgenin ortasından kavitenin kenarına uzanan ve proteinin yüzeyi üzerine çıkan) rezidülerinden oluşur. Bu iki izoenzim aynı zamanda iki temel sınıf inhibitöre farklı afinite gösterir: CA I, anyonlara (siyanid, tiyosiyanat, siyanat, halojenürler,vb. gibi) CA II'den daha fazla afinite gösterir. CA II ise CA I'e göre sülfonamide karşı daha yüksek afiniteye sahiptir.<sup>19</sup>

Sonradan keşfedilen izoenzimler keşif sırasına göre numaralandırılarak isimlendirilmiştir. CA III ilk olarak 1974'te erkek sıçanların karaciğer homojenatında bulunmuştur. CA III çok düşük aktiviteli bir izoenzimdir, CO<sub>2</sub> hidrasyonu için aktivitesi yalnızca CA II'ninkinin %1'i kadardır. Aynı zamanda CA III sülfonamidlere karşı duyarsız bir izoenzimdir.<sup>14</sup>

CA IV sığır akciğerinden 1982'de saflaştırılmıştır ve membran-ilişkili bir enzim olarak tanımlanmıştır. Disülfid bağlarından dolayı kararlı bir yapıda olan, sodyum dodesil sülfata (SDS) dirençli ve 52 kDa ağırlığında bir glikoprotein olduğu bulunmuştur. CA IV nefronun bazı segmentlerindeki epitel hücrelerinin apikal yüzeylerinde, alt gastrointestinal yolda apikal hücre membranında ve kapiler endotel hücrelerinin hücre yüzeyinde eksprese edilir. CA IV enzimi de CA II gibi yüksek aktiviteli bir enzimdir. CA IV aynı zamanda insan gözünün koryo-kapilleri, iskelet ve kalp kaslarının mikrokapilleri, sıçan ve insan kolonundaki mikrovaskülerin endotel hücrelerinin membran yüzeyinde eksprese edilir. CA IV böbrekte bikarbonat rezorbsiyonunun %85'ini sağlayan böbreğin proksimal tübülündeki luminal karbonik

anhidrazdır. Akciğerde, alveol membranından difüze olan CO<sub>2</sub>'in bikarbonata dehidrasyonu gerçekleştirilerek kandan alveollere CO<sub>2</sub> değişimine katkıda bulunur.<sup>14</sup>

Mitokondriyel bir izoenzim olan CA V'in iki metabolik yolak için önemli olduğu önerilmiştir. Bu iki yoldan biri olan glukoneojenezde CA V mitokondride piruvat karboksilaza ve diğer yolak ürejenizde ise CA V mitokondride karbamil fosfat sentetaza HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sağlamak için gerekebilir.<sup>14</sup>

İzoenzim CA VI tükürüğe salgılanan bir glikoproteindir. Tükürükte karbonik anhidraz aktivitesi 1946'da fark edilmiştir. 1979'da koyun tükürük CA'sı izole edilmiştir ve diğer karbonik anhidrazilardan farklı olduğu bulunmuştur. 1987'de insan CA VI izoenziminin ve 1989'da ise koyun CA IV izoenziminin tüm sekansı yayınlanmıştır.<sup>14</sup>

İnsan CA IX ve XII (hCA IX ve hCA XII), tümör ilişkili ve transmembran karbonik anhidraz izoenzimleri olarak tanımlanır. CA IX ve XII izoenzimleri çoğunlukla tümör hücrelerinde bulunur ve normal dokularda sınırlandırılmış bir ekspresyon gösterir.<sup>16</sup> Ekspresyonları hipoksiyle indüklenen faktör (HIF) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenir ve hipoksi tarafından güçlü bir şekilde indüklenir.<sup>20</sup> CA IX ve XII önemli derecede solid tümörlerin ekstraselüler asidifikasyonuna katkıda bulunur.<sup>16</sup> Bu izoenzimler malignitenin büyümesi ve devamlılığında başlıca rol alırlar çünkü ekstraselüler ve intraselüler pH'yı düzenler, hücre adhezyonunu kontrol eder ve solid tümörlerde birkaç adaptif değişikliğe katkıda bulunurlar.<sup>21</sup>

16 adet CA izoenzimi çok çeşitli fizyolojik işlemlerde yer almaktadır, sonuçta bu izoenzimlerin çalışmamaları veya değişmiş ekspresyonları patolojik durumları başlatabilmektedir. Birçoğu aktive veya inhibe edilebilme ihtimalinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisinde terapötik hedef oluşturur.<sup>21</sup>



## 2.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

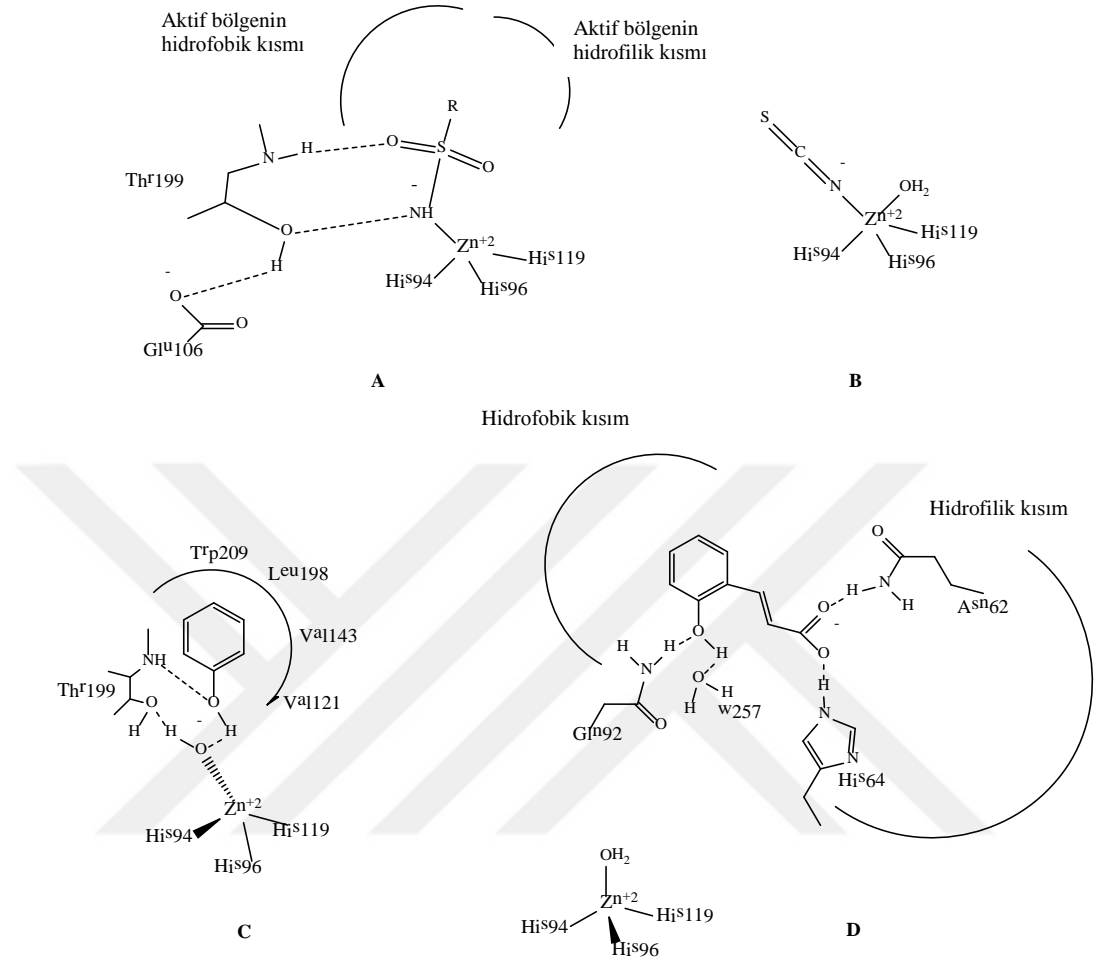
Karbonik anhidraz inhibitörlerinin (CA I) temel sınıfı sülfonamidler ve sülfonamid izosterleridir (sülfamat/sülfamidler) ve yıllardır diüretik, antiglokom, antiepileptik ilaç olarak klinikte kullanılır. Daha sonra karbonik anhidraz inhibitörlerin diğer sınıfları da yayınlanmıştır ve birçoğu sülfonamidlerden farklı bir mekanizma ile karbonik anhidraz enzimini inhibe eder. Karbonik anhidraz inhibitörlerinin diğer sınıfını fenoller, poliaminler, bazı karboksilatlar ve sülfokumarinler oluşturur. Kumarinler ve bazı lektonların da ön ilaç CA I olduğu gösterilmiştir.<sup>22</sup>

İnhibitörler genel olarak deprotonlanmış bölgede enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna tetrahedral geometride bağlanır, eğer trigonal bipiramidal geometride ise inhibitöre ek olarak bir su molekülü aynı zamanda  $Zn^{+2}$ ,ye bağlanır.<sup>15</sup> Anyonların, inorganik metal-kompleks oluşturucuların veya karboksilatlar gibi daha karmaşık yapıları türlerin de aynı zamanda karbonik anhidrazilere bağlandığı bilinir, fakat genel olarak sülfonamidlere göre daha az etkindirler.<sup>23</sup>

Metal merkeze bağlanmadan gerçekleşen diğer inhibisyon mekanizmaları da bildirilmiştir. Bu mekanizmalarda CA I doğrudan enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna bağlanmaz. Örneğin poliaminler  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlı su molekülü/hidroksil iyonuna tutunarak enzime bağlanır.<sup>17</sup>

Karbonik anhidraziler dört mekanizma ile inhibe edilir (Şekil 2.5)<sup>13</sup>; (i) Çinkoya bağlı su molekülünün veya hidroksil iyonunun yerine geçer ve  $Zn^{+2}$ ,nin tetrahedral bir geometri oluşturmasına yol açar; bu mekanizmaya örnek sülfonamidlerdir.(ii)  $Zn^{+2}$  iyonu trigonal bipiramidal geometrisinde olduğu zaman metal koordinasyon küresine inhibitör eklenir; tiyosiyanatlar bu şekilde inhibisyon yapar. (iii) İnhibitör  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlı çözücü molekülüne, örneğin, bir su molekülüne veya hidroksil iyonuna bağlanır, bu mekanizmaya örnek olarak fenoller verilebilir. (iv) CA inhibitörü aktivatör bağlanma

bölgesine bağlanarak aktif bölge kavitesinin girişini kapatır. Kumarinler, lakosamidler ve fullarenler bu yolla CA enzimine bağlanır.<sup>13</sup>



**Şekil 2.5.** Karbonik anhidraz inhibisyon mekanizmalarının şematik gösterimi

Memelilerde bulunan 16 tane CA izoenziminde aktif bölge kavitesinin alt kısmı tüm izoenzimlerde aynıdır, oysa aminoasit diziliminde en fazla farklılığın olduğu bölgeler sadece aktif bölgenin girişinde bulunur. Bu sebeple CA I'nin aktif bölge kavitesindeki  $Zn^{+2}$  yerine aktif bölge girişine bağlanması inhibitörün CA izoenzimine karşı seçiciliğini sağlayabilir.<sup>13</sup>

CA inhibitörlerindeki farmakofor gruplarının karbonik anhidraz enzimini tanınması için üç temel yapı elementi ortaya konmuştur. Birincisi  $\alpha$ -sınıfa ait tüm karbonik anhidrazlarda korunmuş Thr199 ve Glu106 rezidüleri ve aktif bölgedeki metal iyonu ile etkileşimi ifade eden çinko bağlama fonksiyonudur (ZBF). İkincisi aktif

bölgenin hidrofilik yarısı ile olduğu kadar hidrofobik yarısı ile de etkileşen genellikle aromatik veya heteroaromatik bir halka olan organik kısımdır. Üçüncüsü organik kısma eklenen bir kuyruktur.<sup>24</sup>

CA I'in izoenzimlere spesifitesini artırmak ve metale daha sıkı bağlanmayı sağlamak için birçok çalışma inhibitörlerin organik kısmına ve kuyruk kısmı modifikasyonlarına odaklanmıştır. Etkin CAI'nin tasarımı için iki genel yaklaşım geliştirilmiştir; (i) ZBF'ye sahip sülfonamidin eklendiği çeşitli halka sistemlerinden oluşan (aromatik veya heteroaromatik) oluşan ve topikal antiglokom ajanları dorzolamid ve brinzolamidin keşfi için kullanılan "halka" yaklaşımı ve (ii) Bu farmakolojik ajanların suda çözünürlüğü ve enzim-bağlama kapasitesi gibi fizikokimyasal özelliklerini düzenlemek için aromatik veya heterosiklik sülfonamid kısımlarına çeşitli kuyrukların eklenmesinden oluşan "kuyruk" yaklaşımıdır.<sup>24</sup>

Karbonik anhidraz inhibitörlerinin sentezi ve tasarımında akılcı ilaç tasarımı sayesinde oldukça ilerleme sağlanmıştır ve şu an farklı sınıf bileşiklere ait birçok türev bilinmektedir.<sup>24</sup>

### **2.3. Sülfonamidler**

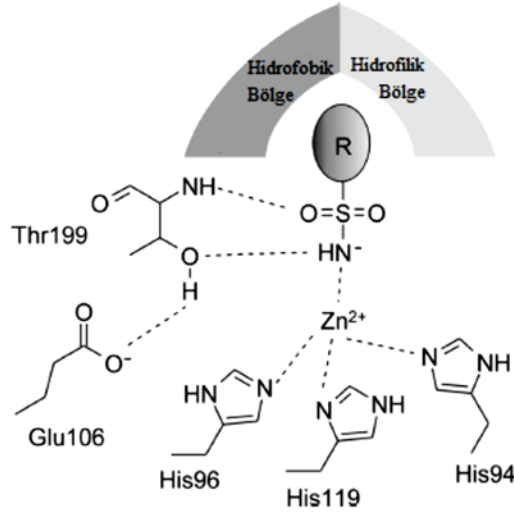
Sülfonamidler çeşitli hastalıklara karşı koruyucu ve kemoterapötik ajanlar olarak geniş çapta kullanılan ilk ilaçlardır.<sup>25</sup> Domagk, 1935'te prontosilin streptokokal enfeksiyonlara karşı fareleri ve stafilokokal enfeksiyonlara karşı tavşanları koruduğunu gözlemlemesine rağmen, *in vitro* çalışmalarda bakteriler ve pnömokokal enfeksiyonlar üzerinde etkisi olmadığını fark etmiştir.<sup>26</sup> Daha sonra anlaşılmıştır ki prontosil metabolize olarak sülfanilamide dönüşmesinden dolayı antimikrobiyal aktivite göstermektedir.<sup>2</sup> Sülfanilamidin keşfinden sonra, binlerce kimyasal türevi sentezlenmiş ve çeşitli farmakolojik özelliklere sahip bileşikler bulunmuştur.<sup>25</sup>

Sulfonamidler antibakteriyel, antitümör, antikarbonik anhidraz, diüretik, hipoglisemik, antitiroid veya proteaz inhibitör aktivitesi gibi çeşitli aktivitelere sahip farmakolojik ajanları içeren önemli bir ilaç sınıfıdır.<sup>27</sup> Mann ve Keilin 1940 yılında sulfanilamidlerin aynı zamanda etkin bir CA I olduğunu bildirmişlerdir.<sup>3</sup>

Sulfanilamid ilk keşfedilen organik CA enzim inhibitörüdür. Daha sonra, tüm primer aromatik veya heterosiklik sulfonamidlerin CA enzimlerini inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>8</sup> Sübstituent içermeyen sulfonamid tipleri CA enzimine karşı inhibitör özellikler göstermektedirler.  $RSO_2NH_2$  genel formülünde R, çoğunlukla aromatik/heterosiklik bir kısımdır veya bir polihalojenalkil şeklinde de olabilir.<sup>28</sup>

Sulfonamid bileşikler ile inhibisyon bir inkübasyon periyodunu gerektirmez, aksine düşük sıcaklıklarda bile gerçekleşir, aynı zamanda çok güçlü ve tamamen geri dönüşümlüdür.<sup>29</sup>

Bazı sulfonamid inhibitörleri ile izoenzim CA I, II ve IV'ün etkileşmesini gösteren X-ray kristalografik çalışmalarda, deprotonlanmış sulfonamidin enzimin  $Zn^{+2}$  iyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir.<sup>19</sup> Sulfonamidler iyonize formda ( $RSO_2NH^-$ ) CA aktif bölgesindeki çinko iyonuna dördüncü ligand olarak bağlanır ve böylece tüm katalitik siklusu bozar.<sup>28</sup> Ayrıca, NH kısmı ile Thr199'un  $O\gamma$ 'sına bir hidrojen bağıyla ve Glu 106'nın karboksilat grubuna diğer bir hidrojen bağıyla bağlanır.  $SO_2NH$  kısmının oksijen atomlarından biri de aynı zamanda Thr 199'un temel NH kısmı ile bir hidrojen bağı yapar (Şekil 2.6).<sup>19,30</sup> Sulfonamid fonksiyonel grubunun CA inhibisyonu için belirli özelliklere sahip olduğu görülmüştür. (i) Negatif yüklü, daha çok  $Zn^{+2}$  iyonuna koordine olan mono protonlanmış azotu bulunur. (ii) Bu grup Thr 199'a komşu oksijen  $O\gamma$ 'sı ile bir hidrojen bağı oluşturur. (iii)  $SO_2$  oksijenin biri ile Thr199'un temel NH'si arasında bir hidrojen bağı oluşur. Böylece, sulfonamid kısmının CA'nın  $Zn^{+2}$  iyonuna güçlü bir şekilde afinite göstermesi açıklanmıştır.<sup>19</sup>

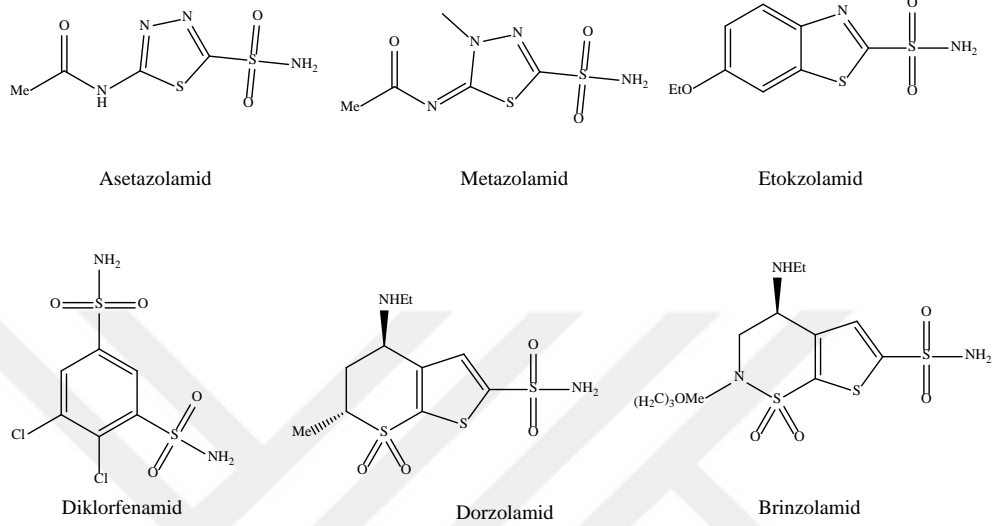


**Şekil 2.6.** Sülfonamid inhibitörü ile hCA II arasındaki etkileşimin şematik gösterimi

Sülfonamidler CA'yı inhibe etmelerinden dolayı 1954'ten itibaren diüretikler ve sistemik etkili antiglokoma ilaçları olarak klinikte kullanılmaktadır.<sup>3,13</sup> En önemli CAI sınıfı olan sülfonamidlerin klinikte diüretik, antiglokoma ve antiepileptik ajanlar olarak kullanılan bileşikleri asetazolamid, metazolamid, etoksizolamid, diklofenamid, sultiam, dorzolamid, brinzolamid, sülpirid ve zonisamid'dir.<sup>17</sup>

Antiglokoma ajanı olarak, uzun bir süre için asetazolamid, metazolamid, etoksizolamid ve diklofenamid kullanılmıştır (Şekil 2.7).<sup>19,31</sup> Sistemik CA inhibitörleri glokoma da yükselen intraoküler (IOP) basıncı düşürmeyi sağlar. Bu ajanlar siliyer proses enzimleri olan sülfonamide duyarlı izoenzimler CA II ve CA IV'yi inhibe ederek bikarbonat oranını ve aköz hümeür salgısını azaltır ve IOP'un %25-30 oranında düşmesini sağlar, ancak gözden başka diğer dokularda bulunan çeşitli CA izoenzimler de inhibe olduğundan çeşitli yan etkiler görülür. En çok görülen yan etkiler ekstremitelerde hissizlik ve karıncalanma, metalik tat, depresyon, yorgunluk, kırgınlık, kilo kaybı, libido azalması, gastrointestinal irritasyon, metabolik asidoz, böbrek taşı ve geçici miyopluktur. Bundan dolayı sülfonamid CA inhibitörlerinin topikal olarak göze uygulanması fikri ortaya çıkmıştır. Maren, mevcut CA inhibitörlerinin fizikokimyasal özelliklerinden dolayı topikal kullanıma uygun olmadığını bildirmesine rağmen, topikal

antiglokom ajan olarak etki gösteren ilk sülfonamid bileşiği 1995'te klinik kullanıma giren dorzolamid, ikincisi ise 1999'da klinik kullanıma giren brinzolamiddir. Bu iki ilaç sistemik etkilere göre daha az yan etki gösterirler, fakat temel olarak fizyolojik ilgili tüm CA izoenzimlerini inhibe ederler.<sup>19</sup>



**Şekil 2.7.** Klinikte kullanılan antiglokom ilaçların açık yapıları

Tiyazid ve triklorometiyazid, klortalidon, indapamid ve furosemid gibi sülfonamid yapısındaki diüretikler 60'lı ve 70'li yıllarda keşfedilmiştir. İlk başta bu ilaçların memeli CA izoenzimleri ile önemli derecede etkileştiği düşünülmemiştir. Daha sonra aktif memeli CA izoenzimleri ile etkileşimleri tekrar araştırılmıştır ve hCA II ile birleşmelerinin X-ray kristal yapısı yayınlanmıştır. Klortalidon, triklorometiyazid ve furosemidin CA II'ye karşı etkin inhibitörler olduğu, oysa indapamidin daha zayıf etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, bu diüretiklerin bazıları diğer CA izoenzimlerine karşı da oldukça etkin inhibitörlerdir. Örneğin, klortalidon hCA VB, VII, IX ve XIII'e karşı; triklorometiyazid CA VII ve IX'a karşı, ve furosemid ise CA I ve XIV'e karşı etkindirler.<sup>16</sup>

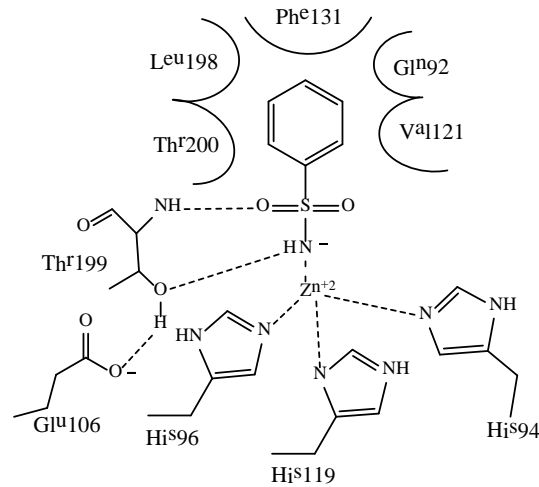
Sülfonamidlerin diüretik ve antiglokom etkilerinin haricinde antikonvülsan, antiobezite, antikanser, analjezik ve anti infektif ilaçlar olarak da potansiyelleri olduğu gösterilmiştir.<sup>13</sup>

### 2.3.1. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Sülfonamidlerin Yapı-Aktivite İlişkileri

Krebs, süstitüe olmayan aromatik sülfonamidlerin ( $\text{ArSO}_2\text{NH}_2$ ) güçlü CA inhibitörleri olduğunu ve bu bileşiklerin sülfonamid kısmına N-süstitüsyon yapıldığında etkinliğin azaldığını bildirmiştir. Sülfonamid kısmında büyük süstitüentlerin (fenilhidrazino, üreid, tiyoüreid, guanidin, vb.) olması inhibitör özelliklerinin zayıflamasına yol açtığı gösterilmiştir.<sup>19</sup>

Sülfanilamidin amino grubunun karbonik anhidrazın inhibisyonundan sorumlu olmadığı görülmüştür, çünkü amino grubunun orto- veya meta- pozisyonunda olmasının ya da asetilaminobenzen sülfonamidde olduğu gibi amino grubunun asetilasyonunun bileşiğin CAI özelliklerini etkilemediği gösterilmiştir. Sülfonamid grubunun ise doğrudan bu ilaçların inhibitör etkisiyle ilişkili olduğu görülür zira sülfonamid grubundaki hidrojen atomlarının her ikisinin veya birinin bile değişmesi inhibitör özelliklerinin tamamen kaybına sebep olur.<sup>29</sup>

Benzensülfonamid türevleri aktif enzim bölgesinde sülfonamid kısmı ile  $\text{Zn}^{+2}$  iyonuna bağlanırken, içerdiği fenil halkası Val121, Gln92, Phe131, Leu198 ve Thr200 rezidüleri ile birçok van der Waals etkileşimi yapar (Şekil 2.8).<sup>30</sup>



**Şekil 2.8.** hCA II aktif bölgesi ile benzensülfonamidin bağlanma şeklinin şematik gösterimi.

Benzensulfonamid türevleri için yapılan kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR) çalışmaları sulfonamid kısmının atomları üzerinde indüklenen elektrik yükünün CA inhibitör aktivitesini önemli derecede etkilediğini göstermiştir.<sup>28</sup>

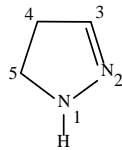
Takeya ve ekibinin ön çalışmaları SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubunun elektronik özelliklerinin 2-, 3- veya 4-süstitüe benzensulfonamid serisinin CA inhibitör etkileri için önemli olduğunu göstermiştir. Elektron-çekici gruplar sulfonamid grubunun K<sub>a</sub>'sını azaltarak CA inhibitörlerinde etkiyi artırdığı deneysel olarak da ortaya konmuştur.<sup>32,33</sup>

Fenil gibi rezonans ile elektron veren süstitüentler en yüksek dolu moleküler orbitalin (HOMO) enerjisini artırır ve böylece aktivite azalır. Öndeki orbitalin enerjisine bağlı olan bu durum, elektron çekici grupların inhibisyon etkisini artırdığı bilgisi ile uyumludur.<sup>34</sup>

#### 2.4. Pirazolinler

Literatürde pirazolin yapılarının oldukça stabil olduğu ve bu nedenle biyolojik aktiviteye sahip yeni bileşikler sentezlemek için biyoaktif kısımlarda kullanıldığı görülmektedir.<sup>35</sup>

Pirazolin, halka içinde iki komşu azot atomu olan beş üyeli heterosiklik bir yapıdır (Şekil 2.9).<sup>36</sup> Yalnızca bir endosiklik çift bağ içerirler ve doğada bazik halde bulunur.<sup>10</sup> Pirazolin türevleri elektronca zengin yapılardır ve çeşitli biyolojik aktivitelerde önemli rol oynarlar. Bu heterosiklik bileşikler genelde doğada alkaloidlerin, vitaminlerin, pigmentlerin yapısında ve bitki ile hayvan hücrelerinin bileşenlerinde bulunur.<sup>12</sup>

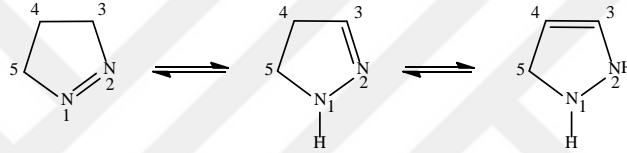


Şekil 2.9. 2-Pirazolinin açık formülü.



Pirazolin türevlerinin antimikrobiyal, antimikobakteriyel, antifungal, antiamebik, anti-inflamatuvar, analjezik, antidepresan ve antikanser aktivitesi gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Bu bileşiklerin bazıları aynı zamanda Nitrik oksit sentetaz inhibitör ve Kannabinoid CB 1 reseptör antagonist aktivitesine sahiptir.<sup>11</sup>

Farklı sentetik metodlar kullanılarak çok sayıda pirazolin türevi elde edilmiştir.<sup>11</sup> Pirazol yapısının kısmi olarak indirgenen ve birbirleriyle dengede olan üç formu, çift bağın pozisyonunun farklı olduğu 1-pirazolin, 2-pirazolin ve 3-pirazolindir (Şekil 2.9). 2-pirazolin monoimino karakter sergilediğinden diğerlerine göre daha stabildir.<sup>36</sup>

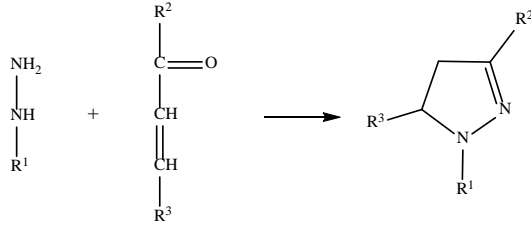


**Şekil 2.10.** Pirazolinlerin kısmi olarak indirgenmiş üç formu

Pirazolinlerin türevleri arasında en çok çalışılanın 2-pirazolin tipi bileşikler olduğu görülür. 2-pirazolinler farklı çeşitlilikte farmakolojik aktivite gösterme potansiyeline sahiplerdir. Fenazon/amidopiren/metampiron (analjezik ve antipiretik), azolid/tandearil (antiinflamatuvar), indoksarb (insektisit), anturan (ürükozurik) gibi çok sayıda farmakolojik olarak aktif molekülün yapısında bulunur.<sup>11</sup>

Hidrazinler ile şalkonların reaksiyonu 2-pirazolinlerin sentezi (Şekil 2.11) için muhtemelen en çok kullanılan prosedürdür.<sup>36</sup> 2-pirazolinleri elde etmek için kullanılan klasik sentez yönteminde hidrazin ile halka kapanma reaksiyonu veren doymamış ketonların (şalkonların), aromatik keton ve aldehitlerin baz-katalizli aldol kondenzasyon reaksiyonu ile sentezlenmesi gerekir. Bu yöntemde, hidrazonlar ara ürün olarak oluşur, sonra asetik asit gibi uygun bir halka kapama ajanının ortamda bulunmasıyla 2-pirazolinlere hemen dönüşebilirler.<sup>12</sup> Bu metod hidrazon ara ürünü izole edilerek veya izole edilmeden kullanılabilir. 2-pirazolinlerin sentezi aynı zamanda alkali şartlarda

etanol çözeltilisinde katalizör olarak piridin kullanılmasıyla da yapılabilir. Bazı durumlarda iki reaktan katalizör olmadan alkol çözeltilisinde reflüks edilir.<sup>36</sup>



**Şekil 2.11.** Hidrazinler ile şalkonların siklizasyon reaksiyonu ile 2-pirazolinlerin oluşumu

#### 2.4.1. Pirazolinlerin Farmakolojik Aktiviteleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Özdemir ve ekibi<sup>37</sup> 1-(4-Aril-2-tiyazolil)-3-(2-tiyenil)-5-aril-2-pirazolin türevleri sentezleyerek *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* ve *Candida glabrata*'ya karşı antimikrobiyal aktivitelerini araştırmıştır ve önemli derecede aktivite gözlemlenmiştir.

Abdelwahab ve ekibi<sup>38</sup> 1-(Benzofuran-2-il)-4-nitro-3-arilbütan-1-on ve 3-(Benzofuran-2-il)-4,5-dihidro-5-aril-1-[4-(aril)-1,3-tiyazol-2-il]-1*H*-pirazol sentezlemiştir ve 100 µg konsantrasyonda antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini değerlendirmiştir. Bazı bileşiklerin kontrol ilacından daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

Sharma ve ekibi<sup>39</sup> etanolde 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorid ile uygun şalkonun reaksiyonu yoluyla pirazolilpirazolinlerin yeni bir serisini sentezlemiştir. Sentezlenen bileşiklerin Gram pozitif bakteriler *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus subtilis*'e karşı ve Gram negatif bakteriler *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*'ye karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Test edilen bileşiklerin çoğu Gram-negatif bakterilerden ziyade Gram-pozitiflere karşı daha iyi aktivite göstermiştir. Sübstitüent olarak floro ve bromo'ya sahip olan bileşiklerin tüm

test edilen Gram (+) ve Gram (-) bakteri suşlarına karşı geniş spektrumlu etki gösterdiği gözlenmiştir.

Sivakumar ve ekibi<sup>40</sup> bazı yeni 1,3,5-trifenil-2-pirazolinleri sentezleyerek antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmiştir. Sentezlenen tüm bileşikler *Escherichia coli*'ye karşı iyi aktivite ve *Staphylococcus aureus*'a karşı ise zayıf aktivite göstermiştir. Sübstitüent olarak kloro, metoksi, dimetoksi ve bromo'ya sahip bileşikler *Staphylococcus aureus* dışında test edilen tüm organizmalara karşı önemli derecede etkinlik göstermiştir. Sübstitüent olarak halojenlere (-F ve -Cl) sahip bileşikler 2 mg/ml konsantrasyonda çalışılan mantarlara karşı <% 88 azalma sağlayarak ile çok iyi aktivite sergilemişlerdir. Sonuçlar antibakteriyel ve antifungal aktiviteler için halojen sübstitüentlerin önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Ramesh ve ekibi<sup>41</sup> alkol varlığında fenilhidrazin hidroklorid ile şalkon 2-asetiltiyofenin reaksiyonuyla bazı yeni pirazolin türevleri sentezleyerek antiinflamatuvar etkileri açısından bileşikleri incelemiştir. Bileşiklerin bazıları önemli dereceden orta dereceye değişen bir şekilde anti-inflamatuvar aktivite göstermiştir.

Singh ve ekibi<sup>42</sup> 3-(3-Asetoamino) fenil-1, 5-sübstitüe fenil- $\Delta^2$ -pirazolinin birkaç türevini sentezleyerek antikonvülsan aktivitelerini değerlendirdi. Tüm sübstitüe pirazolinlerin pentilentetrazol ile indüklenen epileptik nöbete karşı % 30-80 koruma sağladığı gösterilerek antikonvülsan aktivite sergilediği gözlenmiştir. Bu sübstitüe pirazolinlerin birçoğunun nikotinamid dinükleotid (NAD) bağımlı sübstratların fare beyni homojenatları tarafından in vitro oksidasyonunu seçici olarak inhibe ettiği gösterilmiştir.

Rathish ve ekibi<sup>43</sup> 4-hidrazinonbenzensülfonamid hidroklorid ile şalkonların kondenzasyon reaksiyonu sonucunda benzensülfonamid türevleri taşıyan yeni 2-pirazolin bileşikleri sentezlemiştir. Sentezlenen bileşikler 20 mg/kg dozda karajenan ile

indüklenmiş sıçan pati ödemi modelinde anti-inflamatuvar etkinliği açısından test edilmiştir. Süstitüent olarak trimetoksi ve N,N dimetilamino gruplarına sahip bileşikler celocoxib'ten daha etkin bulunmuştur.

Bhat ve ekibi<sup>44</sup>, N-4 süstitüe semikarbazid ile şalkonların bazik koşullar altında siklizasyonu ile bis-pirazolinleri sentezleyerek bileşiklerin antiameobik aktivitesini incelemiştir. Bu çalışmada yapı-aktivite ilişkisi, bileşiklerdeki tiyokarbomoil grubuna bağlı süstitüentlerden aromatik olanların aromatik olmayanlara göre daha aktif olduğunu göstermiştir.

Prasad ve ekibi<sup>45</sup>, sentezledikleri 1,3,5-trifenil-2-pirazolin bileşiklerinin çoğunun Porsolt davranış bozukluğu testi ile farelerde önemli derecede antidepresan etki gösterdiğini bildirmiştir.

Yukarıda verilen bilgilerden pirazolin türevlerinin önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu görülmektedir. Bu sebeple pirazolinler ilaç araştırmalarında kullanılan önemli bir farmakofor gruptur.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Sentez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

Tasarlanan bileşiklerin sentezinde 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (ABCR), 2-tiyofen karbaldehit, metil alkol, etil alkol, kloroform, aseton (Aldrich), 4'-hidroksiasetofenon, % 37'lik hidroklorik asit, glasiyal asetik asit, DMSO-*d*<sub>6</sub>, sodyum hidroksit (Merck), 4'-metilasetofenon, 4'-nitroasetofenon, 4'-kloroasetofenon (Fluka), 4'-metoksiasetofenon, 4'-floroasetofenon, 4'-bromoasetofenon (Acros) kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Yöntemler

###### 3.1.2.1. Kromatografik Analizler

Sentez çalışmaları sırasında reaksiyonu takip etmek ve sentezlenen bileşiklerin saflıklarını kontrol etmek amacıyla İnce Tabaka Kromatografisi'nden (İ.T.K.) yararlanıldı. İ.T.K. için 0.25 mm kalınlıktaki silikajel 60 HF<sub>254</sub> (Merck Art 5715) hazır kromatografi plakları kullanıldı. Hareketli faz sistemi olarak kloroform: metanol (9:1) kullanıldı. Açık havada kurutulan plaklar üzerindeki lekelerin belirlenmesinde 254 nm dalga boyundaki UV ışığından (Mineralight Lamp UVGL-58) faydalanıldı.

###### 3.1.2.2. Spektral Analizler

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) ve <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) spektrumları Varian Mercury Plus spektrometre (Varian inc., Palo Alto, California, U.S.) cihazı ile alınmıştır. Kimyasal kaymalar (δ) ppm olarak verilmiştir. Bileşiklerin HRMS spektrumları Shimadzu's LCMS-TOF-ESI (Shimadzu, Kyoto, Japan) cihazı ile alınmıştır.

###### 3.1.2.3. Erime Noktası Tayinleri

Bileşiklerin erime dereceleri Buchi 530 (Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) erime derecesi tayini cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

### **3.2. 1,3-Diaril-2-propen-1-on Yapısındaki Şalkonların (A1-A8) Genel Sentez**

#### **Yöntemi**

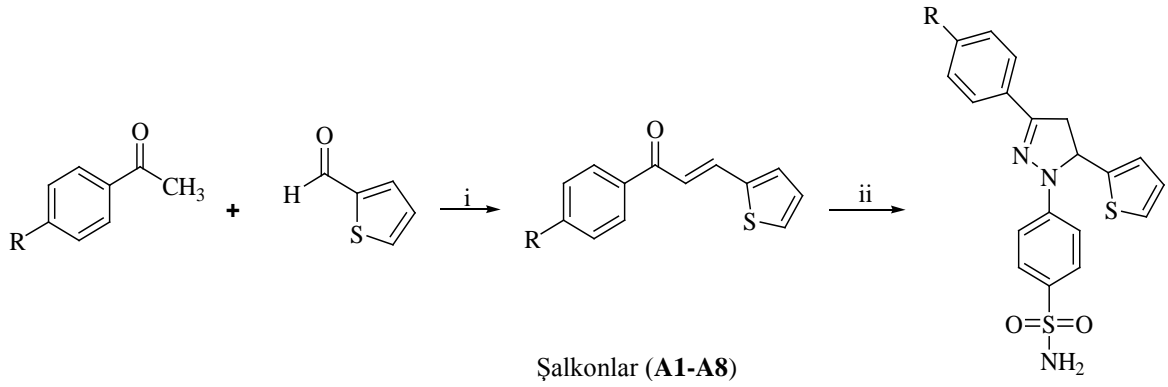
Şalkonlar bazik koşullar altında 4'-hidroksiasetofenonun 2-tiyofenkarbaldehit ile Claisen Schmidt Kondenzasyon reaksiyonu sonucunda sentezlenmiştir.<sup>46</sup>

2-tiyofen karbaldehit ve uygun bir asetofenon etanol (6 ml) içinde çözüldükten sonra karışımın üzerine 10 ml NaOH (% 10) çözeltisi ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında bir gece karıştırıldı. Tepkimenin ilerleyişi İ.T.K ile takip edildi. Tepkime sonunda karışım 100 ml buzlu suya döküldü ve HCl çözeltisi (% 10) ile nötralize edildi. Oluşan renkli çözelti süzgeç kağıdından süzüldü ve metanol-su karışımında kristalize edilerek saflaştırıldı. Kristalizasyon sonucunda oluşan kristaller süzülerek ayrıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Elde edilen kristallerin saflığı İ.T.K ile kontrol edildi.

Sekiz farklı şalkon türevi % 32 - % 59 verimle elde edildi. 1,3-diaril-2-propen-1-on yapısındaki şalkonların sentez yöntemi Şekil 3.1.'de şematik olarak gösterilmiştir.

### **3.3. 1-(4-Aminosülfonilfenil)-3-(4-süstitüefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin Bileşiklerinin (B1-B8) Genel Sentez Yöntemi**

Uygun bir şalkon bileşiği (1.00 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (1.10 mmol) etanolde çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edildi. Karışım 12 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyona son verildikten sonra çözücünün bir kısmı evaporatörde vakum altında uzaklaştırılarak karışım konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülerek kurutuldu. Çökelti oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi.<sup>47</sup> Pirazolin bileşiklerinin (B1-B8) genel sentez yöntemi Şekil 3.1.'de şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Şalkon (A1-A8) ve pirazolin (B1-B8) türevlerinin genel sentez yöntemi

**i:** NaOH (%10 sulu), EtOH, 0-5 °C, 12 saat; **ii:** 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür, EtOH/H<sup>+</sup>, reflüks 12 saat.

**R:** H (A1, B1); CH<sub>3</sub> (A2, B2); CH<sub>3</sub>O (A3, B3); Cl (A4, B4); F (A5, B5); Br (A6, B6); NO<sub>2</sub> (A7, B7); OH (A8, B8).

### 3.3.1. 4-(3-Fenil-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)benzen

#### sülfonamid'in Sentezi, B1

(E)-1-Fenil-3-(tiyofen-2-il)-prop-2-en-1-on (1.00 g, 4.7 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (1.15 g, 5.1 mmol) etanolde (38 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Sarı renkli katı bir madde olan 4-(3-fenil-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)benzensülfonamid % 77 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 207-209 °C olarak bulundu.

### 3.3.2. 4-(5-Tiyofen-2-il)-3-(p-tolil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)benzen

#### sülfonamid'in Sentezi, B2

(E)-3-(Tiyofen-2-il)-1-(p-tolil)prop-2-en-1-on (1.00 g, 4.4 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (1.08 g, 4.8 mmol) etanolde (36 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri

çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Sarı renkli katı bir madde olan 4-(5-(tiyofen-2-il)-3-(p-tolil)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il) benzensülfonamid % 66 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 206-208 °C olarak bulundu.

### **3.3.3. 4-(3-(4-Metoksifenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B3**

(E)-1-(4-Metoksifenil)-3-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on (1.00 g, 4.1 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (1.0 g, 4.5 mmol) etanolde (33 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Sarı renkli katı bir madde olan 4-(3-(4-metoksifenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il) benzensülfonamid % 71 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 219-221 °C olarak bulundu.

### **3.3.4. 4-(3-(4-Klorofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il)benzen sülfonamid'in Sentezi, B4**

(E)-1-(4-Klorofenil)-3-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on (1.0 g, 4.0 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (0.99 g, 4.4 mmol) etanolde (33 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında



metanol-eter karışımından kristallendirildi. Sarı renkli katı bir madde olan 4-(3-(4-klorofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il)benzensülfonamid % 41 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 184-186 °C olarak bulundu.

### **3.3.5. 4-(3-(4-Florofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il)benzen sülfonamid'in Sentezi, B5**

(E)-1-(4-Florofenil)-3-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on (1.0 g, 4.3 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (1.06 g, 4.7 mmol) etanolde (35 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Sarı renkli katı bir madde olan 4-(3-(4-florofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il) benzensülfonamid % 85 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 200-202 °C olarak bulundu.

### **3.3.6. 4-(3-(4-Bromofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il)benzen sülfonamid'in Sentezi, B6**

(E)-1-(4-Bromofenil)-3-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on (1.0 g, 3.4 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (0.84 g, 3.8 mmol) etanolde (28 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Sarı renkli katı bir madde olan 4-(3-(4-bromofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-*IH*-pirazol-1-il)benzensülfonamid %58 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 197-199 °C olarak bulundu.

### **3.3.7. 4-(3-(4-Nitrofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il)benzen sülfonamid'in Sentezi, B7**

(E)-1-(4-Nitrofenil)-3-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on (1.0 g, 3.9 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (0.95 g, 4.2 mmol) etanolde (31 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Turuncu renkli katı bir madde olan 4-(3-(4-nitrofenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il)benzensülfonamid % 78 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 209-211 °C olarak bulundu.

### **3.3.8. 4-(3-(4-Hidroksifenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il) benzensülfonamid'in Sentezi, B8**

(E)-1-(4-Hidroksifenil)-3-(tiyofen-2-il)prop-2-en-1-on (1.0 g, 4.3 mmol) ve 4-hidrazinobenzensülfonamid hidroklorür (1.07 g, 4.8 mmol) etanolde (35 ml) çözüldükten sonra üzerine katalitik miktarda glasiyel asetik asit ilave edilerek geri çeviren soğutucu altında 12 saat ısıtıldı. Tepkimenin yürüyüşü İ.T.K ile izlendi. Reaksiyon karışımı vakum altında konsantre edildikten sonra oda sıcaklığında 12 saat karıştırıldı. Elde edilen katı madde süzülüp kurutulduktan sonra oda sıcaklığında metanol-eter karışımından kristallendirildi. Krem renkli katı bir madde olan 4-(3-(4-hidroksifenil)-5-(tiyofen-2-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il)benzensülfonamid % 83 verimle elde edildi. Bileşiğin erime derecesi 249-251 °C olarak bulundu.

### **3.4. Biyolojik Aktivite Çalışmaları**

#### **3.4.1. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve II) Saflaştırılması ve Karakterizasyonu**

Her iki CA izoenzimi (hCA I ve II) Sefaroz-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırıldı.<sup>48</sup> Bunun için, homojenat çözeltisinin pH'sı 8.7'ye katı Tris kullanılarak ayarlandı. Sonra süpernatant önceden hazırlanan Sefaroz-4B-L tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna transfer edildi.<sup>49</sup> Ardından, kolondan elüe edilen proteinler spektrofotometrik olarak 280 nm'de tayin edildi.<sup>50</sup>

hCA izoenzimlerinin saflığının belirlenmesi için, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapıldı. % 0.1 SDS içeren yürütme tamponunda % 10 akrilamid ayırma jeli ve % 3 akrilamid toplama jeline örnekler yürütüldü ve her bir izoenzim için tek bir bant gözlemlendi.<sup>51</sup>

Protein miktarı, saflaştırma adımları esnasında Bradford metoduna<sup>52</sup> göre 595 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bovin serum albumin standart protein olarak kullanıldı.

#### **3.4.2. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibisyon Aktivitesinin Tayini**

CA enziminin inhibisyon aktivitesi *in vitro* şartlarda esteraz aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir. Yöntem, karbonik anhidraz enziminin sübstrat olarak kullanılan 4-nitrofenilasetatı (NPA) 348 nm'de absorpsiyon veren 4-nitrofenol veya 4-nitrofenolat'a hidroliz etmesi esasına dayanır.<sup>53</sup>

CA esteraz aktivitesi Verpoorte ve ekibi<sup>54</sup> tarafından tanımlanan yöntemle göre belirlenmiştir. Enzim ve 4-Nitrofenil asetat (NPA)'nın uygun reaksiyon karışımı hazırlandıktan ve başlangıçtaki değer spektrofotometrede okunduktan sonra 3 dakika sonundaki 25 °C'de 348 nm'de absorbans değeri okunarak absorbans değişimi kaydedildi.

Her bir benzensulfonamid türevinin inhibisyon etkisini belirlemek için % aktivite-benzensulfonamid grafiği çizildi ve eğri denkleminde maksimum % 50 inhibe edici konsantrasyon ( $IC_{50}$ ) değeri hesaplandı. B1-B8 bileşiklerinin inhibisyon sabiti ( $K_i$ ) değerlerini belirlemek amacıyla CA I ve CA II izoenzimleri için  $IC_{50}$  değeri, bu değerin altında ve üstünde iki sabit konsantrasyonda, yani üç farklı konsantrasyonda uygun beş substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.<sup>55-57</sup>



## 4. BULGULAR

Tez kapsamında tasarlanan B1-B8 bileşikleri uygun şalkon türeviden hareketle başarılı bir şekilde sentezlenmiştir ve saflaştırılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  ve HRMS yöntemleri ile doğrulanmıştır.

Sentezlenen B1-B8 bileşiklerine ait  $^1\text{H-NMR}$  değerleri Tablo 4.1’de,  $^{13}\text{C-NMR}$  değerleri Tablo 4.2’de ve HRMS spektral verileri Tablo 4.3’te, deneysel veriler ise Tablo 4.4’te sunulmuştur. Sentezlenen B1-B8 bileşiklerine ait  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  ve HRMS spektrumları bu bölümde verilmiştir.

Bileşiklerin karbonik anhidraz inhibisyon aktiviteleri hCA I ve II izoenzimlerine karşı test edilmiştir ve sonuçlar Tablo 4.5’te sunulmuştur.

**Tablo 4.1.** B1-B8 bileşiklerinin <sup>1</sup>H-NMR verileri

Bileşik	<sup>1</sup> H-NMR δ (ppm)
<b>B1</b>	7.79 (d, 2H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 7.60 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.47-7.40 (m, 3H), 7.36 (d, 1H, <i>J</i> = 5.0 Hz), 7.19 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> = 3.4 Hz), 7.03 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.94 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.0, 3.4 Hz), 5.99 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.5, 4.7 Hz), 3.92 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 11.5 Hz), 3.32 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 4.7 Hz)
<b>B2</b>	7.68 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.60 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.35 (d, 1H, <i>J</i> = 5.0 Hz), 7.25 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 7.17 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.13 (d, 1H, <i>J</i> = 3.0 Hz), 7.03 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.93 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.0, 3.0 Hz), 5.96 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.3, 4.5 Hz), 3.89 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.5, 11.3 Hz), 3.29 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.5, 4.5 Hz), 2.33 (s, 3H, CH <sub>3</sub> )
<b>B3</b>	7.73 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.58 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.35 (d, 1H, <i>J</i> = 5.2 Hz), 7.16-7.12 (m, 3H), 7.01-6.99 (m, 4H), 6.93 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.2, 3.3 Hz), 5.94 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.6, 4.0 Hz), 3.88 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 11.6 Hz), 3.79 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3.29 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 4.0 Hz)
<b>B4</b>	7.80 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.60 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.51 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.36 (d, 1H, <i>J</i> = 5.1 Hz), 7.19 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> = 3.5 Hz), 7.04 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.93 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.1, 3.5 Hz), 6.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.6, 4.5 Hz), 3.91 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 11.6 Hz), 3.32 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 4.5 Hz)
<b>B5</b>	7.84 (dd, 2H, <i>J</i> = 8.8, 5.5 Hz), 7.60 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.36 (d, 1H, <i>J</i> = 5.1 Hz), 7.28 (t, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.18 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> = 3.2 Hz), 7.03 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.93 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.1, 3.2 Hz), 5.99 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.6, 4.5 Hz), 3.91 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 11.6 Hz), 3.31 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 4.5 Hz)
<b>B6</b>	7.73 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.64 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.60 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.36 (d, 1H, <i>J</i> = 5.0 Hz), 7.19 (d, 2H, <i>J</i> = 8.6 Hz), 7.14 (d, 1H, <i>J</i> = 3.4 Hz), 7.04 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.93 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.0, 3.4 Hz), 6.01 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.7, 4.4 Hz), 3.91 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 11.7 Hz), 3.29 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 4.4 Hz)
<b>B7</b>	8.27 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 8.02 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.64 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.38 (d, 1H, <i>J</i> = 5.1 Hz), 7.26 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.16 (d, 1H, <i>J</i> = 3.1 Hz), 7.07 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.94 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.1, 3.1 Hz), 6.13 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.8, 4.6 Hz), 3.98 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.7, 11.8 Hz), 3.40 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.7, 4.6 Hz)
<b>B8</b>	9.88 (s, 1H, OH), 7.63 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.57 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.35 (d, 1H, <i>J</i> = 5.0 Hz), 7.13-7.11 (m, 3H), 7.01 (s, 2H, NH <sub>2</sub> ), 6.92 (dd, 1H, <i>J</i> = 5.0, 3.6 Hz), 6.82 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 5.91 (dd, 1H, <i>J</i> = 11.4, 4.3 Hz), 3.85 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 11.4 Hz), 3.24 (dd, 1H, <i>J</i> = 17.6, 4.3 Hz)

**Tablo 4.2.** B1-B8 bileşiklerinin  $^{13}\text{C}$ -NMR verileri

Bileşik	$^{13}\text{C}$ -NMR $\delta$ (ppm)
<b>B1</b>	150.7, 146.7, 145.2, 134.2, 132.4, 130.1, 129.4, 127.7, 127.6, 126.8, 126.3, 126.2, 113.2, 59.2, 43.7
<b>B2</b>	150.8, 146.8, 145.2, 139.9, 134.0, 130.0, 129.6, 127.7, 127.6, 126.8, 126.26, 126.21, 113.1, 59.1, 43.8, 21.7
<b>B3</b>	161.0, 150.7, 146.9, 145.3, 133.8, 128.5, 127.7, 127.6, 126.22, 126.16, 124.9, 114.9, 112.9, 59.0, 56.0, 43.9
<b>B4</b>	149.6, 146.5, 144.9, 134.6, 134.5, 131.3, 129.5, 128.5, 127.7, 127.6, 126.35, 126.32, 113.3, 59.4, 43.6
<b>B5</b>	163.4 (d, $^1J = 247$ Hz), 149.9, 146.7, 145.1, 134.3, 129.1, 129.0, 127.7, 127.6, 126.3, 126.2, 116.5 (d, $^2J = 22$ Hz), 113.2, 59.3, 43.8
<b>B6</b>	149.7, 146.5, 144.9, 134.5, 132.4, 131.6, 128.7, 127.7, 127.6, 126.4, 126.3, 123.3, 113.3, 59.3, 43.5
<b>B7</b>	148.6, 147.8, 145.9, 144.6, 138.6, 135.2, 127.8, 127.7, 127.6, 126.6, 126.5, 124.7, 113.8, 59.7, 43.2
<b>B8</b>	159.6, 151.0, 146.9, 145.4, 133.6, 128.6, 127.7, 127.5, 126.2, 126.1, 123.3, 116.3, 112.8, 58.9, 43.9

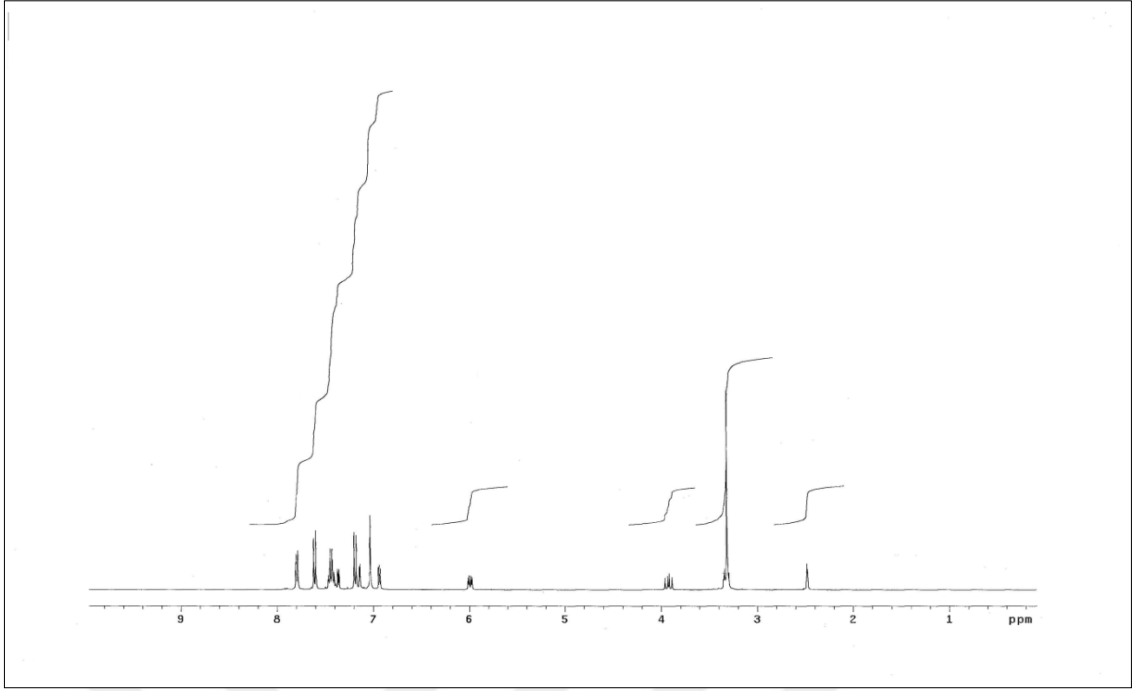
**Tablo 4.3.** B1-B8 bileşiklerinin HRMS verileri

Bileşik	Kapalı Formül	Hesaplanan	Bulunan
		[M+H] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>
<b>B1</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	384.0835	384.0822
<b>B2</b>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	398.0991	398.0984
<b>B3</b>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	414.0941	414.0925
<b>B4</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	418.0445	418.0443
<b>B5</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	402.0741	402.0734
<b>000B6</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	461.9940	461.9929
<b>B7</b>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	429.0686	429.0690
<b>B8</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	400.0784	400.0767

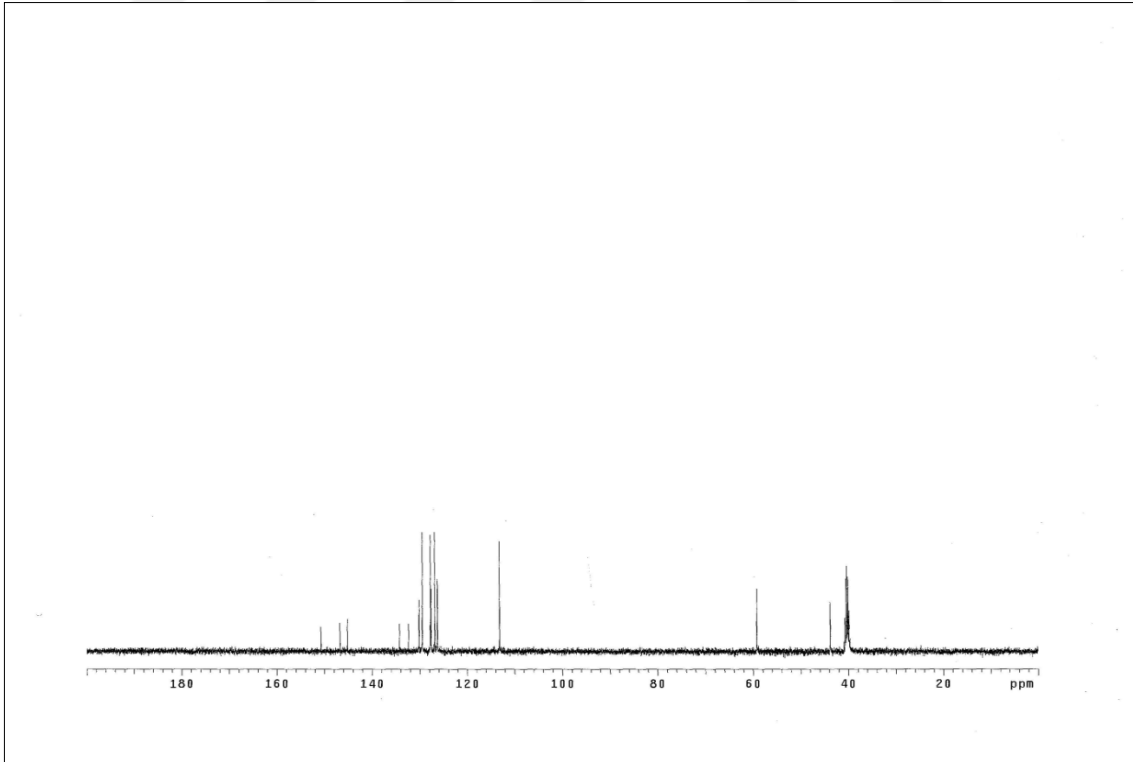
**Tablo 4.4.** B1-B8 bileşiklerinin deneysel verileri

Bileşik	R	Şalkon (mmol)	4-hidrazinobenzen sülfonamid (mmol)	Etanol (ml)	Erime Derecesi (°C)	Verim (%)
<b>B1</b>	H	4.7	5.1	38	207-209	77
<b>B2</b>	CH <sub>3</sub>	4.4	4.8	36	206-208	66
<b>B3</b>	CH <sub>3</sub> O	4.1	4.5	33	219-221	71
<b>B4</b>	Cl	4.0	4.4	33	184-186	41
<b>1B5</b>	F	4.3	4.7	35	200-202	85
<b>B6</b>	Br	3.4	3.8	28	197-199	58
<b>B7</b>	NO <sub>2</sub>	3.9	4.2	31	209-211	78
<b>B8</b>	OH	4.3	4.8	35	249-251	83

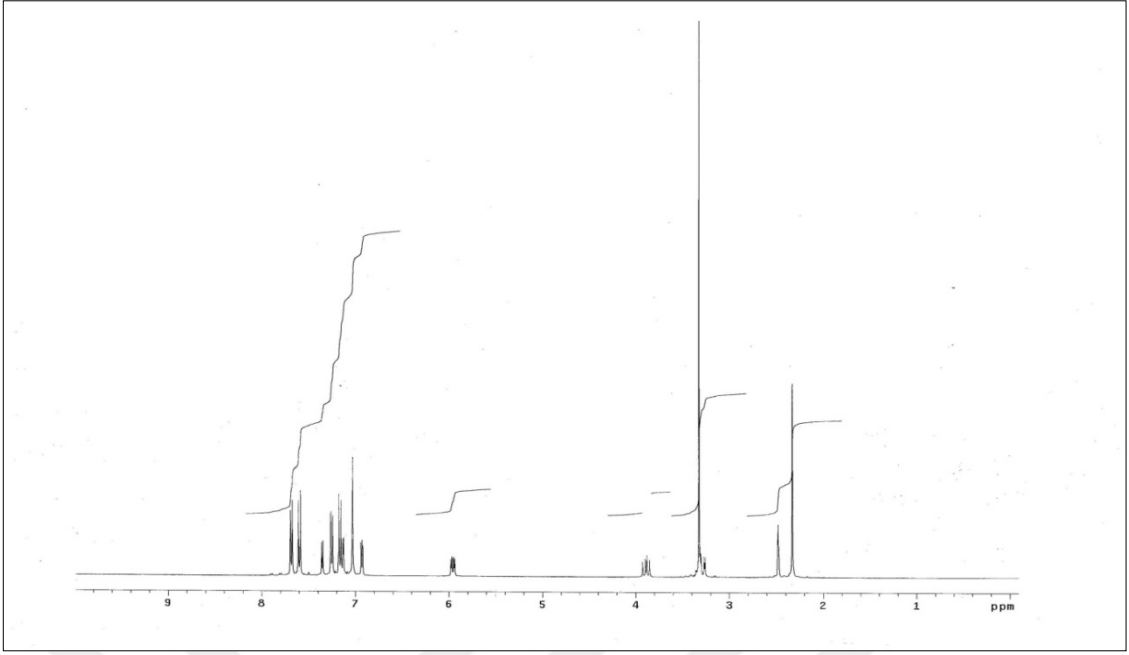




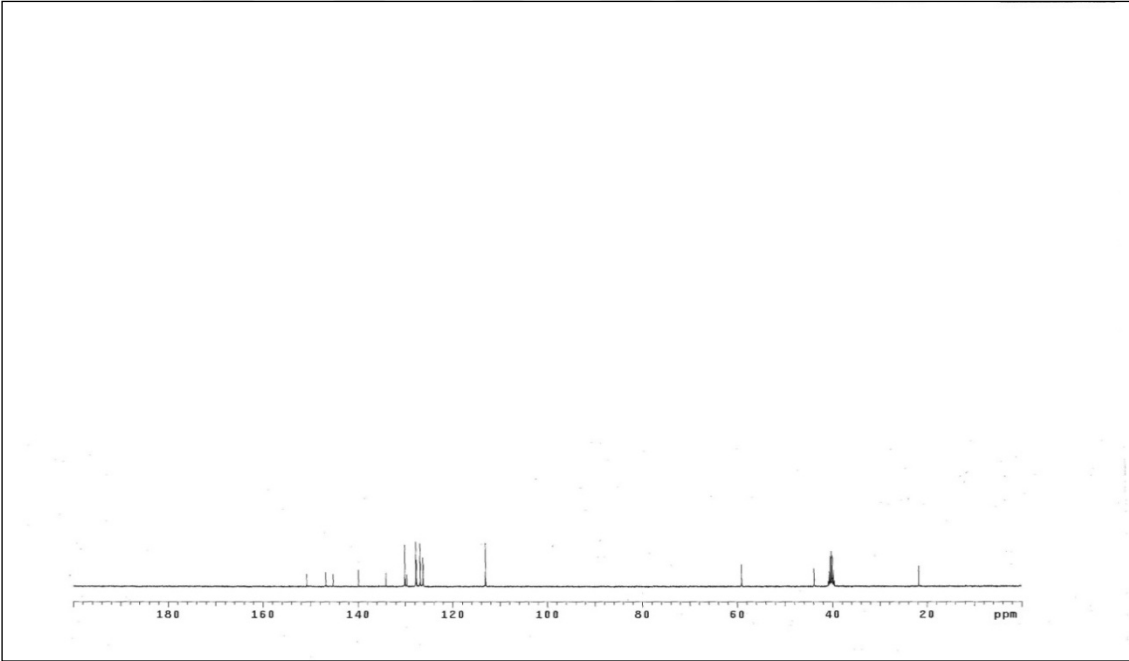
**Şekil 4.1.** B1 bileşiğinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



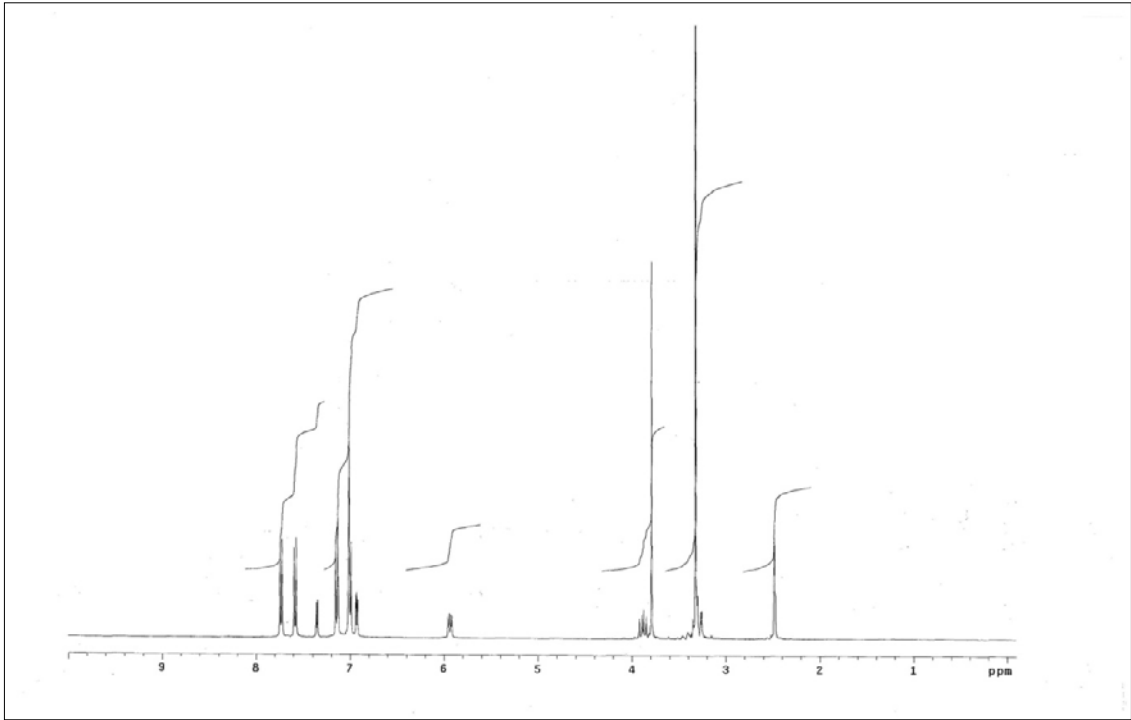
**Şekil 4.2.** B1 bileşiğinin  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumu



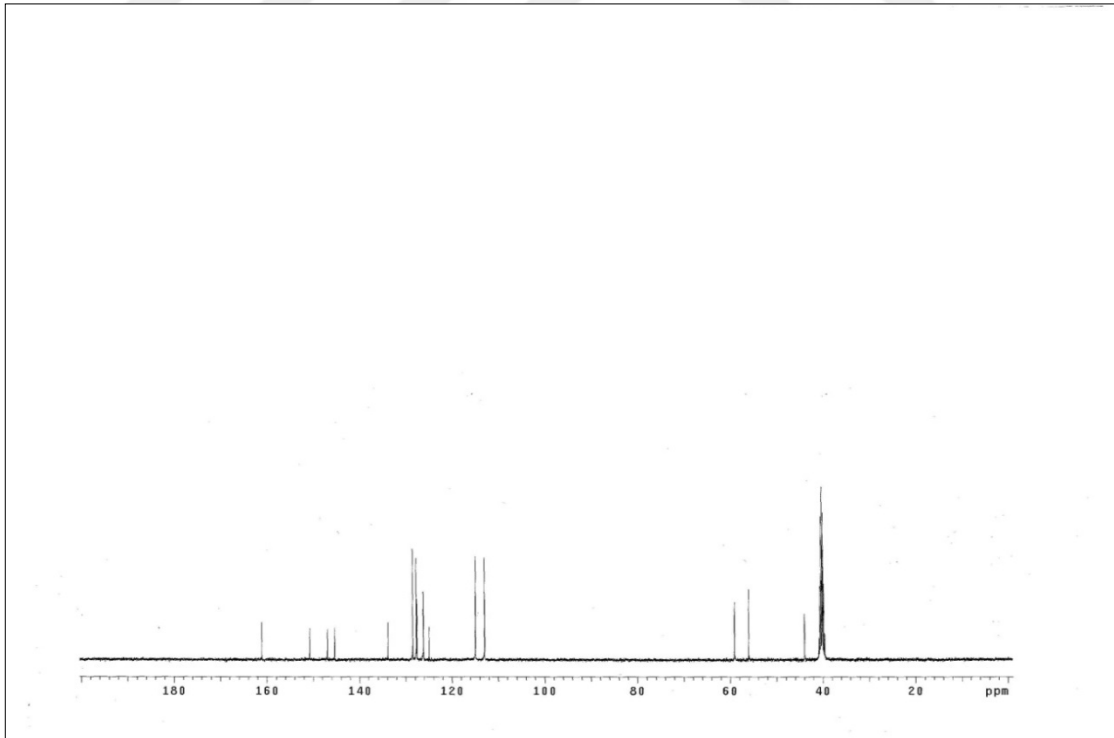
Şekil 4.3. B2 bileşiğinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



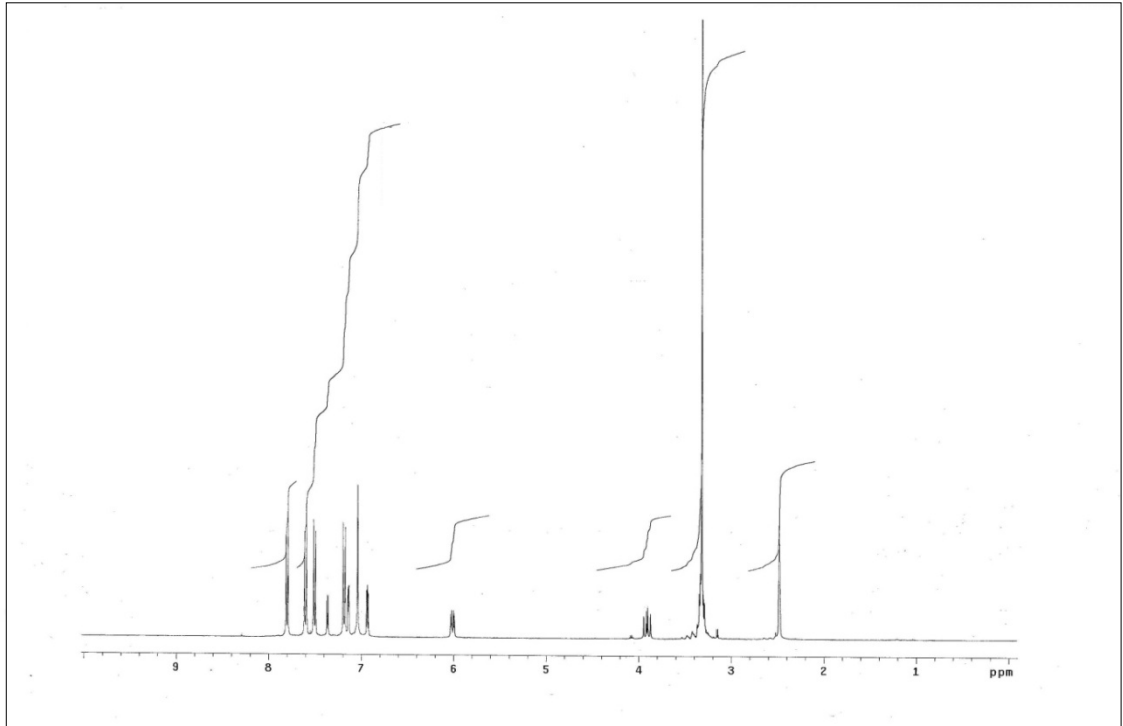
Şekil 4.4. B2 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



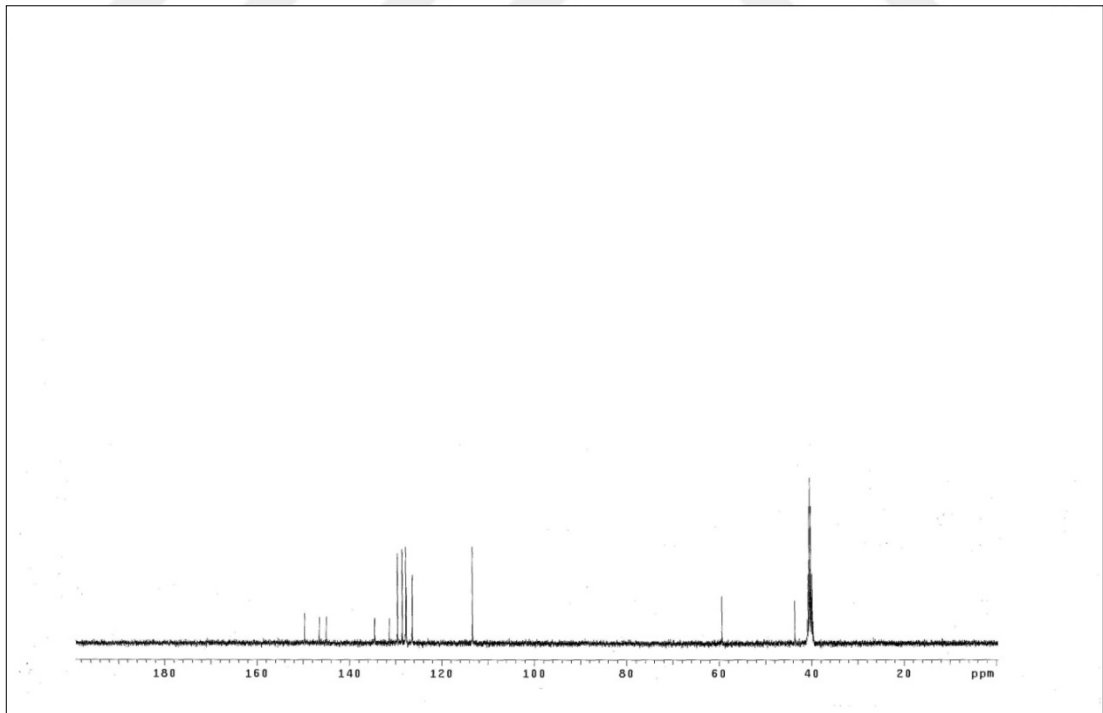
Şekil 4.5. B3 bileşiğinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



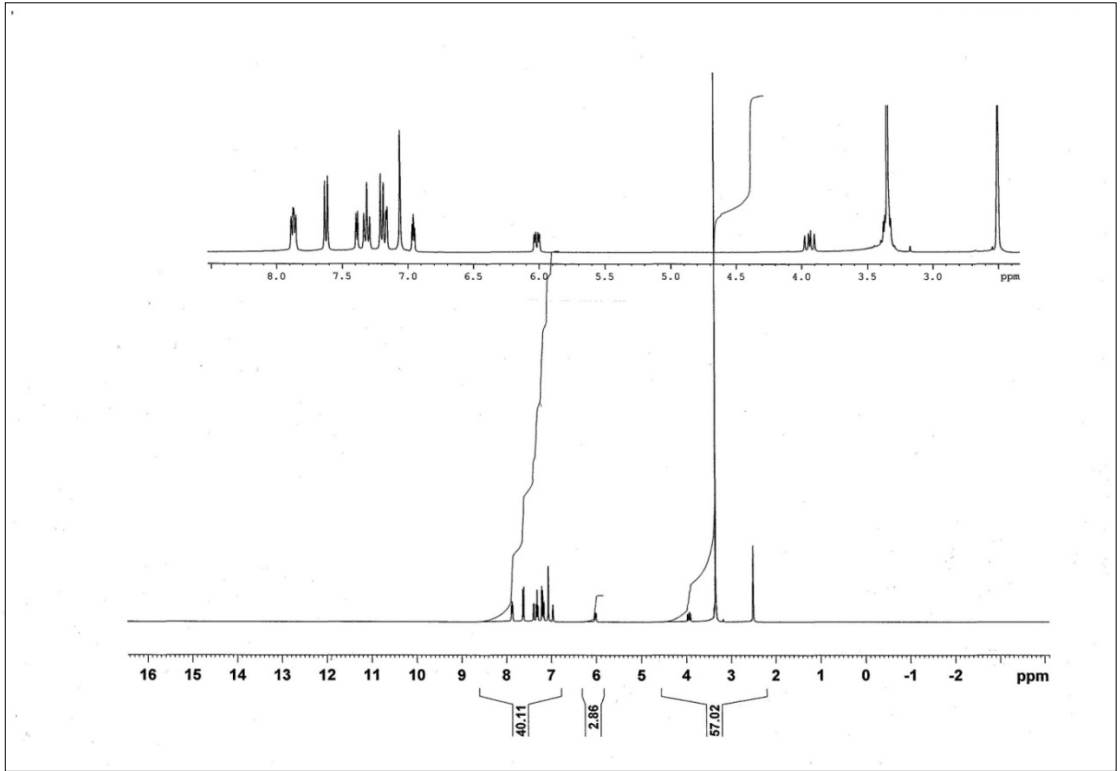
Şekil 4.6. B3 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



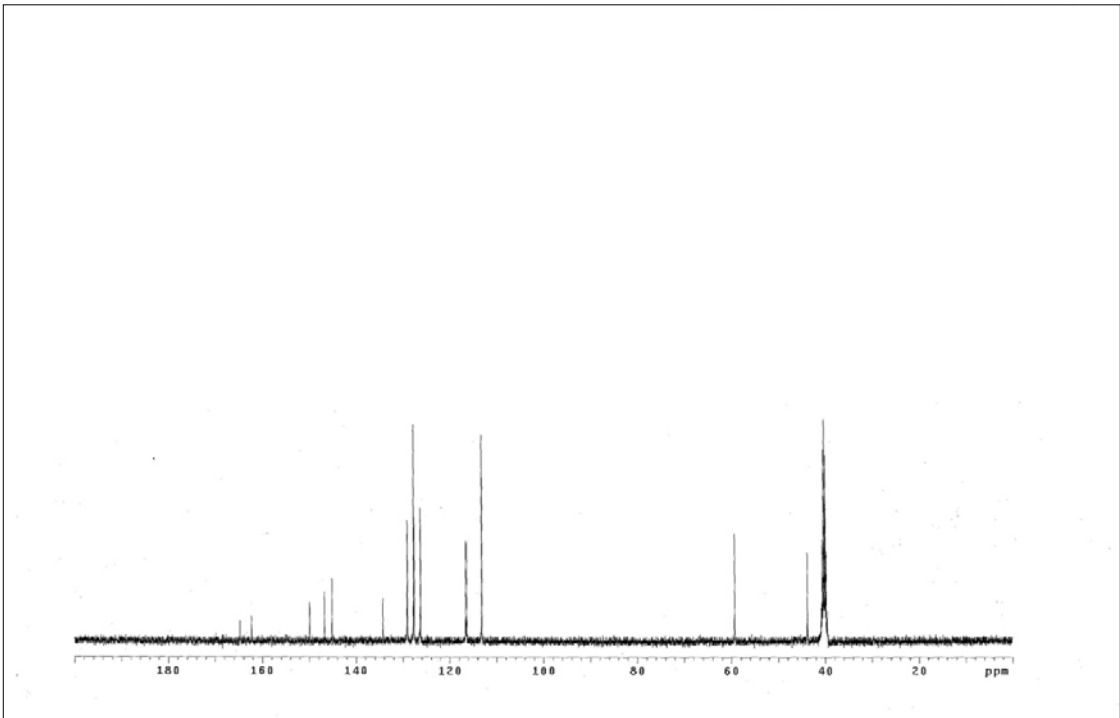
Şekil 4.7. B4 bileşiğinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



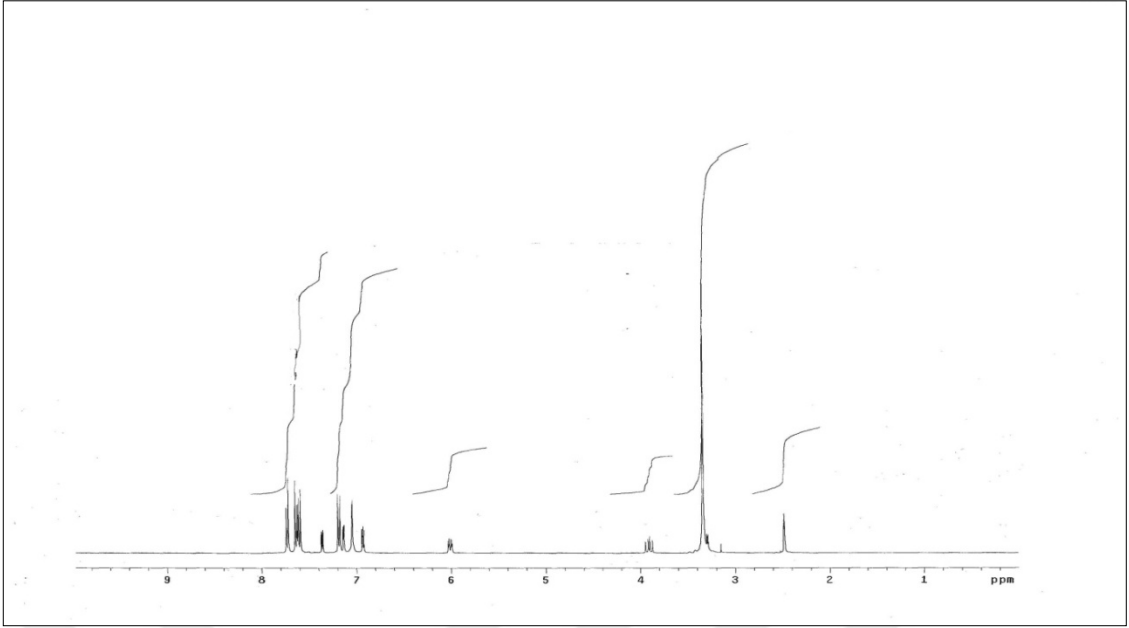
Şekil 4.8. B4 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



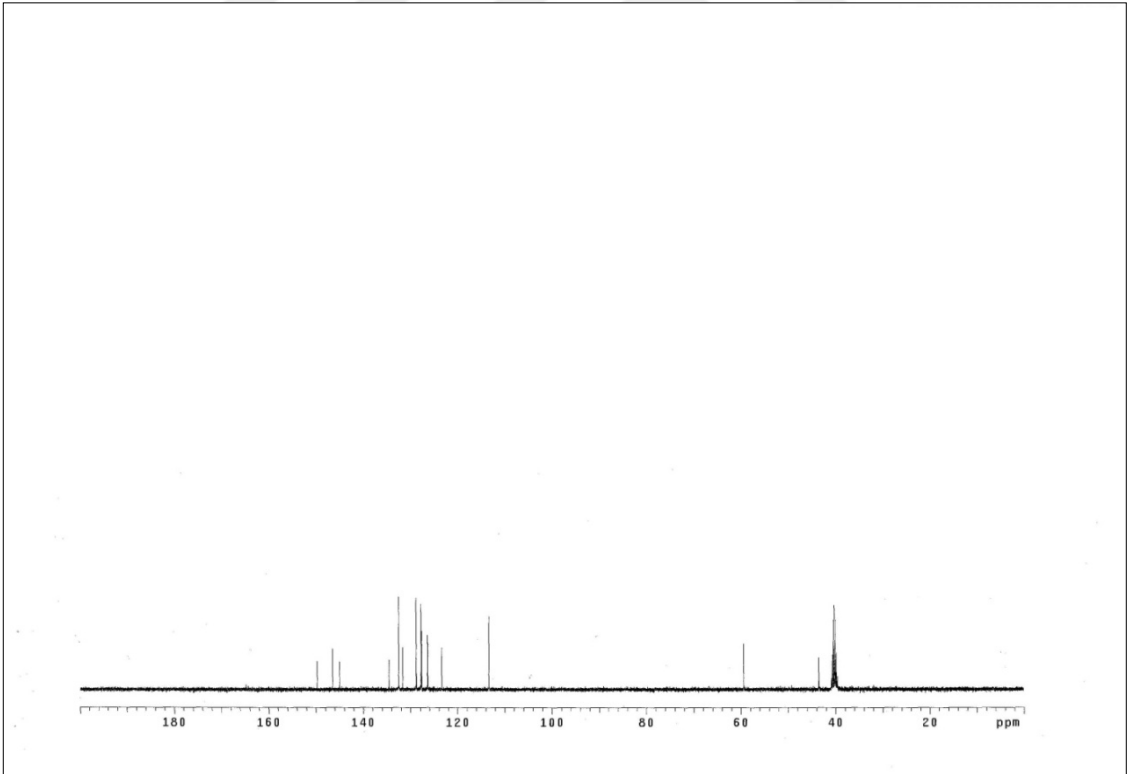
Şekil 4.9. B5 bileşiğinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



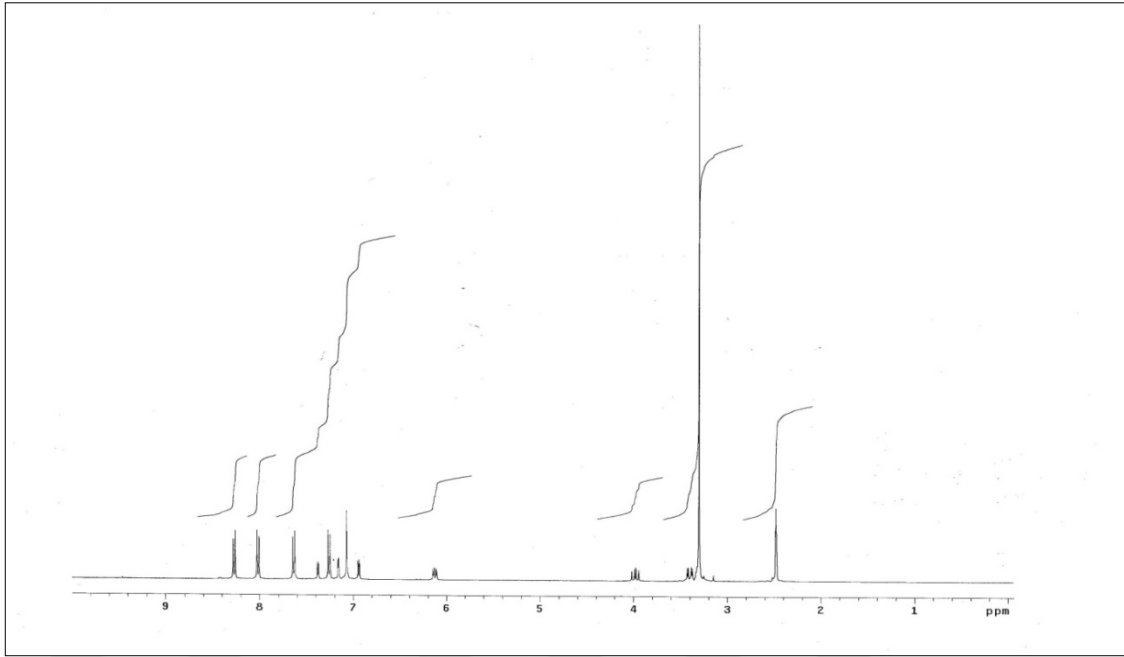
Şekil 4.10. B5 bileşiğinin  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumu



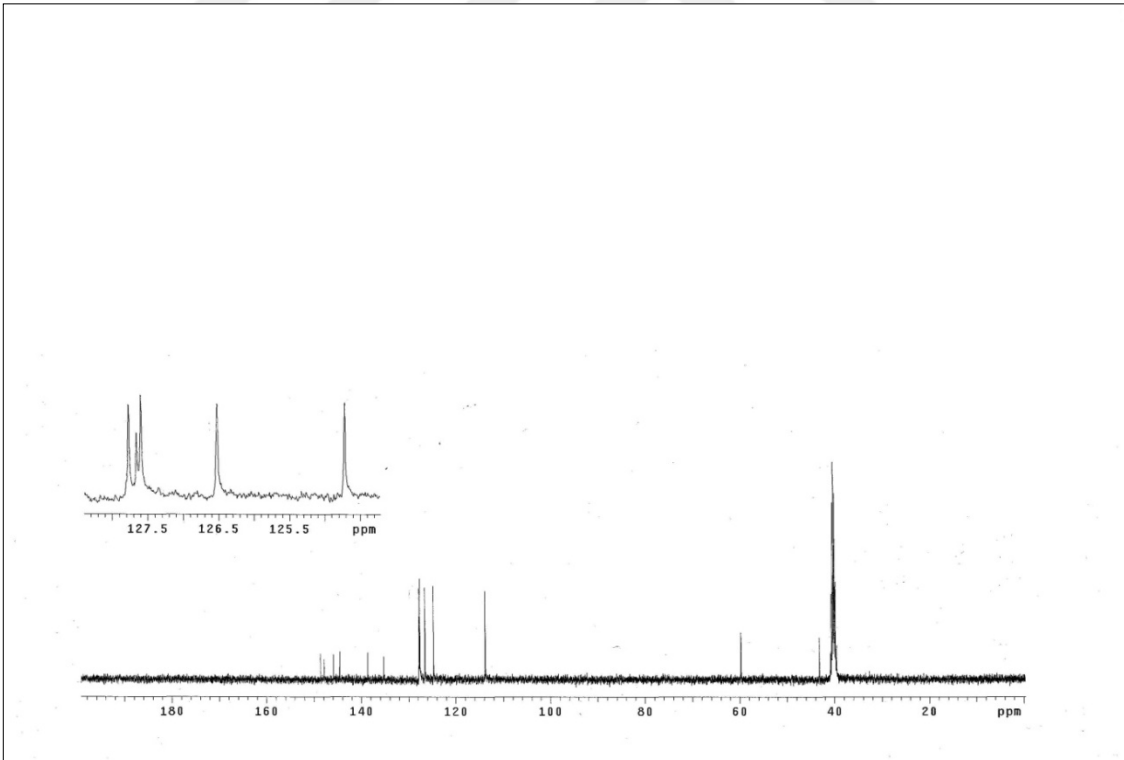
Şekil 4.11. B6 bileşiğinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



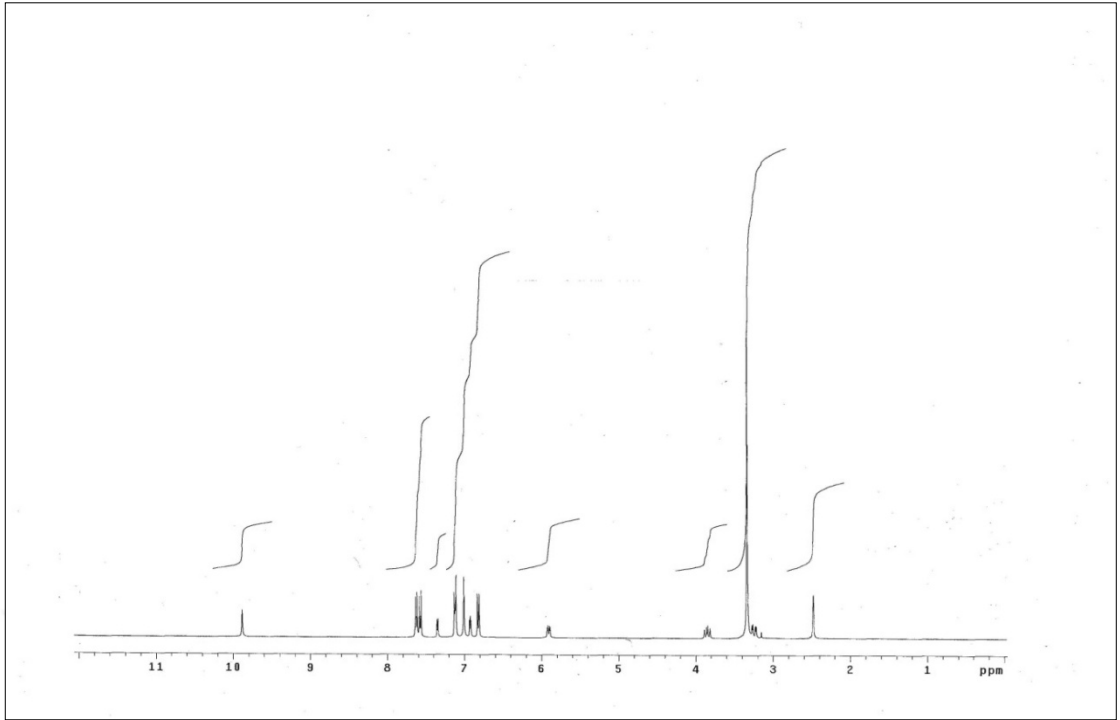
Şekil 4.12. B6 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



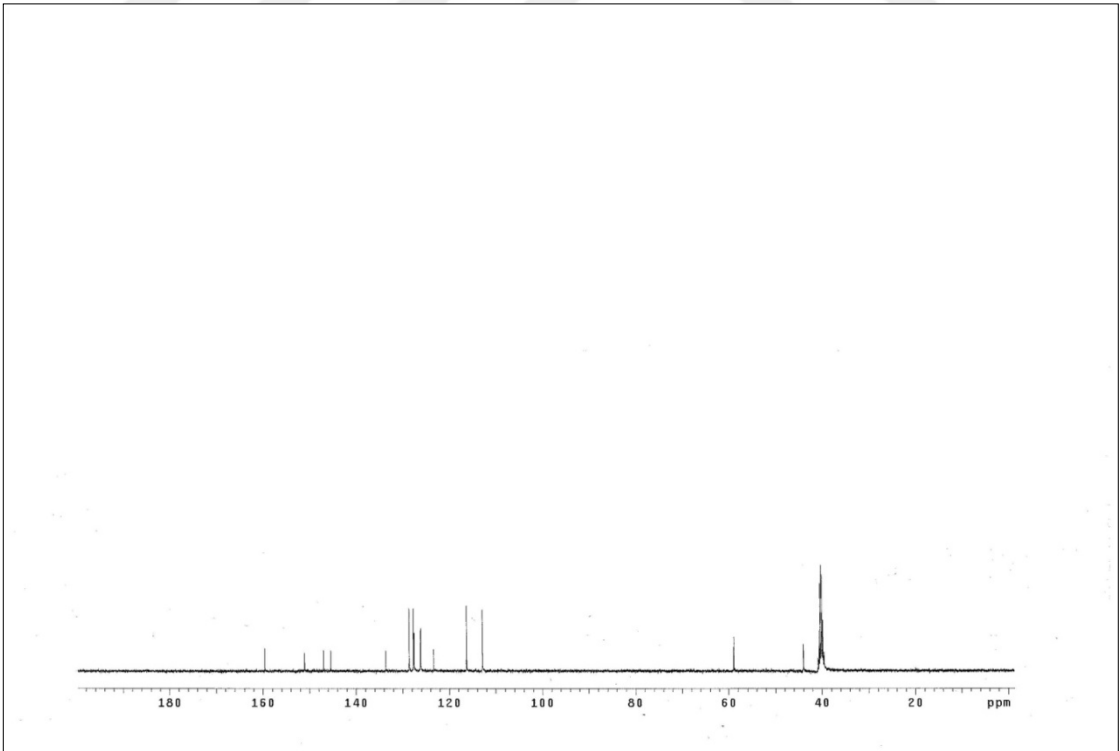
Şekil 4.13. B7 bileşiğinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



Şekil 4.14. B7 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



Şekil 4.15. B8 bileşiğinin  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



Şekil 4.16. B8 bileşiğinin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



**Tablo 4.5.** B1-B8 bileşiklerinin hCA I ve hCA II üzerindeki inhibisyon değerleri

Bileşik	IC <sub>50</sub> (nM)				K <sub>i</sub> (nM)	
	hCA I	r <sup>2</sup>	hCA II	r <sup>2</sup>	hCA I	hCA II
<b>B1</b>	520.66	0.9511	427.25	0.9726	441.99±88.26	372.48±67.37
<b>B2</b>	338.05	0.9964	491.14	0.9837	232.16±18.17	403.33±71.60
<b>B3</b>	412.25	0.9721	508.81	0.9611	432.85±95.90	441.02±110.8
<b>B4</b>	502.90	0.9667	487.34	0.9527	637.70±310.3	396.91±92.80
<b>B5</b>	521.84	0.9806	472.07	0.9704	630.58±301.1	455.80±128.4
<b>B6</b>	299.48	0.9903	436.67	0.9704	276.32±32.91	368.52±79.11
<b>B7</b>	337.88	0.9712	482.25	0.9489	291.74±22.74	342.07±94.07
<b>B8</b>	401.74	0.9819	523.02	0.9728	270.17±78.36	437.60±88.43
<b>AZA*</b>	985.77	0.9811	489.40	0.9972	278.76±44.28	293.43±46.41

\*Asetazolamid (AZA) tüm hCA izoenzimleri için standart inhibitör olarak kullanılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

1-(4-Aminosülfonilfenil)-3-(4-süstitüefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin genel kimyasal yapısına sahip sekiz adet bileşğin sentezi başarılı bir şekilde iki kademe gerçekleştirilmiştir.

İlk kademe süstitü asetofenonlardan hareketle 2-tiyofen karbaldehit ile Claisen Schmidt Kondenzasyon yöntemi ile 1,3-diaril-2-propen-1-on yapısındaki 8 adet şalkon bileşği (A1-A8) sentezlenmiştir. Bileşiklerin saflığı İ.T.K. ve literatür erime dereceleri ile kıyaslanarak kontrol edilmiştir.

İkinci adımda, A1-A8 şalkon bileşiklerinin 4-hidrazinobenzen-sülfonamid hidroklorür ile katalitik miktarda glasiyel asetik içeren etanol içerisinde Kondenzasyonu gerçekleştirilerek benzen sülfonamid içeren 1,3,5-trisüstitü pirazolin türevi bileşikler (B1-B8) sentezlenmiştir.

Sentezlerde kullanılan ketonlar sırasıyla şöyledir: Asetofenon (A1, B1), 4'-metilasetofenon (A2, B2), 4'-metoksiasetofenon (A3, B3), 4'-kloroasetofenon (A4, B4), 4'-floroasetofenon (A5, B5), 4'-bromoasetofenon (A6, B6), 4'-nitroasetofenon (A7, B7), 4'-hidroksiasetofenon (A8, B8).

Reaksiyonlar % 41-85 verimle [B1 (%77), B2 (%66), B3 (%71), B4(%41), B5 (%85), B6 (%58), B7 (%78), B8 (%83)] gerçekleşmiştir. Flor süstitü türevi olan B5, diğer bileşikler arasında en yüksek verimle sentezlenen bileşiktir. Bununla birlikte sentezlenen bileşikler arasında en düşük reaksiyon verimi ile elde edilen bileşik klor süstitü türevi B4'tür.

Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR ve HRMS ile doğrulanmıştır. Spektrumlara ait detaylar bulgular kısmında sunulmuştur.

Bileşiklerin karbonik anhidraz inhibitör aktiviteleri hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerinde karbonik anhidraz izoenzimlerinin esteraz aktivitesine bakılarak test edilmiştir ve sonuçlar, bulgular kısmında Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Bileşiklerin CA inhibisyon aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde, bileşiklerin hCA I için IC<sub>50</sub> değerlerinin 299.48-521.84 nM aralığında ve hCA II için IC<sub>50</sub> değerlerinin 427.25-523.02 nM aralığında olduğu bulunmuştur. Referans bileşik asetazolamidin IC<sub>50</sub> değeri hCA I'e karşı 985.77 nM iken hCA II'ye karşı 489.40 nM'dir.

Bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığı zaman, tüm bileşiklerin hCA I'e karşı Asetazolamid'den (AZA) 1.9-3.3 kat daha etkin inhibitör potansiyele sahip olduğu görülmüştür; bileşik B1 1.9 kat, bileşik B2 2.9 kat, bileşik B3 2.4 kat, bileşik B4 2.0 kat, bileşik B5 1.9 kat, bileşik B6 3.3 kat, bileşik B7 2.9 kat, bileşik B8 2.5 kat referans bileşik AZA'dan daha düşük IC<sub>50</sub> değerine sahiptir. IC<sub>50</sub> değerine göre hCA I'e karşı en etkin bileşik brom süstitüe türevi B6 bileşiği iken, en az etkin olan flor süstitüe türevi bileşik B5 ve süstitüent içermeyen B1 bileşiğidir.

IC<sub>50</sub> değerlerine göre, halojen taşıyan bileşiklerin hCA I'e karşı inhibitör aktivitesi ile halojenin elektronegatifliği arasında ters bir ilişki olduğu görülmektedir. IC<sub>50</sub> değeri 299.48 nM olan brom süstitüenti içeren bileşik B6, IC<sub>50</sub> değeri 521.84 olan flor süstitüenti içeren bileşik B5'ten daha etkin inhibisyon potansiyeli göstermekte iken, B5 bileşiği IC<sub>50</sub> değeri 502.90 nM olan klor süstitüenti içeren B4 bileşiğine göre daha düşük inhibisyon aktivitesi göstermiştir.

Fenil halkası üzerine eklenen flor dışındaki tüm süstitüentler, B1-B8 bileşiklerinin hCA I'e karşı IC<sub>50</sub> değerini azalttığından CA inhibitör potansiyelini artırmak için faydalı bir yapısal modifikasyon olmuştur. Metil süstitüenti içeren bileşik

B2 ve metoksi sübstitüenti içeren bileşik B3'ün  $IC_{50}$  değerleri kıyaslandığında B3'te oksijen atomu olmasından dolayı  $IC_{50}$  değerinin arttığı ve inhibisyon potansiyelinin azaldığı görülmektedir. Oksijen taşıyan metoksillenmiş bileşik B3 ile hidroksi sübstitüenti içeren bileşik B8  $IC_{50}$  değerleri açısından karşılaştırıldığında, B8'in B3'ten daha etkin bir inhibitör olduğu görülmektedir. Bu durum, oksijen üzerindeki sterik engelin azalmasının hCA I'e karşı inhibitör potansiyelin artmasına yardımcı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, azot üzerinde iki oksijen atomunun bulunduğu nitro grubunu sübstituent olarak içeren bileşik B7'nin inhibitör potansiyelinin hidroksi sübstitüenti içeren bileşik B8'den daha etkin olduğu görülmektedir.  $IC_{50}$  değerleri dikkate alındığında sübstitüentinde oksijen atomu içeren bileşiklerin hCA I'e karşı inhibisyon etkinlikleri karşılaştırıldığı zaman bileşik B7'nin bileşik B8'den, bileşik B8'in ise bileşik B3'ten daha etkin olduğu gözlenmiştir.

Elektron verici bir sübstituent olan metil grubunu fenil halkası üzerinde taşıyan bileşik B2, elektron çekici sübstituent nitroya sahip olan bileşik B7'ninkine benzer inhibitör aktiviteye (benzer  $IC_{50}$  değerine) sahiptir. Bu veriler ışığında hCA I izoenzimine karşı CA inhibisyon aktivitesinin fenil halkası üzerindeki sübstituentlerin elektronegativitesine bağlı olmadığı söylenebilir.

Bununla birlikte, hCA II'ye karşı bileşiklerin  $IC_{50}$  değerlerine bakıldığında, bileşikler AZA'ya benzer  $IC_{50}$  değerlerine sahiptir. Bileşiklerin  $IC_{50}$  değerlerine göre, hCA II'ye karşı en iyi inhibitör etkinliği gösteren, sübstituent içermeyen bileşik B1'dir. Fenil halkası üzerinde hidrojen haricindeki diğer sübstituentler bileşiklerin  $IC_{50}$  değerini artırarak inhibitör aktiviteyi azaltmıştır. En az inhibitör potansiyele sahip olan ise hidroksi sübstitüentli bileşik B8'dir.

Metoksi sübstitüentli bileşik B3'te metil ile hidrojenin yer değiştirmesi sonucunda oksijen atomu üzerindeki sterik engelin artması hCA II izoenzimine karşı

inhibisyon aktivitesini artırmıştır. Ayrıca, süstitüent olarak hidroksi grubunun (Bileşik B8) yerine nitro grubunun (Bileşik B7) gelmesi de aktiviteyi artırdığından yapısal modifikasyon çalışmalarında kullanılabilir. Elde edilen sonuçlara göre, halojen taşıyan bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerlerinin süstitüentlerin elektronegativitesine bağlı olmadığı görülmektedir.

hCA I'e karşı bileşiklerin K<sub>i</sub> değerlerinin 232.16±18.17-637.70±310.30 nM aralığında, hCA II'ye karşı K<sub>i</sub> değerlerinin ise 342.07±94.07-455.80±128.40 nM aralığında olduğu bulunmuştur. AZA'nın hCA I ve hCA II'ye karşı K<sub>i</sub> değerleri sırasıyla 278.76±44.28 ve 293.43±46.41 nM'dir.

Bileşiklerin K<sub>i</sub> değerlerine göre hCA I'e karşı en etkin inhibisyon aktivitesi gösteren bileşik, en düşük K<sub>i</sub> değerine sahip olan, metil süstitüenti içeren B2 bileşiğidir ve en az etkin olan ise klor süstitüenti içeren bileşik B4'tür. B2 bileşiği hCA I'e karşı AZA'dan daha etkin K<sub>i</sub> değerlerine sahiptir. Brom süstitüenti içeren B6 bileşiği ise hCA I'e karşı AZA'ya benzer bir K<sub>i</sub> değerine sahiptir. Bileşiklerin K<sub>i</sub> değerlerine göre, hCA II'ye karşı en etkin bileşik nitro süstitüenti içeren B7 bileşiği ve en az etkin olan flor süstitüenti içeren B5 bileşiğidir. Sentezlenen tüm bileşiklerin hCA II izoenzimine karşı AZA'dan daha az etkin olduğu görülmüştür.

Sentezlenen bileşikler B2, B4, B5, B6 ve B8 ayrıntılı spektral analiz ve biyoaktiviteleri sonuçları ile birlikte ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Bileşiklerin IC<sub>50</sub> değerlerine göre hCA I'e karşı en etkin olan bileşik brom süstitüenti içeren B6'dır ve AZA'dan 3.3 kat daha etkindir. hCA II'ye karşı en etkin olan bileşik ise süstitüent içermeyen B1 bileşiğidir. Bununla birlikte, K<sub>i</sub> değerlerine göre, hCA I'e karşı en etkin olan metil süstitüentli bileşik B2 ve hCA II'ye karşı en etkin olan nitro süstitüentli bileşik B7'dir ve ileriki çalışmalar için öncül bileşik olarak düşünülebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışılan bileşikler içinde  $K_i$  değerleri göz önüne alındığında hCA I'e karşı B2 (metilli bileşik), B8 (hidroksilli bileşik), B6 (bromlu bileşik) bileşikleri; hCA II'ye karşı B7 (nitrolu bileşik) bileşiği çalışılan bileşikler içinde en etkili olanlarıdır.

İleriki çalışmalarda Craig Grafiği'nin farklı bölmelerindeki süstitüentler biyolojik aktiviteyi yönlendirmek amacıyla tasarımlarda göz önünde bulundurulabileceği gibi, medisinal kimyada biyoaktiviteyi yönlendirebileceği kabul edilen pozisyonel izomeri yaklaşımına göre de yeni bileşikler tasarlanarak etkinlikleri test edilebilir.

## KAYNAKLAR

1. Meleddu R, Maccioni E, Distinto S, Bianco G, Melis C, Alcaro S, Cottiglia F, Ceruso M, Supuran CT. New 4-[(3-cyclohexyl-4-aryl-2,3-dihydro-1,3-thiazol-2-ylidene)amino]benzene-1-sulfonamides, synthesis and inhibitory activity toward carbonic anhydrase I, II, IX, XII. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 3281-3284.
2. Gul HI, Kucukoglu K, Yamali C, Bilginer S, Yuca H, Ozturk I, Taslimi P, Gulcin I, Supuran CT. Synthesis of 4-(2-substituted hydrazinyl)benzenesulfonamides and their carbonic anhydrase inhibitory effects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31: 568-573.
3. Durgun M, Turkmen H, Ceruso M, Supuran CT. Synthesis of Schiff base derivatives of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonamide with inhibitory activity against carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 2377-2381.
4. Gulcin I, Scozzafava A, Supuran CT, Koksall Z, Turkan F, Cetinkaya S, Bingol Z, Huyut Z, Alwasel SH. Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem*, In Press. DOI: 10.3109/14756366.2015.1135914, 2016.
5. De Simone G, Pizika G, Monti SM, Di Fiore A, Ivanova J, Vozny I, Trapencieris P, Zalubovskis R, Supuran CT, Alterio V. Hydrophobic substituents of the phenylmethylsulfamide moiety can be used for the development of new selective carbonic anhydrase inhibitors. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 523210.
6. Khloya P, Ceruso M, Ram S, Supuran CT, Sharma PK. Sulfonamide bearing pyrazolylypyrazolines as potent inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 3208-3212.

7. Kose LP, Gulcin I, Yildirim A, Atmaca U, Celik M, Alwaseel SH, Supuran CT. The human carbonic anhydrase isoenzymes I and II inhibitory effects of some hydroperoxides, alcohols, and acetates. *J Enzyme Inhib Med Chem*, In Press. DOI:10.3109/14756366.2015.1120723, 2015.
8. Pichake J, Kharkar PS, Ceruso M, Supuran CT, Toraskar MP. Carbonic anhydrase inhibitors: design, synthesis, and biological evaluation of novel sulfonyl semicarbazide derivatives. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5: 793-796.
9. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future Med Chem*, 2011, 3: 1165-1180.
10. Rahman MA, Siddiqui A. Pyrazoline derivatives: a worthy insight into the recent advances and potential pharmacological activities. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 2010, 2: 165-175.
11. Kumar S, Bawa S, Drabu S, Kumar R, Gupta H. Biological activities of pyrazoline derivatives-a recent development. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2009, 4: 154-163.
12. Yusuf M, Jain P. Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds. *Arabian J Chem*, 2014, 7: 553-596.
13. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Mol Divers*, 2011, 15: 305-316.
14. Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 375-401.
15. Lesburg CA, Christianson DW. X-ray crystallographic studies of engineered hydrogen-bond networks in a protein-zinc binding-site. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 6838-6844.



16. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 3467-3474.
17. Supuran CT. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2012, 27: 759-772.
18. Carradori S, Mollica A, De Monte C, Ganese A, Supuran CT. Nitric oxide donors and selective carbonic anhydrase inhibitors: a dual pharmacological approach for the treatment of glaucoma, cancer and osteoporosis. *Molecules*, 2015, 20: 5667-5679.
19. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 2003, 23: 146-189.
20. Winum JY, Rami M, Scozzafava A, Montero JL, Supuran C. Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med Res Rev*, 2008, 28: 445-463.
21. Carradori S, Mollica A, Ceruso M, D'Ascenzio M, De Monte C, Chimenti P, Sabia R, Akdemir A, Supuran CT. New amide derivatives of Probenecid as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII: biological evaluation and molecular modelling studies. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 2975-2981.
22. Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: an editorial. *Expert Opin Ther Pat*, 2013, 23: 677-679.
23. De Simone G, Supuran CT. (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J Inorg Biochem*, 2012, 111: 117-129.
24. Winum JY, Poulsen SA, Supuran CT. Therapeutic applications of glycosidic carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 2009, 29: 419-435.
25. Kolaczek A, Fusiarz I, Lawecka J, Branowska D. Biological activity and synthesis of sulfonamide derivatives: a brief review. *Chemik*, 2014, 68: 620-628.

26. Anand N. Sulfonamides: Structure-activity relationships and mechanism of action. In: Hitchings GH (ed). *Inhibition of Folate Metabolism in Chemotherapy*. NewYork, Springer Berlin Heidelberg, 1983: 25-54.
27. Supuran CT, Casini A, Scozzafava A. Development of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors. In: Supuran CT, Scozzafava A, Conway J. (eds). *Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators*. Florida, CRC Press, 2004: 67-148.
28. Clare BW, Supuran CT. QSAR studies of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitor. In: Supuran CT, Scozzafava A, Conway J. (eds). *Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators*. Florida, CRC Press, 2004: 148-182.
29. Mann T, Keilin D. Sulphanilamide as a spesific inhibitor of carbonic anhydrase. *Nature*, 1940, 146: 164-165.
30. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms? *Chem Rev*, 2012, 112: 4421-4468.
31. Kılınç N. Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimlerinin Koyun Midesiden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Bazı İlaçların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2011.
32. Kakeya N, Aoki M, Kamada A, Yata N. Biological activities of drugs. VI. Structure-activity relationship of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors (1). *Chem Pharm Bull*, 1969, 17: 1010-1018.
33. Kakeya N, Yata N, Kamada A, Aoki M. Biological activities of drugs. VIII. Structure-activity relationship of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors (3). *Chem Pharm Bull*, 1969, 17: 2558-2564.

34. Supuran CT, Clare BW. A quantitative structure-activity relationship study of positively charged sulfonamide inhibitors. *Eur J Med Chem*, 1995, 30: 687-696.
35. Venkataraman S, Jain S, Shah K, Upmanyu N. Synthesis and biological activity of some novel pyrazolines. *Acta Pol Pharm*, 2010, 67: 361-366.
36. Indian Electronic Theses and Dissertation. 2-Pyrazolines. [http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/bitstream/10603/14138/10/10\\_chapter%202.pdf](http://shodhganga.inflibnet.ac.in:8080/jspui/bitstream/10603/14138/10/10_chapter%202.pdf) . 9 Haziran 2016.
37. Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Kaplancikli ZA, Revial G, Guven K. Synthesis and antimicrobial activity of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives. *Eur J Med Chem*, 2007, 42: 403-409.
38. Abdel-Wahab BF, Abdel-Aziz HA, Ahmed EM. Synthesis and antimicrobial evaluation of 1-(benzofuran-2-yl)-4-nitro-3-arylbutan-1-ones and 3-(benzofuran-2-yl)-4,5-dihydro-5-aryl-1-[4-(aryl)-1,3-thiazol-2-yl]-1H-pyrazoles. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 2632-2635.
39. Sharma PK, Kumar S, Kumar P, Kaushik P, Kaushik D, Dhingra Y, Aneja KR. Synthesis and biological evaluation of some pyrazolopyrazolines as anti-inflammatory-antimicrobial agents. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 2650-2655.
40. Sivakumar PM, Seenivasan SP, Kumar V, Doble M. Novel 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines as anti-infective agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 3169-3172.
41. Ramesh B, Sumana T. Synthesis and anti-inflammatory activity of pyrazolines. *E-J Chem*, 2010, 7: 514-516.
42. Singh SP, Chaudhari A, Barthwal JP, Parmar SS. Anticonvulsant activity and selective inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent oxidations by 1,3,5-trisubstituted pyrazolines. *J Pharm Sci*, 1974, 63: 1948-1950.

43. Rathish IG, Javed K, Ahmad S, Bano S, Alam MS, Pillai KK, Singh S, Bagchi V. Synthesis and antiinflammatory activity of some new 1,3,5-trisubstituted pyrazolines bearing benzene sulfonamide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 255-258.
44. Bhat AR, Athar F, Azam A. Bis-pyrazolines: synthesis, characterization and antiamebic activity as inhibitors of growth of *Entamoeba histolytica*. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 426-431.
45. Prasad YR, Rao AL, Prasoon L, Murali K, Kumar PR. Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2''-hydroxy naphthalen-1''-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 5030-5034.
46. Dimmock JR, Kandepu NM, Hetherington M, Quail JW, Pugazhenti U, Sudom AM, Chamankhah M, Rose P, Pass E, Allen TM, Halleran S, Szydlowski J, Mutus B, Tannous M, Manavathu EK, Myers TG, De Clercq E, Balzarini J. Cytotoxic activities of Mannich bases of chalcones and related compounds. *J Med Chem*, 1998, 41: 1014-1026.
47. Sharma PK, Kumar S, Kumar P, Kaushik P, Sharma C, Kaushik D, Aneja KR. Synthesis of 1-(4-aminosulfonylphenyl)-3,5-diarylpyrazoline derivatives as potent antiinflammatory and antimicrobial agents. *Med Chem Res*, 2012, 21: 2945-2954.
48. Yildirim A, Atmaca U, Keskin A, Topal M, Celik M, Gulcin I, Supuran CT. N-acylsulfonamides strongly inhibit human carbonic anhydrase isoenzymes I and II. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 2598-2605.
49. Gulcin I, Kufrevioglu OI, Oktay M. Purification and characterization of polyphenol oxidase from nettle (*Urtica dioica* L.) and inhibitory effects of some chemicals on enzyme activity. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2005, 20: 297-302.

50. Boztas M, Cetinkaya Y, Topal M, Gulcin I, Menzek A, Sahin E, Tanc M, Supuran CT. Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxybromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. *J Med Chem*, 2015, 58: 640-650.
51. Sarikaya SB, Sisecioglu M, Cankaya M, Gulcin I, Ozdemir H. Inhibition profile of a series of phenolic acids on bovine lactoperoxidase enzyme. *J Enzym Inhib Med Chem*, 2015, 30: 479-483.
52. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
53. Şehitoğlu MH. Bazı Fenolik Doğal Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi ve İnsan Karbonik Anhidraz İzoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) Üzerine İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2012.
54. Verpoorte JA, Mehta S, Edsall JT. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *J Biol Chem*, 1967, 242: 4221-4229.
55. Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*, 1934, 56: 658-666.
56. Goksu S, Naderi A, Akbaba Y, Kalin P, Akincioglu A, Gulcin I, Durdagi S, Salmas RE. Carbonic anhydrase inhibitory properties of novel benzylsulfamides using molecular modeling and experimental studies. *Bioorg Chem*, 2014, 56: 75-82.
57. Topal M, Gulcin I. Rosmarinic acid: a potent carbonic anhydrase isoenzymes inhibitor. *Turk J Chem*, 2014, 38: 894-902.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p><b>Adı Soyadı</b> :Birnur CÖMEZ <b>Doğum Tarihi</b> : 19.05.1989 <b>Doğum Yeri</b> : Samsun <b>Medeni Hali</b> :Bekar <b>Uyruğu</b> : T.C. <b>Adres</b> : Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM <b>Tel</b> : 0507 828 35 90 <b>Faks</b> : - <b>E-mail</b> :birnur01@gmail.com</p>
Eğitim
<p><b>Lise</b> : Samsun Anadolu Lisesi (2007) <b>Lisans</b> : Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2007-2012) <b>Yüksek Lisans</b>: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı (2013- ) <b>Doktora</b> : -</p>
Yabancı Dil Bilgisi
<p>İngilizce : Orta Derece (YDS 77.5, Eylül 2015)</p> <p>Almanca : _____</p> <p>Rusça : _____</p>
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

## EK 2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı  
Etik Alt Kurulu



Sayı : 93722986.12/648  
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

11/11/2015

Sayın Doç. Dr. Ebru METE

İlgi: 06.10.2015 tarih ve 722 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Etik Alt Kurulunun 11.11.2015 tarihinde almış olduğu 12' nolu kararı ile "1-(4-Aminosülfonilfenil)-3-(4-Sübstitülefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin bileşiklerinin sentezi ve Karbonik Anhidraz inhibe edici etkilerinin araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans öğrenciniz Birnur CÖMEZ ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

  
Doç. Dr. Meltem ÇETİN  
Etik Alt Kurul Başkanı

**Karar-12-**Üniversitemiz Fen Fakültesi Öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ebru METE'nin Danışmanı olduğu Yüksek Lisans öğrencisi Birnur CÖMEZ'in Fakültemiz Farmasötik Kimya ve Fen Fakültesi Kimya Laboratuvarlarında yürütülecek olan "1-(4-Aminosülfonilfenil)-3-(4-Sübstitülefenil)-5-(tiyofen-2-il)-2-pirazolin bileşiklerinin sentezi ve Karbonik Anhidraz inhibe edici etkilerinin araştırılması" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 06.10.2015 tarih ve 722 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.