



**3,4-(7-OKSABİSİKLO[2.2.1]HEPT-5-EN) PİROLİDİN-
2,5-DİON BİRİMİ İÇEREN YENİ KALKON
TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU
VE KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİ**

**Fikret ELİGÜZEL
YÜKSEK LİSANS
KİMYA ANA BİLİM DALI
Doç.Dr. Yakup BUDAK
2016**

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**3,4-(7-OKSABİSİKLO[2.2.1]HEPT-5-EN) PİROLİDİN-2,5-DİON
BİRİMİ İÇEREN YENİ KALKON TÜREVLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE KARBONİK ANHİDRAZ I VE II
İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİ**

Fikret ELİGÜZEL

**TOKAT
2016**

Her hakkı saklıdır

Bu tez çalışması; **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu** tarafından **Bap 2011/62** nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tez çalışması; **Tübitak 111 T 990** nolu proje ile desteklenmiştir.

Fikret Eligüzel tarafından hazırlanan “3,4-(7-Oksabisiklo[2.2.1]hept-5-en) pirolidin-2,5-dion birimi içeren yeni kalkon türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve karbonik anhidraz I ve II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 18/01/2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu İle Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Yakup BUDAK

Üye
Prof. Dr. Mustafa CEYLAN
Gazi Osman Paşa Üniversitesi

Üye
Yrd. Doç.Dr. Hayrettin GEZEĞEN
Cumhuriyet Üniversitesi

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07.01.2016 tarih ve 01 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

Fen BilimLeri Enstitüsü Müdürü

18-02/2016

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdđi yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Fikret ELİGÜZEL

18/01/2016

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

3,4-(7-OKSABİSİKLO[2.2.1]HEPT-5-EN) PİROLİDİN-2,5-DİON
BİRİMİ İÇEREN YENİ KALKON TÜREVLERİNİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİLERİ

FİKRET ELİGÜZEL

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. YAKUP BUDAK)

ÖZET

Bu çalışmada, ilk olarak biyolojik aktivite göstermeye aday 3,4-(7-Oksabisiklo [2.2.1] hept-5-en) pirolidin-2,5-dion birimi içeren kalkon türevleri sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen bu bileşiklerin bromlama reaksiyonları literatürde bilinen yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak sentezlenen bu bileşiklerin insan karbonik anhidraz izoenzimleri I ve II (hCA I ve II) inhibe edici etkileri incelenmiştir. Her iki izoenzim taze insan kırmızı kan hücrelerinden Sefaroz-4B-L-Tirosin-sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kalkon türevinin tümü(8a-i), in vitro koşullarda, esteraz aktivitesini kullanarak yapılan aktivite deneylerinde her iki izoenzimde düşük nanomolar inhibitör etki göstermiştir. İnsan kanı eritrositlerinden saflaştırılan CA aktivitelerinin %50'sinin inhibe edildiği kalkon türevi konsantrasyonu (IC₅₀) ve bu bileşikler için Ki değerleri, Lineiawer-Burk grafiklerden hesaplandı. Kalkon türevi 8a 11.30 nM K_i değeri ile hCA I enzimi üzerine, kalkon türevi 8c 8.20 nM K_i değeri ile hCA II enzimi üzerine en iyi inhibe etkisi göstermiştir.

2016, 95 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Kalkon, Michael tipi katılma, Bromlama, Dies-Alder, Claisen-Schmidt kondenzasyonu, karbonik anhidraz, inhibisyon

ABSTRACT

SYNTHESIS OF NEW CHALCONES DERIVATIVES WHICH CONTAINING 3,4-(7-OXO-BICYCLO [2.2.1] HEPT-5-ENE) PYRROLIDINE-2,5-DIONE, CHARACTERIZATION AND INHIBITION EFFECTS ON ISOENZYMES OF CARBONIC ANHYDRASE I AND II

FIKRET ELİGÜZEL

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY DEPARTMENT

(THESIS SUPERVISOR: ASSOC. PROF. YAKUP BUDAK)

First of all, in this study, chalcone derivatives which are candidates for showing biologic activity that contain units of 3,4-(7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-ene) pyrrolidine-2,5-dione were synthesized. Then after, the bromization reactions of the units that were synthesized were carried out, using the well known methods in literature. Finally, the inhibited effects of the synthesized units of the I and II (hCA I and II) human carbonic anhydrase isoenzymes were examined. Both of the two isoenzymes were purified with a Sepharose-4B-L-Tyrosine-sulfalinamide affinity chromatography attained from the red blood cells of the fresh human. In the esterase activity experiment, all of the derivatives of chalcone(8a-i) in vitro conditions revealed that the lower nanomoles showed an inhibitor effect in both of the isoenzymes. The chalcone derivative concentration (IC₅₀) inhibited from %50 of CA activities that were purified by the human blood erythrocytes and the K_i values of these composites were calculated with the Lineviawer-Burk graph. The chalcone derivative 8a 11.30 showed the best inhibit effect on the value of K_i whereas the chalcone derivative of 8c 8.20 nM showed the best inhibit effect on the value of K_i and the hCA enzyme.

2016, 95 pages

KEY WORDS: Chalcone, Michael type conjugate addition, bromization, Dies-Alder, The Claisen-Schmidt condensation, carbonic anhydrate, inhibition

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmının organik kimya bölümü Gazi Osman Paşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Organik Kimya Laboratuvarında, biyokimya kısmı ise Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Yüksek lisans çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleri ile bana yön veren, her konuda yakın ilgi ve özveri gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yakup BUDAK'a, çalışmalarım sırasında her zaman yardımını gördüğüm Prof. Dr. Mustafa CEYLAN'a, Yrd. Doç. Dr. M. Burcu GÜRDERE hanımefendiye, Yrd. Doç. Dr. Hayreddin GEZEĞEN'e, Yrd. Doç. Dr. Ümit M. KOÇYİĞİT'e, Oğuz ÖZBEK'e ve Atatürk Üniversitesindeki çalışmalarımızda bizden yakın ilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e;

Çalışmalarım boyunca bana her zaman yardımcı olan organik sentez ve kataliz laboratuvarındaki arkadaşlarıma, NMR da görevli arkadaşlarıma;

Bölümümüzün her türlü imkânlarından faydalanmamı sağlayan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü yöneticileri, öğretim üyeleri, araştırma görevlileri ve tüm elemanlarına;

Beni yetiştirip bu günlere gelmeme vesile olan, bu günleri görmeyi çok isteyen rahmetli babama, verdikleri maddi manevi desteklerle hep yanımda olan aileme;

Yoğun çalışmalarım sırasında gösterdiği anlayış ve destekten dolayı sevgili eşime ve çocuklarıma şükranlarımı sunarım.

FİKRET ELİGÜZEL

18/01/2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Kalkonlar	3
2.2. Süksinimit Birimi İçeren Bileşikler	4
2.3. CA (Karbonik Anhidraz) Enzimi	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1. Kullanılan Materyaller	14
3.1.1. Kullanılan Araç ve Malzemeler	14
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	14
3.1.2.1. Reaktifler	14
3.1.2.2. Çözücü ve Kurutucular	14
3.1.2.3. Kolon Dolgu Maddeleri	14
3.1.3. Saflaştırma	14
3.1.3.1. Karbon tetraklorür.....	14
3.1.3.2. Metilen klorür	15
3.1.3.3. Hekzan Petrol Eteri	15
3.1.4. Cihazlar	15
3.1.5. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler.....	16
3.1.6. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi(SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler.....	17
3.2. Saflaştırma Yöntemleri	18
3.2.1. Kolon Kromatografisi	18
3.2.2. İnce kolon kromatografisi	18
3.2.3. Kristallendirme	18

3.3.1. (3aR,4S,7R,7aS)-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoizobenzofuran-1,3dion (3) Sentezi İçin Genel Yöntem.....	18
3.3.2. (3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-asetilfenil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metano-izoindol-1,3(2H)dion (5) Sentezi İçin Genel Yöntem.....	19
3.3.3. (3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-((E)-3-(p-tolil)akrilol)fenil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3-(2H) dion (7) Sentezi İçin Genel Yöntem	19
3.3.4. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibrom -2-(4-(2,3dibrom-3-(4-metoksifenil)propanoil)fenil) heksahidro-1H-4,7-metanizoindol-1,3-(2H)dionsentezi.....	21
3.3.5. Enzim saflaştırma çalışmaları	23
3.3.5.1. hCA izoenzimlerinin hemolizatının hazırlanması	23
3.3.5.2. hCA izoenzimlerinin saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar	23
3.3.5.3. Afinite kolonunun paketlenmesi	24
3.3.5.4. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	25
3.4. hCA izoenzimleri Aktivitesi Tayini.....	25
3.4.1. Esterazaktivitesi	25
3.5. Protein Tayini	27
3.5.1. Kalitatif proteintayini.....	27
3.5.2. Kantitatif proteintayini.....	27
3.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü.....	28
3.7. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Kalkon Türevlerinin Etkisinin Belirlenmesi	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1. Bazı kalkon türevlerinin karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları.....	35
5. SONUÇ (TARTIŞMA VE SONUÇ).....	81
6. KAYNAKLAR	83
7. EKLER	87
8. ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

δ	Kimyasal Kayma
d	Dublet
dd	Dubletin dubleti
Hz	Hertz
J	Etkileşme sabiti
m	Multiplet
s	Singlet
t	Triplet
I	İnhibitör
V	Enzimatik reaksiyon hızı

Kısaltmalar

Açıklama

AcOH	Asetik asit
DMSO	Dimetilsülfoksit
CDC13	Dötorokloroform
IR	Infrared
NMR	Nükleer manyetik rezonans
ppm	Milyonda bir kısım (NMR spektrumunda ölçü birimi)
E. N.	Erime Noktası
E.Ü.	Enzim Ünitesi
E:C.	Enzim kod numarası
hCA I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
hCA II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
His	Histidin
Val	Valin
μ M	Mikromolar
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _m	Maksimum hızın yarısına neden olan substrat derişimi
K _i	Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
NBT	Nitroblue tetrazolium
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Triklorasetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
Tris	Trihidroksimetil amino metan
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
V _{max}	Maksimum hız
AZA	Asetazolamid

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları (Ataseverveark., 2013).....	24
Şekil 3.2. <i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	25
Şekil 4.1. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)dion400 MHz ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	29
Şekil 4.2. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metano ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃) iso-indol 1,3(2H) dion400MHz).....	30
Şekil 4.3. hCA I enzimi için 6 farklı 8a konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8a] grafiği.....	36
Şekil 4.4. hCA I enzimi üzerine 8a nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 4.5. hCA I enzimi için 6 farklı 8b konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8b] grafiği.....	37
Şekil 4.6. hCA I enzimi üzerine 8b nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 4.7. hCA I enzimi için 6 farklı 8c konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8c] grafiği.....	39
Şekil 4.8. hCA I enzimi üzerine 8c nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	39
Şekil 4.9. hCA I enzimi için 6 farklı 8d konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8d] grafiği.....	40
Şekil 4.10. hCA I enzimi üzerine 8d nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	41
Şekil 4.11. hCA I enzimi için 6 farklı 8e konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8e] grafiği.....	42
Şekil 4.12. hCA I enzimi üzerine 8e nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	42
Şekil 4.13. hCA I enzimi için 6 farklı 8f konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8f] grafiği.....	43
Şekil 4.14. hCA I enzimi üzerine 8f nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	44
Şekil 4.15. hCA I enzimi için 6 farklı 8g konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8g] grafiği.....	45
Şekil 4.16. hCA I enzimi üzerine 8g nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	45
Şekil 4.17. hCA I enzimi için 6 farklı 8h konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8h] grafiği.....	46
Şekil 4.18. hCA I enzimi üzerine 8h nolu organik bileşiği için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	47
Şekil 4.19. hCA I enzimi için 6 farklı 8i konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8i] grafiği.....	48
Şekil 4.20. hCA I enzimi üzerine 8i nolu organik bileşiği için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	48

Şekil 4.2.1. hCA I I enzimi için 6 farklı 8a konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8a] grafiği.....	49
Şekil 4.2.2. hCAII enzimi üzerine 8a nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 4.2.3. hCA I I enzimi için 6 farklı 8b konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8b] grafiği.....	51
Şekil 4.2.4. hCAII enzimi üzerine 8b nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	51
Şekil 4.2.5. hCA I I enzimi için 6 farklı 8c konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8c] grafiği.....	52
Şekil 4.2.6. hCA II enzimi üzerine 8c nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	53
Şekil 4.2.7. hCA I I enzimi için 6 farklı 8d konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8d] grafiği.....	54
Şekil 4.2.8. hCA II enzimi üzerine 8d nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	54
Şekil 4.2.9. hCA I I enzimi için 6 farklı 8e konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8e] grafiği.....	55
Şekil 4.2.10. hCA II enzimi üzerine 8e nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	56
Şekil 4.2.11. hCA I I enzimi için 6 farklı 8f konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8f] grafiği.....	57
Şekil 4.2.12. hCA II enzimi üzerine 8f nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	57
Şekil 4.2.13. hCA I I enzimi için 6 farklı 8g konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8g] grafiği.....	58
Şekil 4.2.14. hCA II enzimi üzerine 8g nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	59
Şekil 4.2.15. hCA I I enzimi için 6 farklı 8h konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8h] grafiği.....	60
Şekil 4.2.16. hCA II enzimi üzerine 8h nolu organik bileşiği için çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	60
Şekil 4.2.17. hCA I I enzimi için 6 farklı 8i konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite [8i] grafiği.....	61
Şekil 4.2.18. hCA II enzimi üzerine 8i nolu organik bileşiğin etkisi çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	62
Şekil 7.1. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(p- toli) pro- panoil) fenil) heksahidro -1H-4,7-metanoisindol-1,3 (2H)-dion(8b).....	87
Şekil 7.2. (3aR,4S,5S,7R,7aS)5,6dibromo2(4(2,3dibromo3(4klorofenil) propa-noil) fenil) heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(8c).....	88
Şekil 7.3. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4- bromo- fenil) propanoil) fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3 (2H)- dion (8d).....	89

Şekil 7.4. (3aR,4S,5S,7R,7aS)5,6dibromo2(4(2,3dibromo3(3metoksifenil) pro-panoil) fenil) hegzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(8e).....	90
Şekil 7.5. (3aR,4S,5S,7R,7aS)5,6dibromo2(4(2,3dibromo3(3metoksifenil) pro-panoil) fenil) hegzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(8f).....	91
Şekil 7.6. (3aR,4S,5S,7R,7aS)5,6dibromo2(4(2,3dibromo3(3klorofenil) pro-panoil) phenyl) hegzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion (8g)	92
Şekil 7.7. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(furan-2- il) propanoil) fenil) hegzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion (8h).....	93
Şekil 7.8. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo – 2 - (4 - (2, 3- dibromo-3-(tiyofen-2-il) propanoil) fenil)hegzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)- dion (8i).....	94

ÇİZELGE LİSTESİ

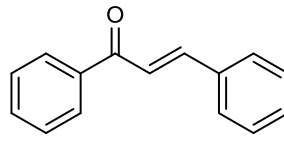
	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Sentezlenen çıkış bileşikleri.....	20
Çizelge 3.2. Sentezlenen çıkış bileşikleri.....	22
Çizelge 3.3. Esteraz aktivitesi için 3mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler.....	26
Çizelge 3.4. Esteraz aktivitesi için 1 mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler.....	26
Çizelge 4.1.1. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8a nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8a iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	35
Çizelge 4.1.2. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8b nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8b iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	37
Çizelge 4.1.3. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8c nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8c iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	38
Çizelge 4.1.4. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8d nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8d iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	40
Çizelge 4.1.5. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8e nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8e iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	41
Çizelge 4.1.6. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8f nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8f iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	43
Çizelge 4.1.7. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8g nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8g iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	44
Çizelge 4.1.8. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8h nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8h iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	46
Çizelge 4.1.9. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8i nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8i iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	47
Çizelge 4.2.1. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8a nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8a iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	49
Çizelge 4.2.2. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8b nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8b iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	50
Çizelge 4.2.3. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8c nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8c iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	52
Çizelge 4.2.4. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8d nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8d iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	53

Çizelge 4.2.5. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8e nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8e iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	55
Çizelge 4.2.6. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8f nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8f iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	56
Çizelge 4.2.7. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8g nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8g iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	58
Çizelge 4.2.8. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8h nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8h iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	59
Çizelge 4.2.9. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8i nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8i iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri.....	61
Çizelge 4.3.1. hCA I enzimi üzerine 8a nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	62
Çizelge 4.3.2. hCA I enzimi üzerine 8b nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	63
Çizelge 4.3.3. hCA I enzimi üzerine 8c nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	64
Çizelge 4.3.4. hCA I enzimi üzerine 8d nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	65
Çizelge 4.3.5. hCA I enzimi üzerine 8e nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	66
Çizelge 4.3.6. hCA I enzimi üzerine 8f nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	67
Çizelge 4.3.7. hCA I enzimi üzerine 8g nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	68
Çizelge 4.3.8. hCA I enzimi üzerine 8h nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	69
Çizelge 4.3.9. hCA I enzimi üzerine 8i nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	70
Çizelge 4.4.1. hCA II enzimi üzerine 8a nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	71

Çizelge 4.4.2. hCA II enzimi üzerine 8b nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	72
Çizelge 4.4.3. hCA II enzimi üzerine 8c nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	73
Çizelge 4.4.4. hCA II enzimi üzerine 8d nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	74
Çizelge 4.4.5. hCA II enzimi üzerine 8e nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları.....	75
Çizelge 4.4.6. hCA II enzimi üzerine 8f nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	76
Çizelge 4.4.7. hCA II enzimi üzerine 8g nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	77
Çizelge 4.4.8. hCA II enzimi üzerine 8h nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	78
Çizelge 4.4.9. hCA II enzimi üzerine 8i nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhi bitör konsantrasyonları.....	79
Çizelge 4.5. İnsan kanı eritrosit hücrelerinden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin 9 farklı organik bileşik için K_i ve IC_{50} değerleri.....	80

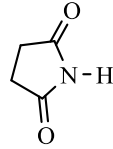
1.GİRİŞ

Kalkonlar hem doğal hem de sentetik olarak elde edilebilen, flavonoid ailesine üye bileşikler olup geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptirler (Lunardi ve ark., 2003). Bu yüzden, son yıllarda kalkon ve türevlerine ilgi artmış ve çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kalkonlar, tıbbi terapinin yanı sıra polimerlerde UV-absorbsiyon filtresi olarak, farklı tipteki optik materyallerde ve holografik kayıt teknolojisi gibi pek çok uygulama alanında da kullanılmaktadırlar (Fayed ve ark., 2004). Bu nedenle kalkon türevlerinin farklı analoglarının da biyoaktif potansiyellere sahip olması beklenir.



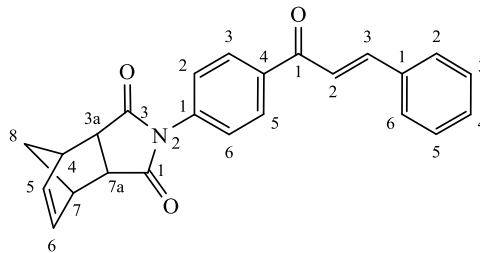
Kalkon

Süksünimit birimi içeren bileşiklerin de kalkonlar gibi antibakteriyal (Khalil ve ark., 2010), analjezik (Antunes ve ark.,1998) antioksidan ve antikanser (Singh ve ark.,2001) gibi çeşitli biyolojik aktiviteye sahip oldukları literatürlerde bildirilmiştir.



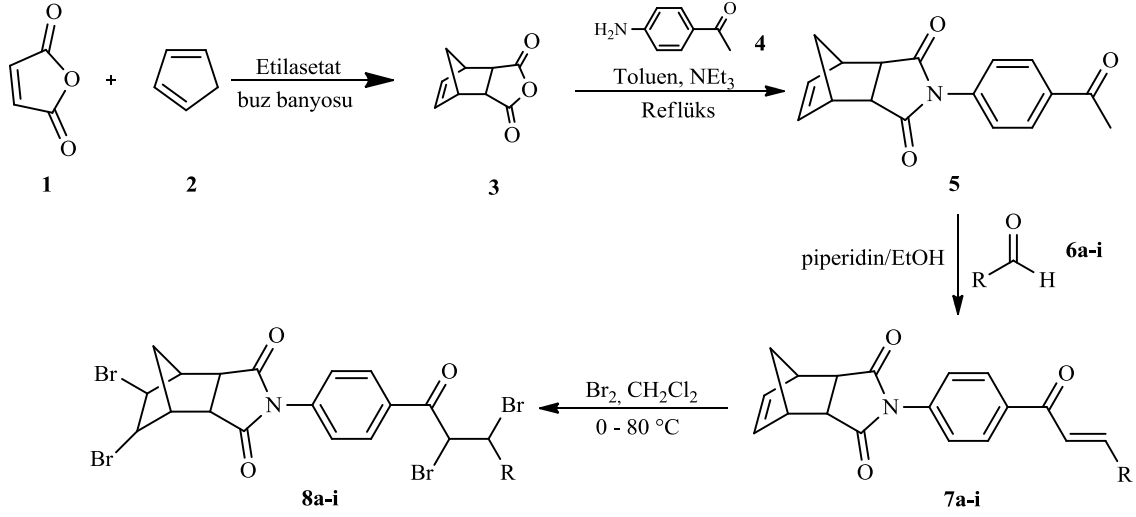
Süksünimit

Bu bilgilerden yola çıkarak yapılacak çalışmada, literatürde biyolojik aktivite gösterdiği bilinen kalkon ve süksünimit birimlerini içeren 2-[4-[(2E)-3-fenilprop-2-enil]fenil]-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoisoindol-1,3-dion türevlerinin sentezi (7) ve bromlama reaksiyonları gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.



7

Hedef moleküle ulaşmak için öncelikle, maleikanhidritin (**1**) ve 1,3-siklopentadien (**2**) Diels-Alder tepkimesi üzerinden 3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metano-2-benzofuran-1,3-dion (**3**) sentezlendi.



R = *m*-OCH₃-Ph, *p*-OCH₃-Ph, *m*-CH₃-Ph, *p*-CH₃-Ph, *m*-Cl-Ph, *p*-Cl-Ph, *p*-Br-Ph, 2-furan, 2-tiyofen

Daha sonra elde edilen ürün 4'-aminoasetofenon (**4**) ile trietilamin varlığında toluen içerisinde reflüks edilerek 2-(4-asetilfenil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1*H*-4,7-metanoisindol-1,3-dion'a (**5**) dönüştürüldü.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, keton yapısı ihtiva eden ürün (**5**) etanol içerisinde piperidin varlığında farklı sübstitüentlere sahip benzaldehit türevleriyle (**6a-i**) muamele edilerek Claisen-Schmidt kondenzasyonu üzerinden kalkon tipi bir bileşik olan 2-[4-[(*2E*)-3-fenilprop-2-enoil]fenil]-3a,4,7,7a-tetrahidro-1*H*-4,7-metanoisindol-1,3-dion (**7a-i**) türevleri sentezlendi. Çalışmanın son aşamasında ise kalkon tipi bileşiklere (**7a-i**) brom katılma reaksiyonları gerçekleştirildi.

Sentezlenen bileşikler kristallendirme ve kromatografik yöntemler ile saflaştırıldı. ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve IR analizleri kullanılarak yapıları belirlendi.

Hedef bileşiklerin sentezi gerçekleştirildikten sonra stok çözeltileri hazırlandı. İnsan kanı eritrositlerinden saflaştırılan Karbonik Anhidraz enzimleri üzerine inhibisyon aktiviteleri incelendi. Çözelti konsantrasyonları ve % aktivite değerleri tespit edilerek grafikleri çizildi.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Kalkonlar

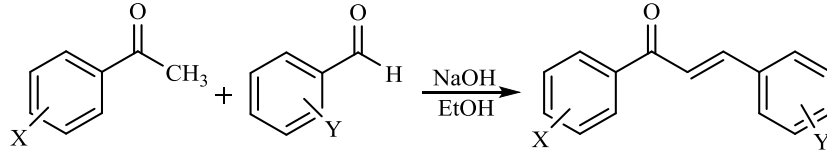
Kalkonlar sentetik olarak elde edilebildiği gibi doğal olarak bulunan flavonoid ailesine üye bileşiklerdir ve geniş bir biyolojik aktiviteye sahiptirler (Lunardi ve ark., 2003).

Literatürlere bakıldığında kalkonların; anti-sıtma (Ram ve ark., 2000), antihelminitik, amoebicidal (amoebik dizanteri), antiülser, antiviral, böcek öldürücü (Rolf ve ark., 1978), antibakteriyel (Ankhiwala, 1990), antiprotozoal, antikanser (Kumar ve ark., 2003), antiinflamatuvar (iltihap önleyici) (Herencia ve ark., 1998) aktivite gösterdikleri ve immunosuppressive (antijen oluşumunu engelleyen) bakımından da geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip oldukları görülmektedir (Lunardi ve ark., 2003). Örnek olarak, antitümör aktivitesi gösterdiği bilinen (E)-1-(4'hidroksifenil)but-1-en-3-on (Duckie ve ark., 1998), MCF-7 insan meme kanseri hücrelerine (Rao ve ark., 2004) ve tüberküloza (Lin ve ark., 2002) karşı inhibe edici etkisi olduğu bilinen 2'-oksijenlenmiş kalkon türevlerini gösterebiliriz. Ayrıca bazı kalkon ve flavonoid türevlerinin anti-HIV aktivitesi gösterdiği de belirtilmiştir (Jiu-Hong Wu ve ark., 2003). Kalkonlar, tıbbi tedavide kullanıldıkları kadar polimerlerde UV-absorbsiyon filtreleri olarak farklı türdeki optik materyallerde, yiyecek endüstrisinde, holografik kayıt teknolojileri gibi birçok uygulama alanında da kullanılırlar (Fayed ve Awad., 2004).

Özellikle hidroksi grubu içeren kalkonlar, gıda endüstrisinde anti-oksidant (Mukherje ve ark., 2001), kozmetikte güneşten koruyucu madde (Suetsugu ve ark., 1987), tatlandırıcı ilaç (Mrisra ve ark., 1973) ve fotografik emülsiyon ajanı (Yasui ve ark., 1992) olarak da kullanılmaktadırlar.

Kalkon türevleri biyoaktif moleküller olmalarının yanı sıra sentetik açıdan da oldukça önemli bileşikler arasında yer alırlar. Aromatik bir aldehit ve ketonun kondenzasyonu ile yüksek verimlerde kolayca sentezlenebilirler.

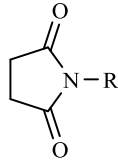
Kalkonların sentezi için literatürde farklı yöntemler rapor edilmesine karşın en sık kullanılan yöntem, temeli bazik ortamda asetofenon ve benzaldehit türevlerinin etkileşmelerine dayanan Claisen-Schmidt kondenzasyonudur.



Kalkonlar içerdikleri α,β -doymamış karbonil grubundan dolayı katılma reaksiyonlarına çok elverişli bileşiklerdir. Hem 1,2- hem de 1,4-katılma reaksiyonlarında kullanılırlar. Kalkonlara 1,4-katılma reaksiyonları (Michael-tipi katılma) ile çok sayıda biyolojik aktif heterohalkalı bileşiklerin sentezi için öncü bileşikler kolayca sentezlenmektedir. Ayrıca kalkon'un propen zincirindeki çift bağ kolayca 1,2-katılma vermektedir.

2.2. Süksünimit Birimi İçeren Bileşikler

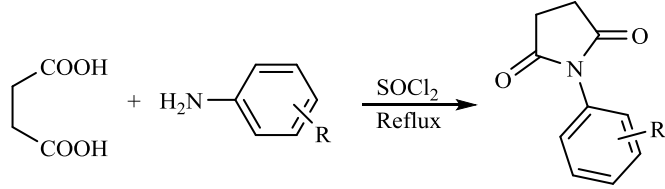
Süksünimit birimi içeren bileşikler gösterdikleri biyolojik aktivitelerden (Lunardi ve ark., 2003) dolayı önemli bileşikler arasında yer alırlar. Süksünimit birimi birçok ilaç ve ilaç adayı bileşiğin yapısında yer almaktadır. Yapılarında iki karbonil ve bir amin biriminin bulunması onların organizmalardaki biyolojik membranlarla etkileşimini sağlamıştır (Hargreaves ve ark., 2014).



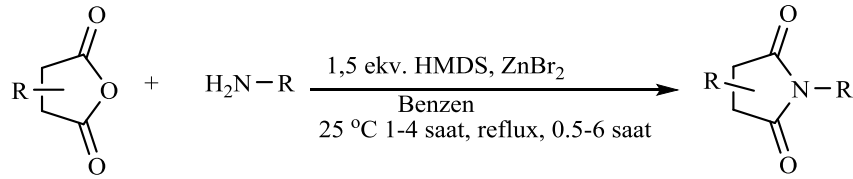
Süksünimit Birimi

Biyolojik aktiviteleri ve farmasotik kullanım çeşitliliği bakımından bu bileşikler ilgi çekmekte ve çok çalışılmaktadırlar. Süksünimit birimi içeren bileşikler geniş bir biyolojik aktivite aralığına sahip olmakla birlikte CNS depresant (Aeberli ve ark., 1976), analjezik (Correa R.ve ark.,1997) antitümör (Duckie ve ark., 1998), sitostatik (Crider AM ve ark., 1980), anorektik (Rich DH ve ark., 1983) sinir iletim engelleme (Kaczorowski GJ ve ark., 2008) antispazmodik (Filho VC ve ark., 1995), bakteriyostatik (Johnston TP ve ark., 1971), kas gevşetici (Musso DL ve ark., 2003), hipotensif (Pennington FC ve ark., 1953), antibakteriyal (Ankhiwala, 1990), antifungal (Hazra BG ve ark., 2004), antikolvünzan (Kornet MJ ve ark., 1977) ve antitüberküler

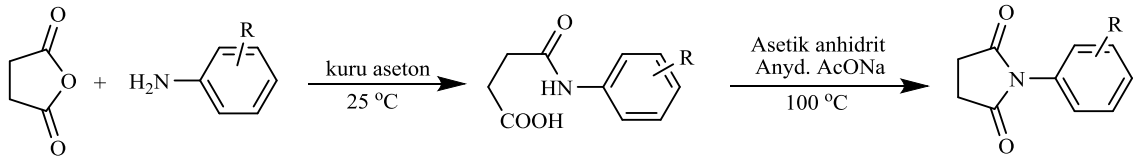
(Lin ve ark., 2002) aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir. (Rajput ve ark., 2007) Süksünimit birimi içeren bileşiklerin sentezine yönelik literatürde farklı metodlar bulunmaktadır. Örneğin, 1-süstitüe fenil piroolidin-2,5-dion bileşiği süksünik asit ve pirimer aromatik bir aminin tiyonüklörür varlığında reflüks edilmesiyle elde edilmiştir (Rajput ve ark., 2007)



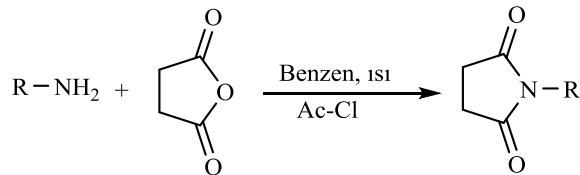
Süksünik anhidrit benzen içerisinde heksametildisilazan varlığında ve Lewis asidi katalizörlüğünde bir aminle reflüks edilirse süstitüe süksünimitler elde edilmiştir (Raddy ve ark., 1997)



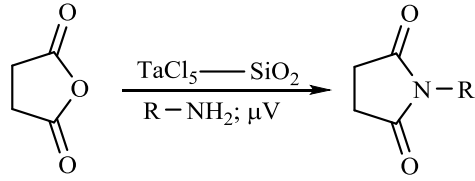
İmik asit ara ürünü üzerinden yürüyen bir başka reaksiyonla da N-fenil süksünimit türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir (Shetgiri ve ark., 1933)



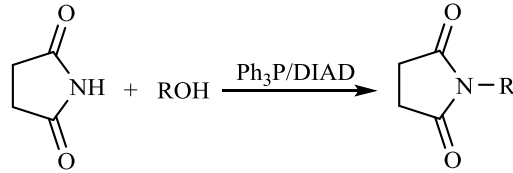
Martin ve arkadaşları tarafından aminlerin süksünik anhidritle asetil klorür varlığında muamele edilmesiyle de süksünimitler elde edilmiştir (Martin ve ark., 1997)



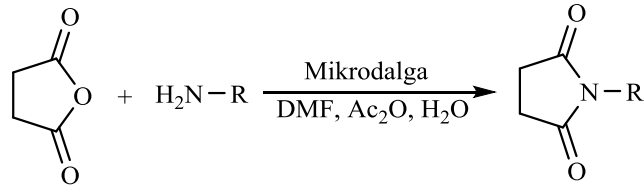
Çözücüsüz ortamda yapılan bir çalışmada ise TaCl₅-SiO₂ kataliziyle süksünik anhidritin aminlerle reaksiyonundan süksünimit türevleri elde edilmiştir (Chandrasekhar ve ark., 1997)



N-sübstitüe süksünimit türevlerinin yüksek verimlerde sentezi Mitsunobu reaksiyonun modifikasyonu ile mümkündür. Süksünimit, trifenil fosfin ve diizopropil azodikarboksilat varlığında bir alkol ile reaksiyona sokulduğunda N-sübstitüe süksünimit türevleri elde edilmiştir (Walker ve ark., 1995)

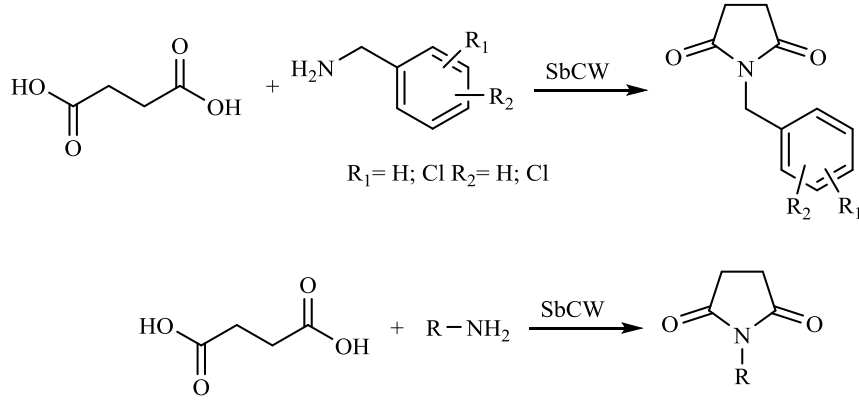


Süksünimit türevlerinin mikrodalga yöntemiyle sentezleri de literatürde rapor edilmiştir (Upadhyay ve ark., 2010).



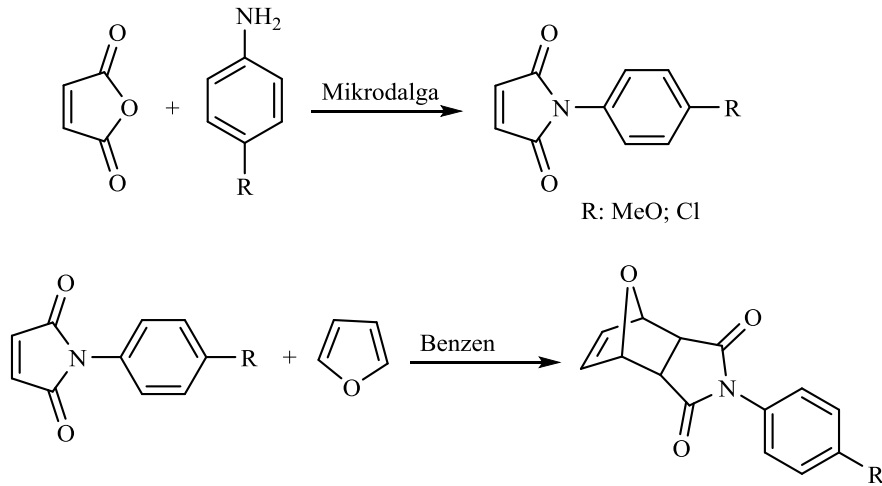
R = benzil; R = (CH₂)₆; R = 4- metil fenil;
R = 4,4 '-metilen di fenil; R = 1- naftil

Hızlı ve temiz bir alternatif yöntem olarak bilinen kritik altı su (subcritical water) yöntemi de süksünimit türevlerinin sentezi için uygulanabilmektedir. Bu yöntemde süksünik asitin, amin ile 280 °C'deki su içerisinde 30 dakika süreyle muamele edilmesinden yüksek verimlerde sübstitüe süksünimit türevleri sentezlenmiştir (Ocal ve ark., 2009).

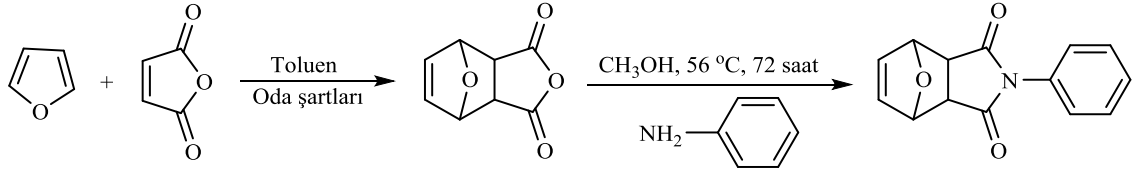


Diels-Alder reaksiyonları yöntemiyle çok halkalı süksünimit birimi içeren bileşiklerin sentezi gerçekleştirilebilir. Bu konuda literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur.

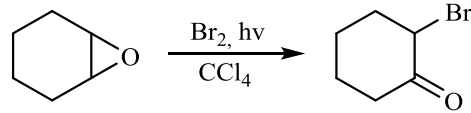
Ocal ve arkadaşları maleik anhidritten yola çıkarak mikrodalga yöntemiyle N-fenil maleimit türevlerini sentezlemiş ve bu bileşiklerin de Diels-Alder reaksiyonu üzerinden furanla reaksiyona sokulmasından süksünimit birimi içeren bisiklik türevleri elde etmişlerdir (Ocal ve ark., 2009).



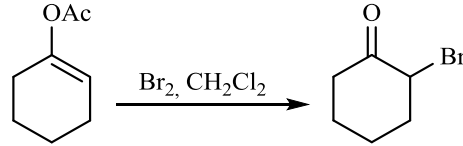
Başka bir çalışmada ise öncelikle furan ve maleik anhidritin Diels-Alder reaksiyonundan cantharidin elde edilmiş ve daha sonra anilin ile muamele edilmesinden de katılmasıyla süksünimit birimi içeren bisiklik türevler sentezlenmiştir (Shunmugam ve ark., 2012).



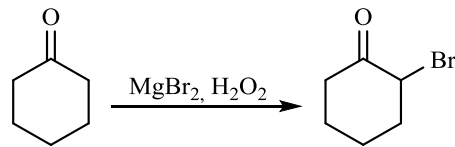
Calo ve grubu ilgili epoksitlere radikalik ortamda brom katarak α -bromu yüksek verimle elde etmişlerdir (Calo ve ark., 1978).



Enolatların halojenlenmesi ile de α -haloketonları elde etmek mümkündür. Stotter ve Hill saf ve yüksek verimle α -haloketon elde etmek için enolatları kullanmışlardır. Enol eter'e $-78\text{ }^\circ\text{C}$ 'de moleküler brom katarak % 92 verimle α -bromketon' u elde etmişlerdir (Stotter ve Hill, 1973).

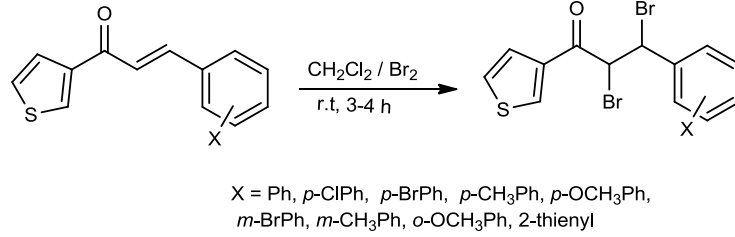


Inukai 1976 yılında yaptığı çalışmada sikloheksanon'u peroksitli ortamda magnezyum bromür ile reaksiyona sokarak α -bromo sikloheksanonu % 30 verimle oluşturmuştur. α -kloro keton eldesi için LiCl, α -iyodo keton eldesi için ise LiI kullanmıştır (Inukai, 1976).



Alkenlere brom katılmasıyla elde edilen 1,2-dibromalkil halojenürler kolayca eliminasyon ve yer değiştirme reaksiyonları verdikleri için yeni bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesi olarak sıkça kullanılırlar. Ayrıca, brom katılma ürünleri düzenlenme

reaksiyonlarında kolayca verirler. Örneğin, Budak kalkonlara CH₂Cl₂ içerisinde Br₂ katarak α,β-dibromo kalkon türevlerini sentezlemeyi başarmıştır (Budak, 2009).



α,β-Doymamış ketonlara brom katılma reaksiyonu

Alkenlerde olduğu gibi kalkonlara da brom katılmasıyla elde edilen 1,2-dirom katılma ürünleri özellikle azot ve kükürtlü nükleofiller ile kolayca yer değiştirme ve halkalaşma reaksiyonlarını verdiği için heterohalkalı bileşiklerin sentezinde sıkça kullanılmaktadırlar (Pitchumani ve ark., 1994; March ve ark., 1987).

2.3. CA (Karbonik Anhidraz) Enzimi

CA enzimi 1933'te Stadie ve O'Brien ile Meldrum ve Roughton tarafından keşfedilmiştir. (Meldrum ve Roughton 1933). İlk yıllarda insan eritrositlerinden yüksek oranda CA enzimi saflaştırılmasına rağmen 1930'lu yılların sonlarında ancak sığır eritrositlerinden saflaştırılabildiği görülmüştür. Çinko içeriği ile orantılı olarak CA aktivitesinin değiştiği ve katalizlemede çinkonun spesifik bir rolü olduğu belirlenmiştir (Keilin ve Martin 1944). Bu çalışmalar sayesinde bilinen ilk metaloenzim olarak CA enzimi tarihe geçmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda suda yaşayan canlılarda olmak üzere pek çok mantar, bitki, böcek ve memeli dokuları gibi geniş bir canlı spektrumunda CA enzimi bulunmuştur. (Burt ve ark.,1992; Bottcher ve ark.,1994; Krungkrai ve ark., 2001; Beydemir ve ark.,2005; Yu ve ark.,2006). Fare ve insan eritrositleri, sığır lökositleri ve kemikleri, fare salyası gibi pek çok materyalden saflaştırılmış ve kinetik özellikleri çalışılmıştır. Enzim Merkezi sinir sistemi, göz gibi çoğu dokuda dağılmış halde enzimler bulunmaktadır. (Beydemir ve Gülçin 2004).

Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar için CA enzimleri vazgeçilmez enzimlerdir. Sülfonamid türevleri olan brinzolamid, asetazolamid, dorzolamid gibi

maddeleri içeren ilaçlar CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül ve ark., 2003). Memeli dokularında şimdiye kadar tesbit edilen 16 adet CA izoenzimi vardır. CA izoenzimlerinin ne tür canlıların hangi dokularında eksprese oldukları hala araştırılan konulardandır (Lonnerholm ve ark. 1985; Okuyama ve ark. 1995; Parkkila ve Parkkila 1996; Christie ve ark.,1997; Raisanen ve ark.,1999, Scozzafava ve ark.,2006). Hall ve Schraer gökkuşuğu alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Bio-jel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. (Hall ve Schraer 1983).

CA enzimleri, hastalıkların pek çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için önemli bir enzimdir. Asetazolamit, dorzolamit ve brinzolamit gibi sülfonamit türevleri olan ilaçlar hCA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülbül ve ark., 2003). Bununla birlikte birçok kimyasal madde ve atıklar da bu enzimin aktivitesini önemli ölçüde azaltmakta ve hatta tamamen durdurabilmektedir. Lionetto ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, kemikli balıklardan olan yılan balığında (*Anguilla anguilla*) kadmiyumun in vitro şartlarda, hem solungaç hem de barsak CA enziminin aktivitesi üzerine etkisi araştırılmış, solungaç ve barsak homojenatlarında CA aktivitelerinin önemli oranda inhibe olduğunu belirlenmiştir (Lionetto ve ark., 2000).

Memeli dokularında şimdiye kadar 16 adet hCA izoenzimi belirlenmiş ve bu hCA izoenzimlerin farklı canlıların hangi dokularında eksprese oldukları araştırılmıştır. Bu konudaki çalışmalar halen devam etmektedir (Lonnerholm ve ark., 1985; Okuyama ve ark., 1995; Parkkila ve Parkkila 1996; Christie ve ark., 1997; Raisanen ve ark., 1999, Scozzafava ve ark., 2006). Hall ve Schraer gökkuşuğu alabalık (*Salmo gairdneri*) eritrositlerinden CA enzimini kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE Bio-jel iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır (Hall ve Schraer 1983).

Çalışmamızın temelini teşkil eden Karbonik anhidraz enzimi (CA), ilk olarak 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden habersiz olarak keşfedilmiştir. 1933 yılında Meldrum ve Roughton, insan eritrositlerden karbonik anhidraz enzimini yüksek oranda saflaştırmalarına rağmen sığır eritrositlerinden saflaştırmayı ancak 1930'lu yılların sonlarında gerçekleştirebilmiştir. 1944 yılında ise Keilin ve Martin, CA aktivitesinin çinko içeriği ile orantılı olduğunu

bularak çinkonun katalizlemede spesifik rolü olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sonucunda CA enzimi tanımlanan ilk metalloenzim olarak tarihe geçmiştir (Söyüt 2006).

İlk olarak memeli eritrositlerinden saflaştırılan Karbonik anhidraz enzimi daha sonraki yıllarda, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein ve Silverman 1984., Krungkrai ve ark.,2001., Demir ve ark.,2001., Beydemir ve ark.,2002., Beydemir ve Gülçin 2004., Söyüt 2006).

Günümüze kadar üzerinde en çok çalışılan ve hemen hemen bütün hayvan dokularında, bakterilerde ve fotosentetik hücrelerde fonksiyon gören önemli bir enzim olan Karbonik anhidraz (CA, karbonat hidrolizaz, E.C.4.2.1.1) canlı organizmalarda pH düzenleyici, iyon transportu, su ve elektrolit dengesi gibi önemli fonksiyonları olan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran yaygın bir metalloenzim ailesidir. Bu enzim fizyolojik şartlarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemektedir (Maren 1967., Tashian 1992., Sly ve Hu 1995., Demir ve ark.,1999., Smith ve Ferry 2000., Krungkrai 2001., Beydemir ve ark.,2004., Topal ve Gülçin, 2014).

Bunlardan başka önemli miktarda tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, uterus ve endometrium dokularında da belirli miktarlarda bulunmaktadır (Supuran ve ark.1998., Gülçin ve ark.,2004., Söyüt 2006).

Karbonik anhidraz enzimi bunlara ilave olarak balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve karasal bitki kloroplastlarında önemli fonksiyonları olduğu bulunmuştur (Graham ve ark.1984.,Tsuzuki ve Miyachi 1989., Badger ve Price 1994., Söyüt 2006).

CA, pekçok canlı organizmada altı farklı gen ailesi olan α -, β -, γ -, δ -, ζ - ve η -CA tarafından kodlanan bir metalloenzim ailesidir. α -, β - ve δ -CA'ları aktif bölgesinde Zn (II) iyonu içerirken γ -CA'lar ise Fe (II) içerir (ancak bu enzimler aktif bölgesinde Zn (II) veya Co (II) iyonları da içerebilirler). ζ -CA'ların aktif bölgesindeki Fe (II) iyonu

kadminyumla genellikle yer değiştirir. Bütün insan CA'ları α -sınıfıdır (Alterio ve ark.,2012). Memelilerde günümüze kadar α -CA enziminin 16 tane izoenziminin var olduğu tespit edilmiştir. Bu izoenzimlerden hCA I, II, III, VII ve XIII sitozolik, hCA IV, IX, XII ve XIV membrana bağlı, CA VA ve VB mitokondriyaldır ve CA VI tükürükte salgılanır. CA XV ise insanlarda ve diğer primatlarda eksprese olmaz rodent ve yüksek omurgalılarda olur (Nar ve ark.,2012; Aksu ve ark.,2013).

CA enziminin fotosentez olayının Calvin siklüsünde önemli bir görevi olduğu, kloroplast hücrenin tilakoid membrana bağlı CA enziminin Calvin siklüsündeki diğer enzimler ile birlikte bir multienzim sistemi içerisinde çalıştığı belirlenmiştir (Jebanathirajah ve Coleman 1998). Karbonik anhidraz'ın bikarbonatın CO₂ dehidratasyonunu aktivite ederek CO₂ üretiminde artışa ve böylece hücreye CO₂ desteğinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir (Tsuzuki ve Miyachi 1989).

Enzimler içererisinden karbonik anhidraz enzimi canlı dokularındaki fonksiyonları açısından çok büyük öneme sahip olduğu görülmektedir. Dahası her canlıda farklı kısımlarda aktivite gösteren bu karbonik anhidraz sadece o canlının metabolizmasına spesifiktir. Yani CA farklı canlı metabolizmalarında farklı yapılarda ve moleköl kütlelerinde fonksiyon gösteren ve canlılarda hayati önemi bulunan bir enzimdir. Bu doğrultuda bu enzimin canlı metabolizmasında nerelerde ve hangi şekilde lokalize olduğu ve nasıl bir fonksiyon gösterdiğini belirleyebilmek için yukarıda da anlatıldığı şekilde birçok çalışmalar gerçekleştirilmiş ve enzim birçok canlıdan karakterize edilerek kinetik özellikleri incelenmiştir (Söyüt 2006).

Bu çalışmada ilk olarak insan hayatında önemli bir sağlık problemleri olan kanser, sıtma gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan kalkon türev gruplarına yeni farklı fonsiyonel gruplar bağlanarak daha önce sentezlenmemiş kalkon türevlerinin eldesi amaçlanmış olup daha sonra sentezlenen bu bileşiklerin canlı metabolizmasında çok çeşitli fonksiyonları bulunan ve önemli bir enzim olan karbonik anhidraz enzimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bunun için insan kanı eritrosit hücrelerinden Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi işlemi ile karbonikanhidraz I-II izoenzimleri saflaştırıldı. Daha sonra yeni sentezlenen kalkon türevlerinin bu izoenzimler üzerine inhibisyon etkileri incelenerek IC₅₀ ve K_i hesaplanmıştır.

Yapılan literatür araştımlarında karbonik anhidraz saflaştırılması işlemlerinde eskiden kloroform-etanol ekstraksiyonu, Sephadex G-75 jel filtrasyon kromatografisi

kullanıldığı tespit edilmiştir (Hall ve Schaer 1983). İlerleyen zamanlarda afinite kromatografisi yöntemi için ligandların geliştirilmesiyle birlikte CA enzimi zaman almadan ve daha iyi bir yüzde verimle saflaştırılabilmektedir. Afinite kromatografisi ile bu enzimin saflaştırılmasında kolon materyali olarak Sepharose-4B kullanılmıştır. Afinite kromatografisi çok basamaklı saflaştırma işlemleri esnasında enzim aktivitesinde meydana gelen önemli kayıpları elimine etmek ve enzimi yüksek bir verimle elde etmek için kullanılan önemli saflaştırma metodudur (Arslan ve ark.,1996.,Ninfali ve ark.,1990., Söyüt 2006).

İnsan kanı eritrosit hücreleri karbonik anhidraz enzimi saflaştırma sürecini kısaltmak amacıyla, enziminin saflaştırıldığı afinite kromatografisi kolonunda kolon materyali olarak kullanılan Sepharose 4B'ye L-tirozin uzantı kolu olarak takılmıştır ve buna da CA'nın kuvvetli bir inhibitörü olan sülfanilamid ligand olarak bağlanmış ve böylece süreç bir günlük bir sürede sonuçlandırılabilmiştir (Söyüt 2006).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Proje kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar Gaziosmanpaşa Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma ve Öğrenci Laboratuvarlarında ve Atatürk Üniversitesi Biyokimya Bölümü Araştırma ve Öğrenci Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Araç ve Malzemeler

Manyetik karıştırıcı, döner buharlaştırıcı, cam malzemeler.

3.1.2. Kimyasallar

3.1.2.1. Reaktifler

Benzaldehit türevleri ve siklopentadien, maleikanhidrit NaOH, KOt-Bu. Bu reaktifler ticari olarak (Merck, Aldrich ve Fluka) temin edildi.

3.1.2.2. Çözücü ve Kurutucular

Etanol, kloroform, metilen klorür, hekzan, karbontetraklorür. Etanol, kloroform, metilen klorür ve hekzan literatürde belirtilen yöntemlere göre saflaştırılarak kullanıldı. Diğer çözücüler ise saf olarak temin edildiklerinden (Merck) saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.

3.1.2.3. Kolon Dolgu Maddeleri

Silika Jel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck).

3.1.3. Saflaştırma

Deneylerde kullanılan tüm çözücü ve kimyasal maddelerin saflaştırma işlemleri literatürde belirtildiği şekilde modern yöntemlerle yapıldı (Furniss, 1994; Armarego ve Perrin, 1997).

3.1.3.1. Karbon tetraklorür

Derişik H₂SO₄ ile çalkalandıktan sonra, organik faz CaCl₂ ve MgSO₄ üzerinden kurutulur. Son olarak P₂O₅ üzerinden destile edilir.

3.1.3.2. Metilen klorür

Su ile iyice yıkandıktan sonra, K_2CO_3 veya $CaCl_2$ ile kurutulur. P_2O_5 , $CaSO_4$ veya Na_2SO_4 ile reflüks edilir ve son olarak destillenir.

3.1.3.3. Hekzan–Petrol Eteri

Derişik H_2SO_4 ile birkaç kez yıkandıktan sonra, $KMnO_4$ ‘ün rengi kaybolana kadar %10’ luk H_2SO_4 ile tekrar yıkanır. Sulu Na_2CO_3 ile çalkalanır ve $CaCl_2$ veya Na_2SO_4 ile kurutulur, destile edildikten sonra kullanılır.

Sodyum sülfat (Na_2SO_4), kalsiyum klorür ($CaCl_2$).

3.1.4. Cihazlar

1H -NMR	Varian 400 MHz Spektrometre Bruker 400 MHz “ Bruker 300 MHz “
^{13}C -NMR	Varian 100 MHz Spektrometre Bruker 100 MHz “ Bruker 75 MHz “
IR	Jasco 430 FT/IR Spektrometre
Erime Noktası Cihazı	Elektrotermal 1A- 9100
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	Sanyo, Japan
pH metre	Hanna Instrument
Hassas terazi	Denver Instrument
İnkübatör	Wiseven
Otomatik pipetler	Eppendorf ve Socorex Pipettors
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Vorteks	Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	IKA Topolino
UV-Spektrofotometre küveti	1 cm ³ ’lük Kuartz küvet

3.1.5. Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler

- 0.2 M NaHCO₃, Ph = 8.8 (Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16.8 g NaHCO₃, 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH = 8.8'e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 0.15 M Na₂CO₃/0.1 M NaHCO₃ pH=10 (CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 15.9 g (0.15 mol) Na₂CO₃ ve 8.4 g (0.1 mol) NaHCO₃'ün 1 L saf suda çözülmesiyle hazırlandı.
- 25 mM Tris-HCl/0.1 M Na₂SO₄, pH= 8.7 (Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon çözelti): 3.028 g Tris ve 14.2 g Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülerek 1 N HCl ile pH= 8.7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.
- 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ pH = 8.7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon çözelti): 3.026 g (25 mmol) Tris ve 3.124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. Daha sonra 1 N HCl ile pH= 8.7'ye getirildikten sonra hacim 1 L'ye tamamlandı.
- 25 mM Na₂HPO₄/1 M NaCl, pH= 6.3 (kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2.2 g Na₂HPO₄ ve 14.63 g NaCl alınıp, pH= 6.3'e titre edildikten sonra toplam hacim 250 mL'ye destile su ile tamamlandı.
- 0.05 M Tris-SO₄, pH= 7.4 (Esteraz aktivitesinde kullanılan tampon çözelti): 6.055 g Tris 950 mL destile su içerisinde çözülerek, 1 N H₂SO₄ ile pH'sı 7.4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.
- 0.1 M CH₃COONa/0.5 M NaClO₄, pH= 5.6 (kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9.187 g NaClO₄ tutunmuş ve 2.04 g 0.015 mol CH₃COONa.3H₂O, 120 mL destile su içerisinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5.6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.
- Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiliye %95'lik fosforik asit ilave edilerek çözeltinin hacmi, saf su ile 1 L'ye tamamlandı.
- Veronal tamponu (0.025 M); 0.025 mol sodyum barbitalin 950 mL suda çözülüp pH= 8.2'ye kadar 0.1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

- CO₂ çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0°C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.
- İndikatör çözeltisi (CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0.013 g fenol kırmızısı ve 0.22 g NaHCO₃ ün 1 L saf suda çözünmesiyle hazırlandı.
- Brom Timol Mavisi Çözeltisi (%0.04): 0,1 g indikatörün 16 mL 0.01 N NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.
- Stok kalkon türevlerinin çözeltilerinin hazırlanması: Her bir kalkon türevi bileşikten 3 mg alınarak 3 mL etanolde içerisinde çözüldü. 10000 kat seyreltildi.

3.1.6. SDS-Poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) için kullanılan çözeltiler

- SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0.65 mL 1M Tris-HCl (pH= 6.8) 1 mL %10'luk SDS ve 1 mL %100'lük gliserin, 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak, son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı ve bu tamponu kullanmadan hemen önce, 950 µl numune tamponundan 50 µl olacak şekilde β merkaptotanol ilave edildi.
- SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1.5 g Tris ve 7.2 g glisin 50 mL suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.
- Boyama çözeltisi (elektroforez jelinin boyanması için kullanılan çözelti): 0.1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- Akrlamit-Bisakrlamit çözeltisinin hazırlanması: 30 g akrilamit ve 0.8 g bisakrlamit karışımı 100 mL suda çözüldü.
- SDS çözeltisinin hazırlanması (%10): 10 g SDS 90 g saf suda çözüldü.
- Tris-HCl çözeltisinin hazırlanması (3 M, pH= 8.8): 36.3 g Tris alındı ve 48 mL ve 1 M'lık HCl ile karıştırıldı ve hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
- Jel fiksasyon çözeltisinin hazırlanması: %50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren karışım hazırlandı.
- Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 sudan oluşan karışım hazırlandı.

3.2. Saflaştırma Yöntemleri

Elde edilen ham ürünlerin ve çözücülerin ayırma ve saflaştırma işlemlerinde, destilasyon, kristallendirme ve kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanıldı.

3.2.1. Kolon kromatografisi

Silika Jel 60(0.063-0.200 mm), (Merck)

3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi

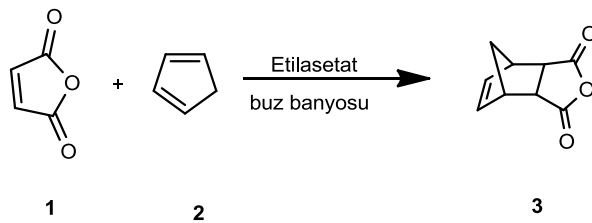
Silika Jel 60 HF 254+366 (Preparatif) (Merck)

3.2.3. Kristallendirme

Reaksiyon sonunda oluşan ürünler etanol, kloroform/hekzan ve karbontetraklorür/hekzan karışımı çözücü sistemlerinde buzdolabında kristallendirildi.

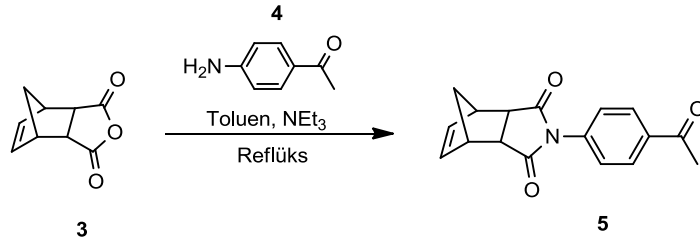
3.3.1. (3aR,4S,7R,7aS)-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoizobenzofuran-1,3-dion (3) Sentezi İçin Genel Yöntem:

Disiklopentadien 120 °C destillenecek şekilde siklopentadien (2) haline getirildi. Maleik anhidrit (1) (1mmol) etil asetat ile çözüldü ve siklopentadien (2) (1mmol) üzerine damla damla ilave edildi. Reaksiyon buz banyosunda manyetik olarak 3 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı üzerine hekzan ilave edilerek ürün kristallendirildi (Ertürk, 2014).



3.3.2. (3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-asetilfenil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion (5) Sentezi İçin Genel Yöntem:

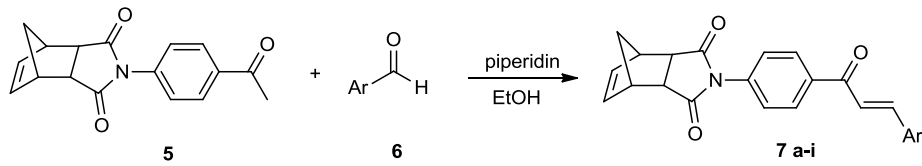
Saf olarak elde edilen bileşik (3) ile 4'-aminoasetofenon'un (4) katılma reaksiyonu gerçekleştirildi. Bileşik (3) (1mmol) toluende çözülerek üzerine 4-aminoasetofenon (4) (1 mmol) ve trietilamin eklendi. Karışım 24 saat reflüks işlemine tabi tutuldu. Tepkime sonunda toluen uzaklaştırıldı ve CH₂Cl₂ ile ekstrakte edildi ve ham ürün etilasetat-hekzan ile kristallendirildi (Ertürk, 2014).



3.3.3. (3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-((E)-3-(p-tolil)akriloil)fenil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoizindol-1,3(2H)-dion (7) Sentezi İçin Genel Yöntem:

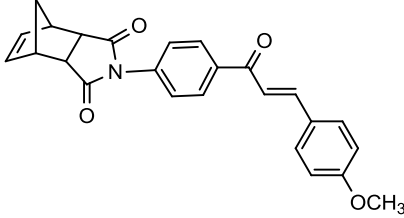
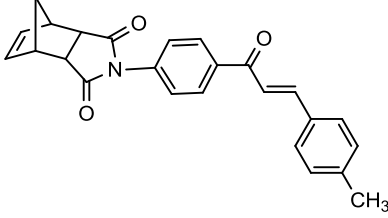
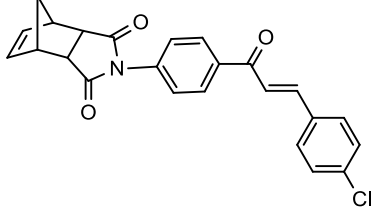
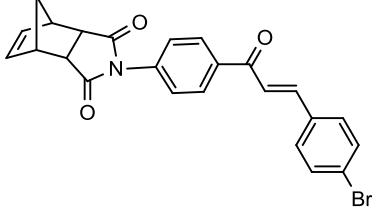
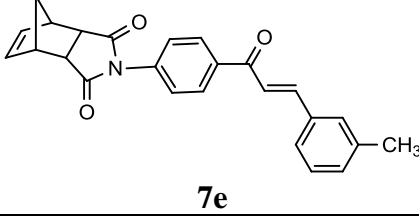
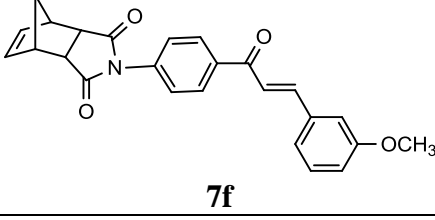
Saf olarak elde edilen 4,7-metano isoindol-1,3(2H)-dion (5) bileşiği (1 mmol) etanolde çözülerek üzerine piperidin (5 mmol) ilave edildi. Reaksiyon 1 saat reflüks olduktan sonra üzerine etanolde çözülmüş *p*-metilbenzaldehit (6) (1mmol) damla damla ilave edilerek 24 saat reflüks yapıldı. Ekstraksiyon işlemi yapıldı. Organik faz Na₂SO₄ ile kurutuldu, çözücü uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen ham ürün metilenklorür-hekzan ile kristallendirildi (Ertürk, 2014).

Elde edilen çıkış bileşiklerinin spektral dataları ve erime noktaları literatür verisi (Ertürk, 2014) ile karşılaştırılarak doğrulandı.

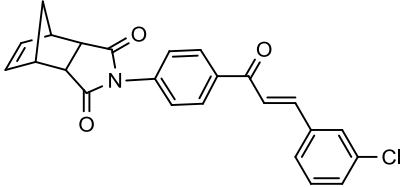
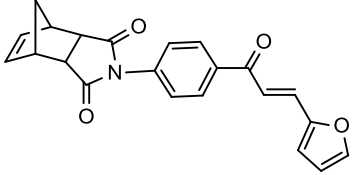
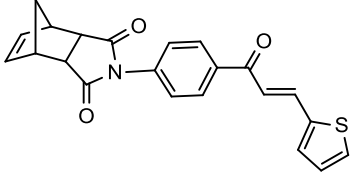


Ar = *p*-OCH₃Ph, *p*-CH₃Ph, *p*-ClPh, *p*-BrPh, *m*-CH₃Ph, *m*-OCH₃Ph, *m*-ClPh, 2-furan, 2-tiyofen

Çizelge 3.1. Sentezlenen çıkış bileşikleri

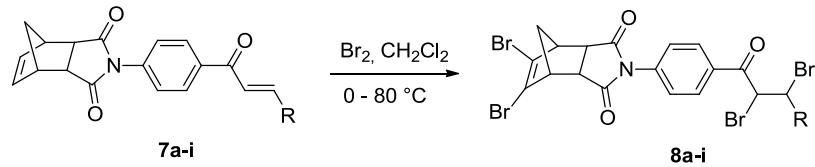
Çıkış Bileşikleri	Verim (%)	Erime Noktası (°C)
 <p>7a</p>	80	174-176
 <p>7b</p>	80	193-195
 <p>7c</p>	73	230-232
 <p>7d</p>	55	239-241
 <p>7e</p>	45	172-174
 <p>7f</p>	55	176-178

Çizelge 3.1.(Devamı) Sentezlenen çıkış bileşikleri

 <p style="text-align: center;">7g</p>	70	147-149
 <p style="text-align: center;">7h</p>	77	202-204
 <p style="text-align: center;">7i</p>	70	212-214

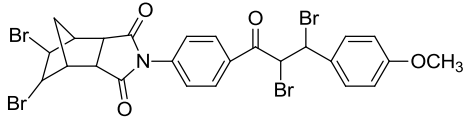
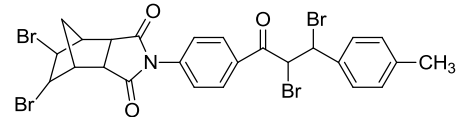
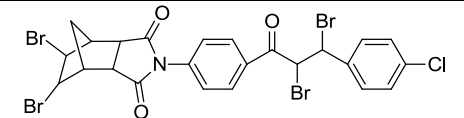
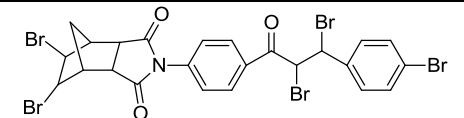
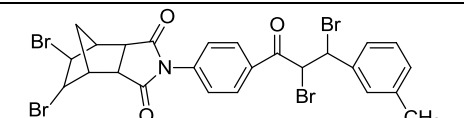
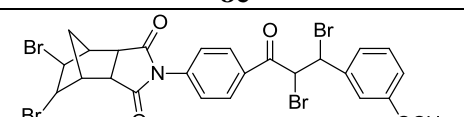
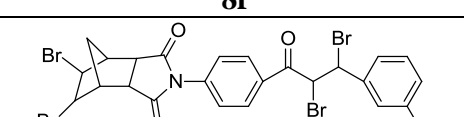
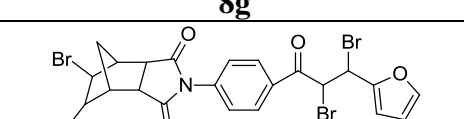
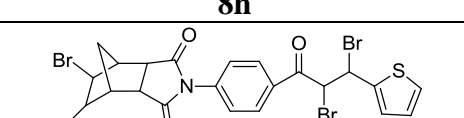
3.3.4. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibrom-2-(4-(2,3-dibrom-3-(4-metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanizoindol-1,3(2H)-dion (8) sentezi

Çalışmanın bu aşamasında; saf olarak elde edilen (**7a-i**) türevlerine brom katılma reaksiyonları gerçekleştirildi. Bileşik (**7a-i**) (1 mmol) metilenklorürde çözüldü. Metilenklorür üzerine alınan Br₂ (1 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon oda koşullarında 24 saat manyetik olarak karıştırıldı. 24 saat sonrasında ekstraksiyon yapıldı. Kristallendirme işlemi sonucu madde saf olarak elde edildi (Budak, 2009).



R = *p*-OCH₃Ph, *p*-CH₃Ph, *p*-ClPh, *p*-BrPh, *m*-CH₃Ph, *m*-OCH₃Ph, *m*-ClPh, 2-furan, 2-tiyofen

Çizelge 3.2. Sentezlenen Bromlu türevler

Bromlu Türevler	Verim (%)	Erime Noktası (°C)
 <p>8a</p>	75	162-164
 <p>8b</p>	70	203-205
 <p>8c</p>	65	218-220
 <p>8d</p>	60	250-252
 <p>8e</p>	62	182-184
 <p>8f</p>	58	190-192
 <p>8g</p>	72	168-170
 <p>8h</p>	70	196-198
 <p>8i</p>	65	228-230

3.3.5. Enzim saflaştırma çalışmaları

3.3.5.1. hCA izoenzimlerinin hemolizatının hazırlanması

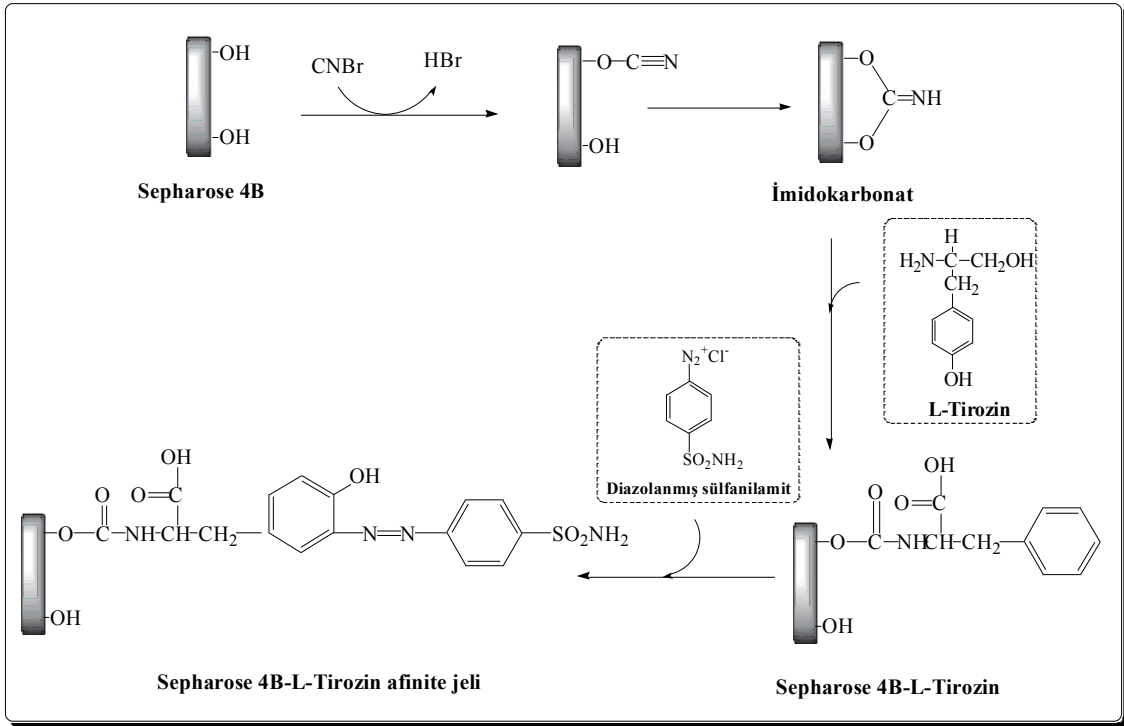
Alınan taze kan santrifüj tüplerine doldurularak, 15 dakika boyunca 2500xg'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkarılan tüplerin üst kısmında kalan plazma ve lökosit tabakası damlalıklarla dikkatli bir şekilde alınarak, tüplerin altında kalan eritrosit peleti 0.154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Her defasında 2500xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizat içerisinde bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için 4°C'de 20.000xg'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst kısımdaki hemolizat damlalıklarla dikkatlice alındıktan sonra sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edildi (Hunaiti ve Soud 2000; Çoban ve ark., 2008).

3.3.5.2. hCA izoenzimlerinin saflaştırılmasıyla ilgili çalışmalar

Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit afinite jelinin hazırlanması

Afinite jeli CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Bu kolon materyaline L-Tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamit diazollanarak tirozine kenetlendi. Burada tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamit, karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Söyüt 2006). Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı.

CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin takılması: CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B, 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tamponu (pH= 10.0) ile yıkanarak bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 80 mg tirozin çözünmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek karıştırıldı. Yıkama, tirozin çözeltisi ilavesi ve bagetle karıştırmanın, 90 saniyeden az bir sürede tamamlandığı gözlemlendi ve bundan sonra süspansiyon, 4°C'de 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve 16 saat boyunca 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkanarak böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama 100 mL'lik 0.2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH= 8.8) tekrarlanarak tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.



Şekil 3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanmasındaki reaksiyonların basamakları (Atasever ve ark., 2013)

Sülfanilamit kenetlendirilmesi: 25 mg sülfanilamit, 0°C civarında 10 mL, 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 75 mg NaNO₂ bulunan 0°C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamit 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin sülfanilamit süspansiyonuna ilave edildi. 1 M'lık NaOH ile pH = 9.5'a çıkarılarak sabit tutularak 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve 200 mL 0.05 M Tris-SO₄ (pH = 7.4) tamponuyla yıkandı. Sonra da üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı (Söyüt 2006). Tüm basamaktaki reaksiyonların açık formülleri Şekil 3.1'de gösterildi.

3.3.5.3. Afinite kolonunun paketlenmesi

Hazırlanan jel dengeleme tamponu (Tris-HCl, pH= 7.8) içine alınarak jel süspansiyonu edilerek ve su trombu kullanılarak vakum ile havası alındı. Süspansiyon edilmiş jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenildi. Jel çöktükten sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponu ile yıkandı. Kolonun

dengelenmiş olduğu eluat ile tamponun 280 nm’de absorbanlarının ve pH’larının eşitlenmesinden anlaşıldı.

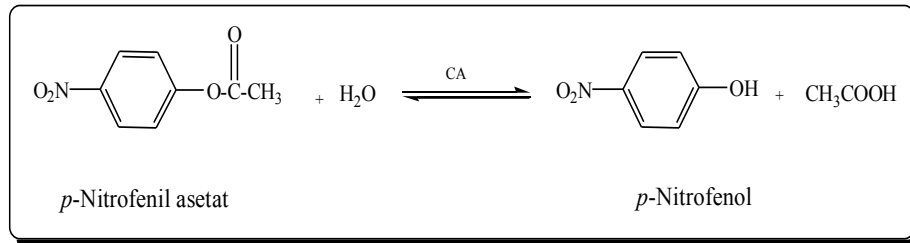
3.3.5.4. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu

Katı Tris ile pH’sı 8.7’ye ayarlanmış olan hemolizat kolona tatbik edildi ve kolon 400 mL 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH= 8.7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece hCA izoenzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH= 6.3) tamponu tatbik edilerek hCA I enzimi daha sonra 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH= 5.6) çözeltisi kolona tatbik edilip hCA II izoenzimi elüe edildi. Fraksiyon toplayıcı yardımıyla elüatlar 5’er mL halinde tüplere alındı ve 280 nm’deki absorbanlarına bakıldı. Peristaltik pompa vasıtasıyla kolonun akış hızı 20 mL/saat’e ayarlandı.

3.4. hCA izoenzimleri Aktivitesi Tayini

3.4.1. Esteraz aktivitesi

Kinetik ve inhibisyon çalışmaları için esteraz aktivite yöntemi uygulandı. Bu yöntem, CA’nın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Metodun prensibi kısaca şöyledir; karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidroliz etmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda verildiği gibidir.



Şekil 3.2. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

348 nm’de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat’ın her ikisi aynı absorbanı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir

(Armstrong ve ark., 1966; Verpoorte ve Mehta 1967). Bu dalga boyunda *p*-nitrofenilasetatin çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır.

3 mL'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.3. Esteraz aktivitesi için 3 mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (0.05 M, pH= 7.4)	1400	1400
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim çözeltisi	-	100
Toplam hacim	3000	300

1 mL'lik kuvarz küvetler kullanılarak ölçülen aktivite tayini işlemleri için reaksiyon karışımını oluşturan maddelerin ortama katılım sırasına göre ise aşağıdaki prosedür uygulandı.

Çizelge 3.4. Esteraz aktivitesi için 1 mL'lik kuvarz küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (µl)	Numune Tüpü
Tris-SO ₄ (0.05 M; pH= 7.4)	467	467
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

Çizelge 3.4'deki reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir absorbans miktarı okundu ve 3 dakika sonundaki 25°C'de 348 nm'de absorbansı okunarak absorbans farkı alındı. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine saf su konularak elde edilen karışımın 3 dakika sonundaki absorbansı ile sifira ayarlandı.

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük olarak hazırlandı: 27.2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözülerek hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş ilave edildi. Bu çözelti 3 mM'lık olup, daha derişğini

hazırlamak, esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülere nispeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Verpoorte ve ark., 1967). İnhibisyon çalışmaları esnasındaki aktivite ölçümleri enzimin esteraz aktivitesi ile gerçekleştirildi.

3.5. Protein Tayini

3.5.1. Kalitatif protein tayini

Kalitatif protein tayini, 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, triptofan ve tirozin aminoasitlerinin maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metot yardımıyla kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.5.2. Kantitatif protein tayini

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltilisindeki ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250'nin bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford 1976).

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltilisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0.1 mL'ye tamamlanarak 5 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu.

Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Protein tayini yapılacak numuneler için aynı yöntem uygulandı ve standart grafikten miktar tayini yapıldı.

3.6. SDS-Poliakrilamit Jel Elektrofrezini ile Enzim Saflığının Kontrolü

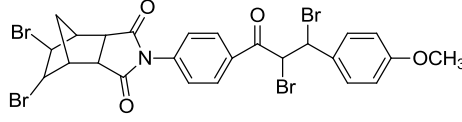
Enzimin saflaştırılmasından sonra Laemmli tarafından anlatıldığı gibi SDS-PAGE tekniği ile enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970). Örnekler jelle yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptolanol ile muamele edilerek daha sonra 5 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numunenin %20 ayırma jelinde elektrofrezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban ve ark., 2007).

3.7. hCA I ve hCA II İzoenzimleri Aktiviteleri Üzerine Kalkon Türevlerinin Etkisinin Belirlenmesi

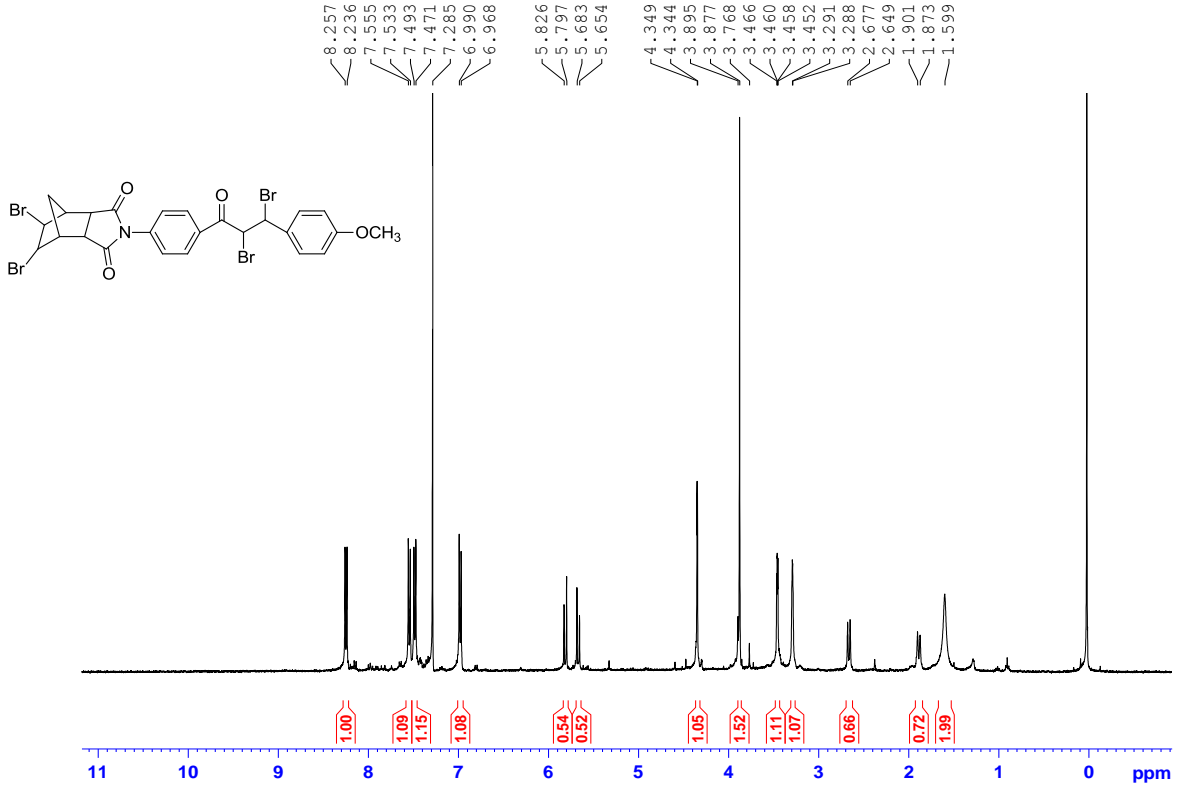
Kalkon türevlerinin, saflaştırılacak olan hCA izoenzimleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Ölçümler esteraz aktivite tayin yöntemiyle yapıldı. Daha sonra IC₅₀ ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizindol-1,3(2H)-dion



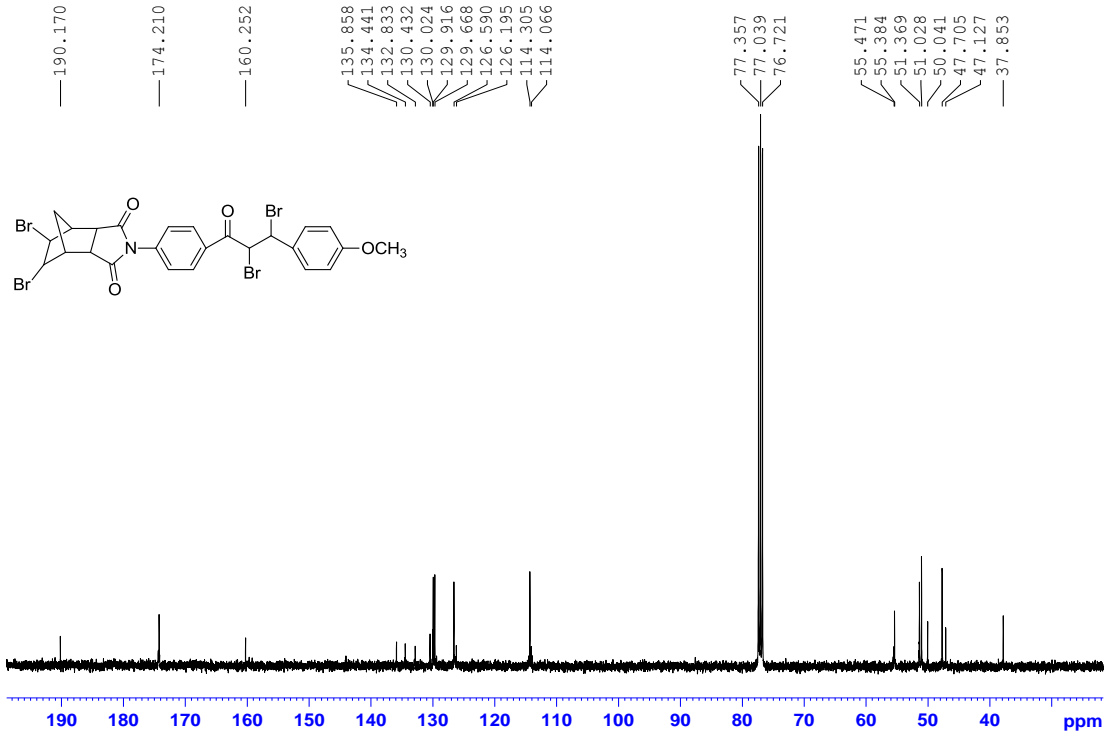
8a



Şekil 4.1. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizindol-1,3(2H)-dion 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) (**8a**)

Şekil.4.1.'da görülen (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-metoksifenil) propanoil) fenil) heksahidro-1H-4,7-methanoizindol-1,3(2H)-dion bileşiğine ait ¹H-NMR spektrumunda en aşağı alanda 8.24 ppm'de görülen dublet ($J = 8.6$ Hz) izoindol halkasının bağlı olduğu aromatik halkadaki protonlara ait olup AA'BB' sisteminin AA' kısmını oluşturmaktadır. Sistemin BB' kısmı ise 7.54 ppm'de dublet ($J = 8.6$ Hz) vererek rezonans olmaktadır. Metoksi grubunun bağlı olduğu

aromatik halka da beklendiği gibi AA'BB' sistemi oluşturmakta ve sistemin AA' kısmı 7.48 ppm'de BB' kısmı ise 6.98 ppm'de dublet ($J = 8.8$ Hz) vermektedir. Propanon zinciri üzerindeki protonlar bromların etkisi ile aşağı alana kayarak 5.81 ve 5.67 ppm'de ayrı ayrı dublet ($J = 11.6$ Hz) vererek rezonans olmaktadır. İsoindol halkasındaki bromlarla aynı karbona bağlı protonlar 4.34 ppm'de dublet ($J = 2.0$ Hz) vermektedir. Yapıdaki metoksi grubu 3.89 ppm'de singlet verirken isoindol halkasındaki köprübaşı protonları 3.46-3.45 arasında multiplet, karbonillere komşu protonlar 3.29 ppm'de dublet ($J = 1.2$ Hz), köprü üzerinde yer alan protonlar ise 2.66 ve 1.89 ppm'de ayrı ayrı dublet ($J = 11.2$ Hz) vererek rezonans olmaktadır.



Şekil 4.2. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-metoksifenil)propanoil) fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisoindol-1,3(2H)-dion 400 MHz ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3) (**8a**)

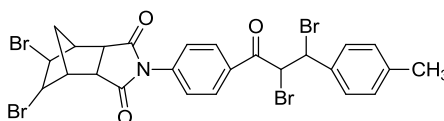
Şekil 4.2.'da (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(metoksifenil)propanoil)fenil)-hekzahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumunda en aşağı alanda yer alan sinyal 190.1 ppm propanon zincirindeki karbonile aittir. İzoindol halkasındaki karboniller ise 174.2 ppm'de rezonans olmaktadır. İpso karbonlar ise sırası ile 160.2, 135.8, 134.4 ve 132.8 ppm'de

rezonans olmaktadır. Diğer aromatik karbonlar 130.0 (2C), 129.9 (2C), 129.6 (2C) ve 114.3 (2C) ppm'de sinyal vermektedirler. Alifatik karbonlar ise sırası ile 55.4 (2C), 55.3, 51.3, 51.0, 50.0, 47.7 (2C), 47.1 ve 37.8 ppm'de rezonans olmaktadır.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 8.24 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.81 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 5.67 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.46-3.45 (m, 2H), 3.29 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 2.66 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 1.89 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 190.1, 174.2 (2C), 160.2, 135.8, 134.4, 132.8, 130.0 (2C), 129.9 (2C), 129.6 (2C), 114.3 (2C), 55.4 (2C), 55.3, 51.3, 51.0, 50.0, 47.7 (2C), 47.1, 37.8

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(p-tolil)propanoil)fenil)hekzahidro-1H-4,7-metanoisoindol-1,3(2H)-dion

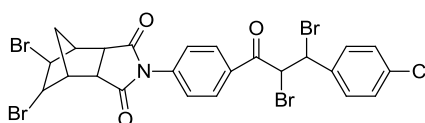


8b

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ = 7.55 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.45-7.41 (m, 4H), 7.28-7.25 (m, 2H), 5.83-5.72 (dd, *J* = 11.2 Hz, 7.6 Hz, 1H), 5.66-5.62 (dd, *J* = 11.2 Hz, 6 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 3.47-3.44 (m, 2H), 3.29-3.28 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 1.58 (s, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): 190.1, 176.2, 174.1, 139.5, 135.8, 135.0, 134.7, 134.4, 129.9, 129.7, 129.6, 128.2, 126.8, 126.5, 52.3, 51.3, 51.0, 49.8, 49.7, 47.6, 46.8, 45.9, 45.6, 37.8, 21.3.

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-klorofenil)propanoil)fenil)hekzahidro-1H-4,7-methanoizoindol-1,3(2H)-dion

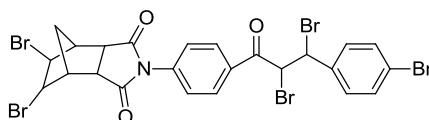


8c

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.58-7.45 (m, 6H), 6.24 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 3.46-3.45 (m, 2H), 3.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 2.51 (dd, *J* = 1.6 Hz, 1.0 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 1.85 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): 190.7, 176.4 (2C), 145.3 (2C), 141.3, 130.0, 135.4, 134.7 (2C), 131.9, 129.7 (2C), 129.2 (2C), 128.5, 126.5 (2C), 60.6 (2C), 52.3 (2C), 45.9 (2C), 45.6 (2C), 21.5.

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-bromofenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion

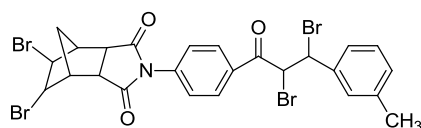


8d

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.58-7.45 (m, 6H), 6.24 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 5.60-5.55 (m, 1H), 4.38 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.46-3.45 (m, 2H), 3.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 2.51 (dd, *J* = 1.6 Hz, 1.0 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 1.85 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): 189.8, 176.2 (2C), 137.2, 136.8, 134.7, 133.7, 132.1 (2C), 129.9 (2C), 126.8 (2C), 123.3, 52.3 (2C), 48.5 (2C), 46.4, 45.9 (2C), 45.6 (2C).

(3aR,4S,7R,7aS)-2-(4-(2,3-dibromo-3-(m-tolil)propanoil)fenil)-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion

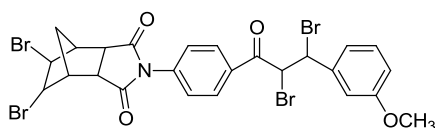


8e

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 7.43-7.41 (m, 3H), 7.23-7.25 (m, 1H), 5.81 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 5.62 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 3.46-3.45 (m, 2H), 3.29-3.28 (m, 2H), 2.66 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 2.44 (s, 3H), 1.88 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): 190.1, 174.1 (2C), 138.7, 137.8, 135.8, 134.4, 130.2, 129.9 (2C), 128.9, 128.8, 126.5 (2C), 125.4, 51.3 (2C), 51.0 (2C), 49.7, 47.6 (2C), 46.7, 37.8, 21.4.

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(3-metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion

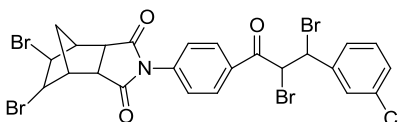


8f

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 8.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.79-6.76 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.8 Hz, 2H), 6.33 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H), 6.06 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.46-3.44 (dd, *J* = 3.2 Hz, 2.4 Hz, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.52-2.51 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, ppm): 195.0, 179.4 (2C), 164.3, 142.9, 138.5, 138.3, 134.8 (2C), 131.9 (2C), 121.2 (2C), 121.0, 119.3, 60.6 (2C), 57.1 (2C), 55.5 (2C), 52.5 (2C), 50.1, 42.5.

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(3-klorofenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion



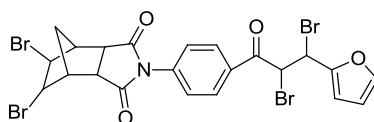
8g

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): 8.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.55-7.53 (m, 4H), 7.50-7.37 (m, 2H), 6.30 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 5.75-5.72 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.4 Hz, 1H), 5.60-5.57

(dd, $J = 6.0$ Hz, 2.6 Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.56-3.25 (m, 2H), 3.28-3.27 (m, 1H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.67-1.63 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): δ 189.8, 176.2 (2C), 140.0, 139.9, 136.6 (2C), 133.7, 130.1, 129.9 (2C), 129.7, 128.4, 126.8 (2C), 52.3, 51.3, 51.0, 48.2, 46.3, 45.9 (2C), 45.6, 37.8.

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(furan-2-yl)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion

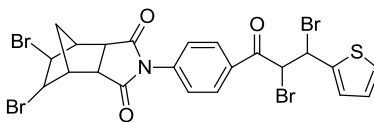


8h

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 7.60 (d, $J = 15.26$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.36-7.30 (m, 2H), 6.53 (dd, $J = 3.32, 1.62$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 1.42$ Hz, 2H), 5.81 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 5.66 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.36-4.34 (m, 2H), 3.54 (d, $J = 1.38$ Hz, 2H), 3.50-3.46 (m, 2H), 1.82 (dd, $J = 8.87, 1.38$ Hz, 1H), 1.64 (d, $J = 8.84$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm): 188.8, 176.4 (2C), 151.5, 145.1, 137.7, 135.5, 131.1, 129.1 (2C), 126.6 (2C), 118.9, 116.7, 58.4 (2C), 52.3 (2C), 45.9 (2C), 45.6 (2C), 27.0.

(3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(thiophen-2-yl)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoizoindol-1,3(2H)-dion



8i

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , ppm): 8.04 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 7.31-7.29 (m, 2H), 7.18-7.16 (dd, $J = 4.0, 0.6$ Hz, 1H), 6.28 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 3.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 3.49-3.47 (m, 2H), 1.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 1.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H).

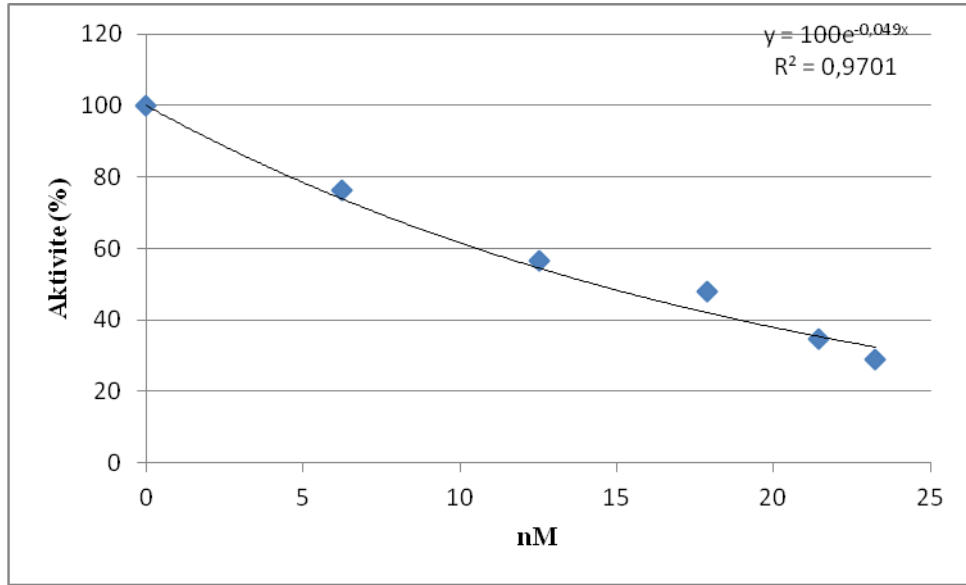
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃,ppm): 189.8, 176.4 (2C), 138.0, 137.4, 136.8, 135.9, 135.1, 134.6, 132.2, 130.0, 127.2, 126.5, 120.1, 58.4 (2C), 52.3, 45.9 (2C), 45.6 (2C), 19.9 (2C).

4.1. Bazı kalkon türevlerinin karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin sonuçları

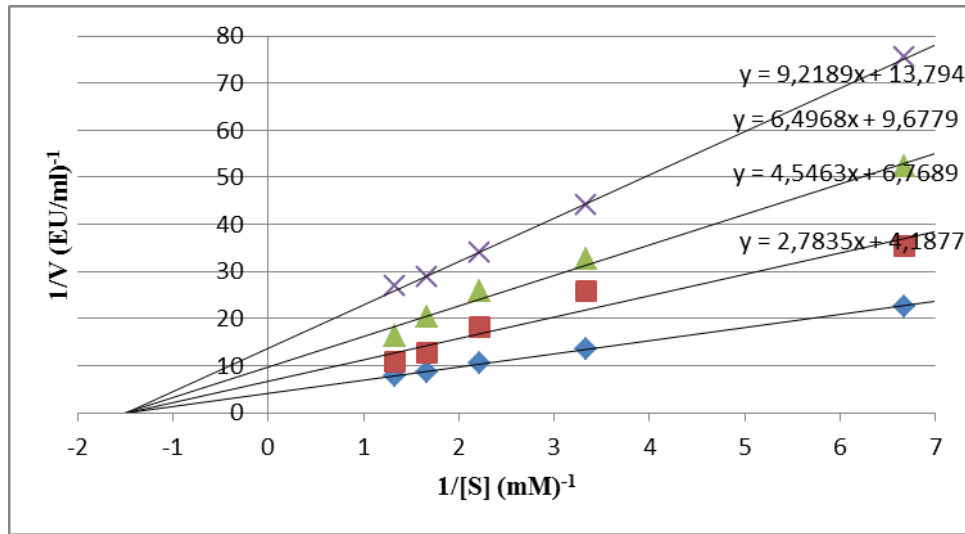
İnsan kanı eritrosit hücrelerinden Sepharose 4B-L tirozin sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimleri için bölüm 3.1.5’de anlatıldığı şekilde, **8a-i** kodlu organik maddelerin stok çözeltileri hazırlandı. İnsan kanı eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren yukarıda adı geçen organik maddeler ile ilgili konsantrasyonlar ve % aktivite değerleri sırasıyla çizelge 4.1.1.- 4.1.9. ve 4.2.1.- 4.2.9. verildi. Daha sonra hCA izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkileri araştırıldı. hCA I ve hCA II izoenzimleri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.1.-4.3.18. elde edilen % Aktivite ve Lineweaver-Burk grafiği verildi. Son olarak IC₅₀ ve Ki için toplu sonuçlar ise çizelge 4.5. verildi.

Çizelge 4.1.1. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8a** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8a** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	25	215	1000	–	100.00
360	400	25	195	1000	2	30.11
360	400	25	185	1000	3	24.71
360	400	25	175	1000	4	18.65
360	400	25	135	1000	8	15.28
360	400	25	115	1000	10	7.42



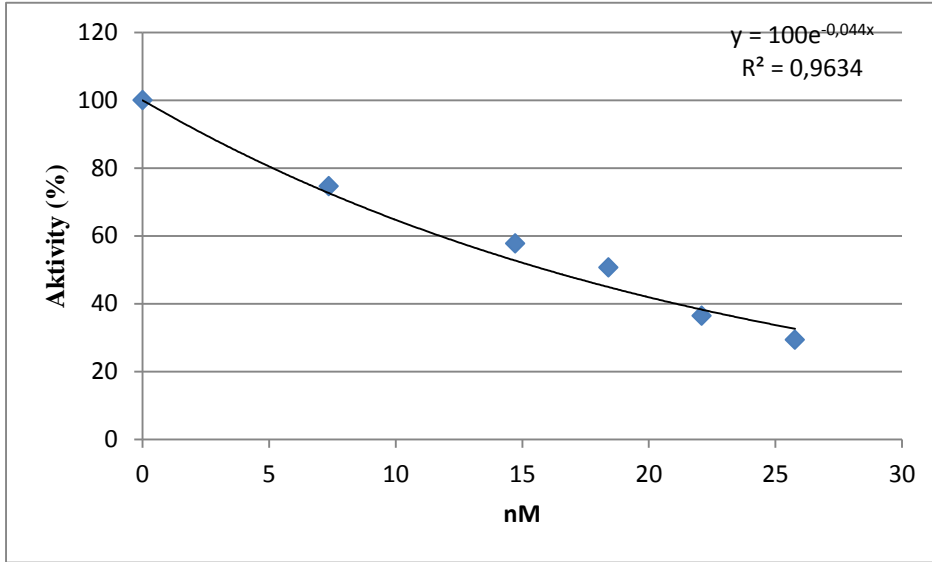
Şekil 4.3. hCA I enzimi için 6 farklı 8a konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8a] grafiği



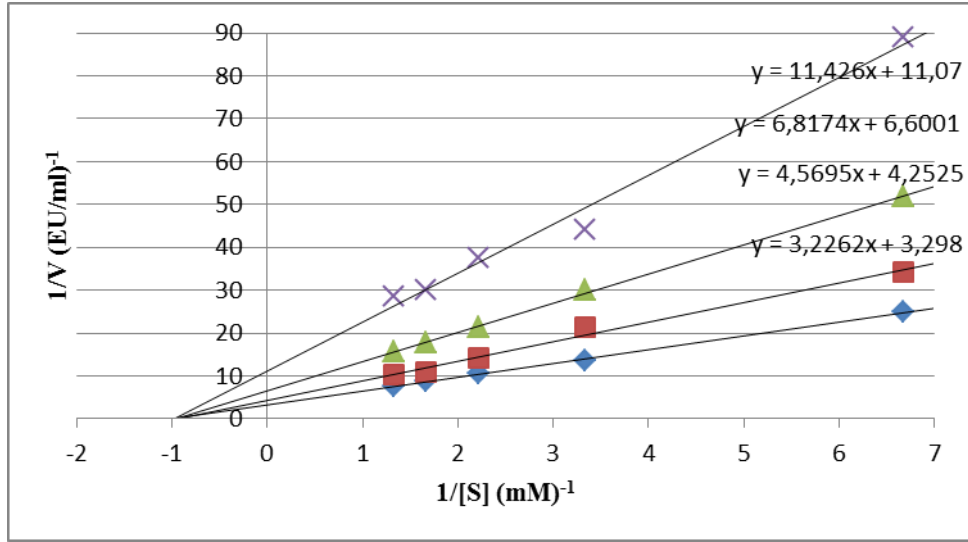
Şekil 4.4. hCA I enzimi üzerine 8a nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 35 mM, Δ = 100 mM, X = 130 mM)

Çizelge 4.1.2. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8b** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8b** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	25	215	1000	–	100
360	400	25	195	1000	2	64.38
360	400	25	185	1000	3	49.60
360	400	25	155	1000	4	35.13
360	400	25	155	1000	6	24.96
360	400	25	135	1000	8	21.14
360	400	25	115	1000	10	17.01



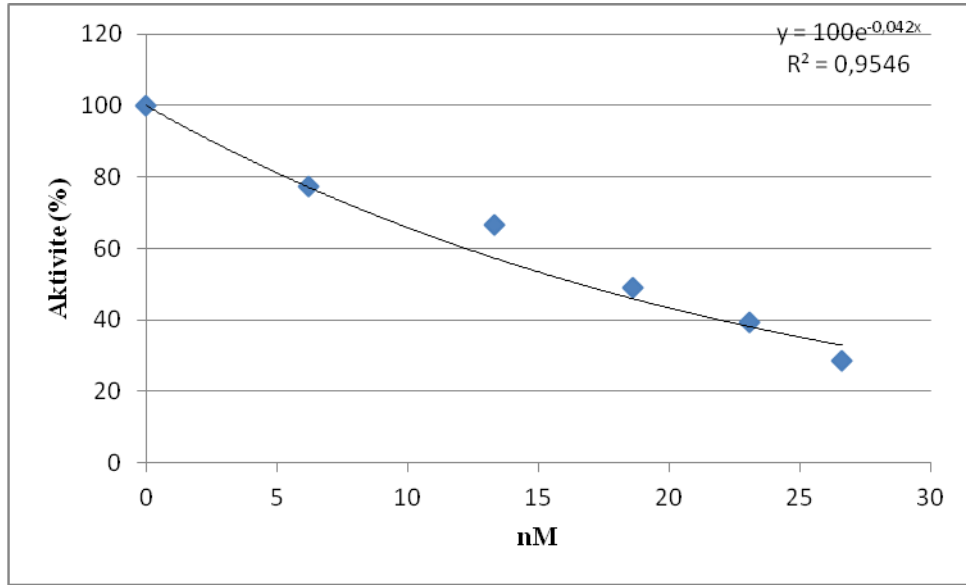
Şekil 4.5. hCA I enzimi için 6 farklı **8b** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8b**] grafiği



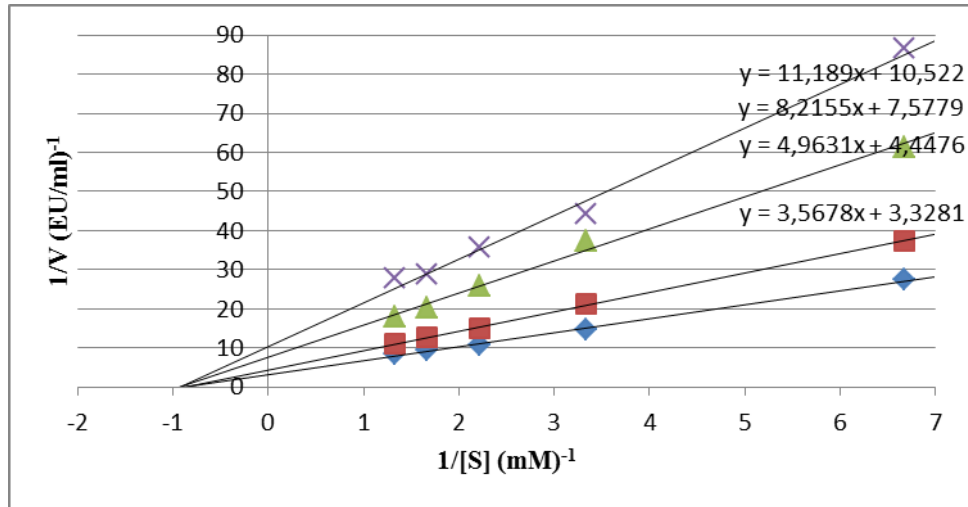
Şekil 4.6. hCA I enzimi üzerine **8b** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□= Kontrol, □= 40 mM, △= 100 mM, X= 140 mM)

Çizelge 4.1.3. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8c** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8c** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	25	215	1000	–	100.00
360	400	25	195	1000	2	69.24
360	400	25	185	1000	3	51.78
360	400	25	175	1000	4	46.03
360	400	25	155	1000	6	39.68
360	400	25	135	1000	8	22.22
360	400	25	115	1000	10	18.45



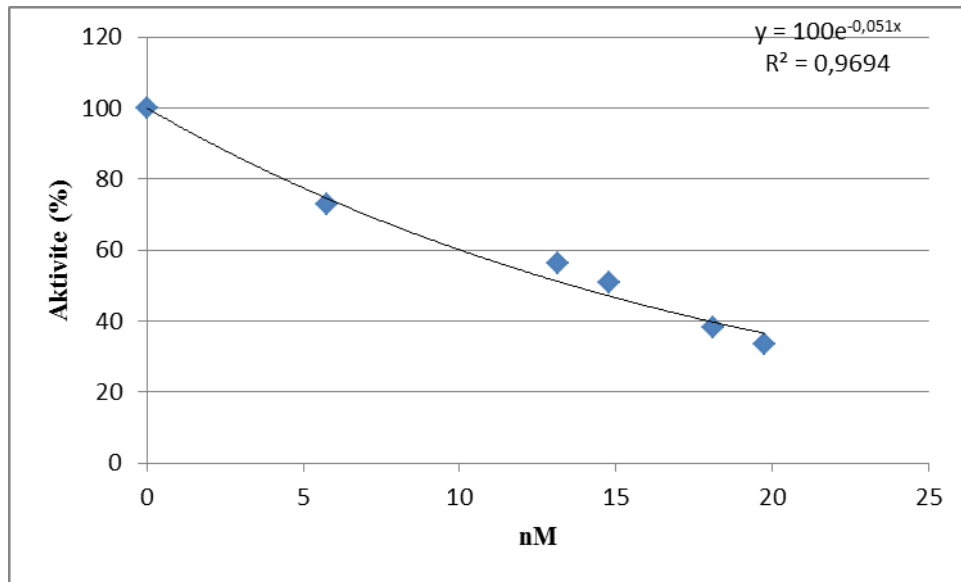
Şekil 4.7. hCA I enzimi için 6 farklı 8c konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[8c] grafiği



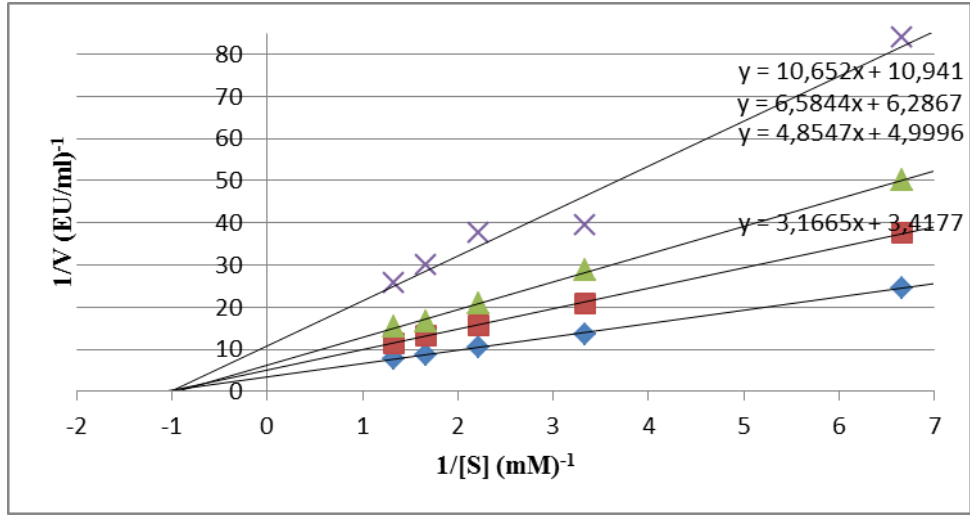
Şekil 4.8. hCA I enzimi üzerine 8c nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (◇ = Kontrol, □ = 35 mM, Δ = 105 mM, X = 150 mM)

Çizelge 4.1.4. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8d** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8d** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	190	1000	30	91.62
360	400	20	180	1000	40	73.78
360	400	20	170	1000	50	64.30
360	400	20	160	1000	60	46.92
360	400	20	150	1000	70	26.86
360	400	20	140	1000	80	18.96



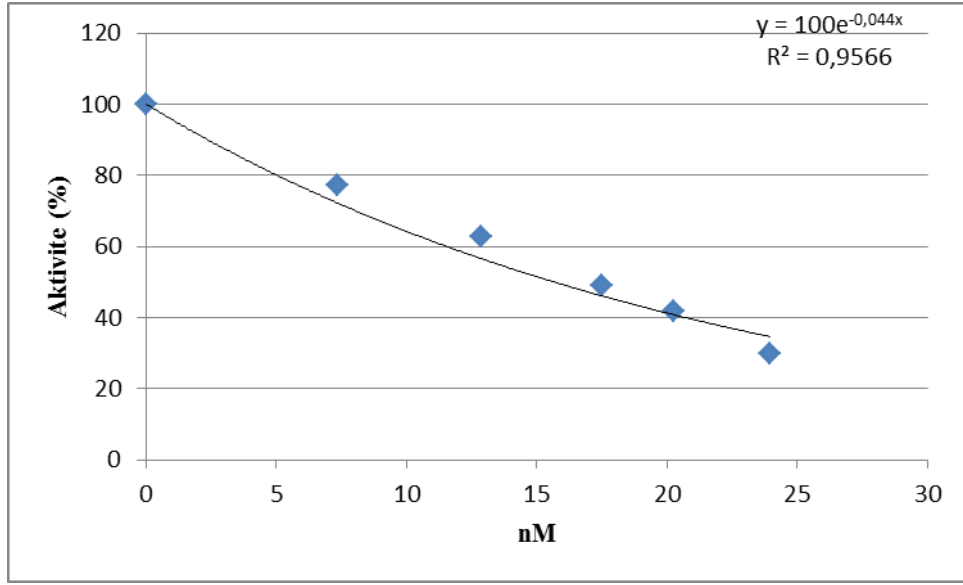
Şekil 4.9. hCA I enzimi için 6 farklı **8d** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8d**] grafiği



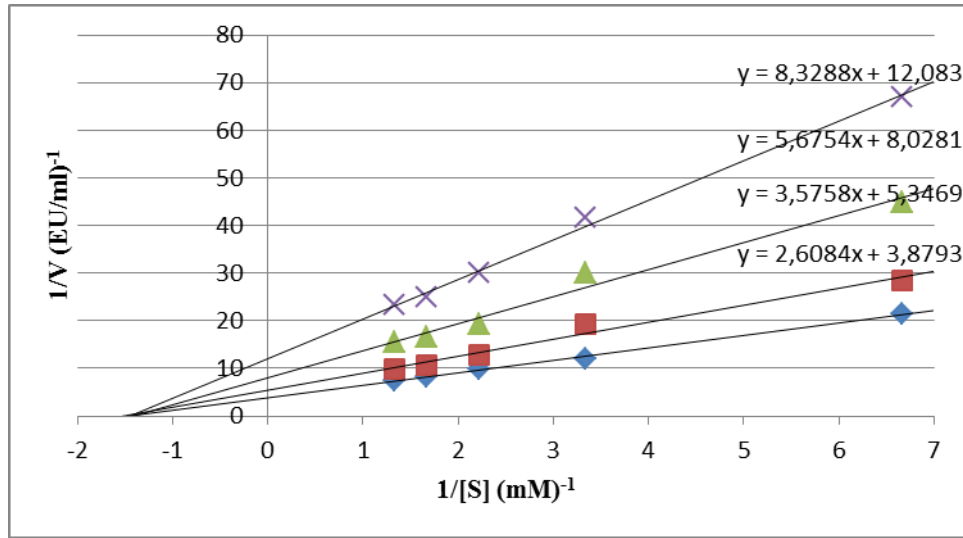
Şekil 4.10. hCA I enzimi üzerine **8d** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, ■ = 35 mM, ▲ = 90 mM, X = 120 mM)

Çizelge 4.1.5. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8e** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8e** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	25	215	1000	—	100.00
360	400	25	185	1000	3	29.24
360	400	25	175	1000	4	19.61
360	400	25	165	1000	5	16.35
360	400	25	145	1000	7	4.6



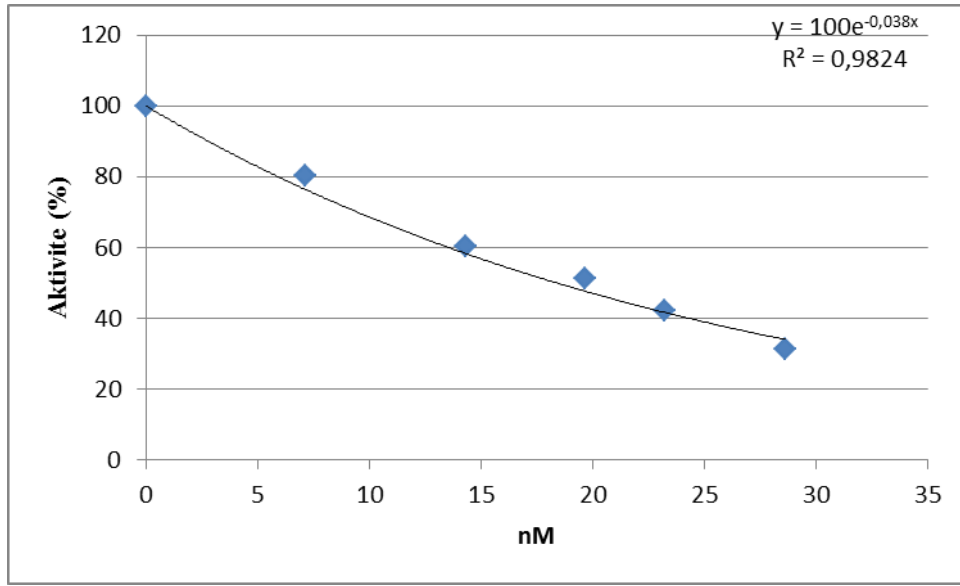
Şekil 4.11. hCA I enzimi için 6 farklı **8e** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8e**] grafiği



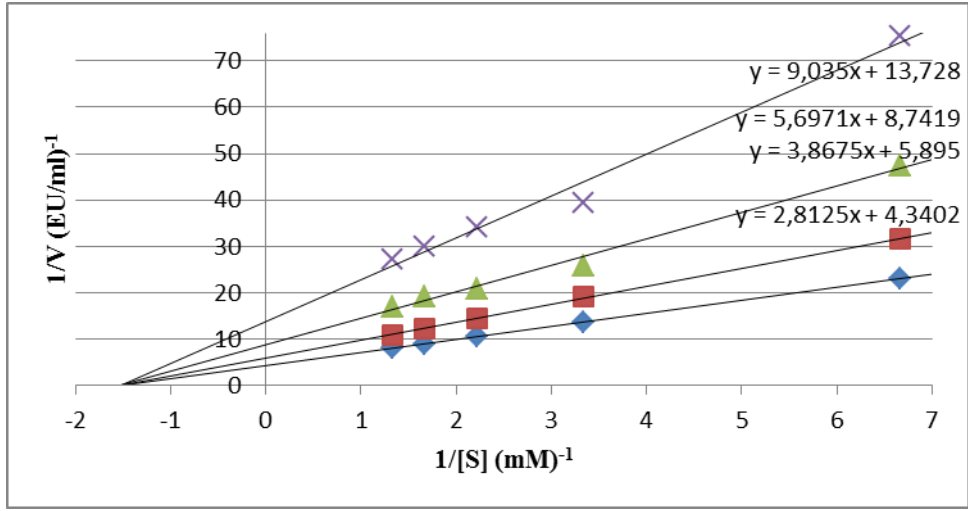
Şekil 4.12. hCA I enzimi üzerine **8e** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, ■ = 40 mM, ▲ = 95 mM, X = 130 mM)

Çizelge 4.1.6. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8f** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8f** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	210	1000	10	63.61
360	400	20	200	1000	20	57.76
360	400	20	190	1000	30	49.10
360	400	20	185	1000	35	40.71
360	400	20	180	1000	40	20.35
360	400	20	175	1000	45	7.633
360	400	20	170	1000	50	5.852



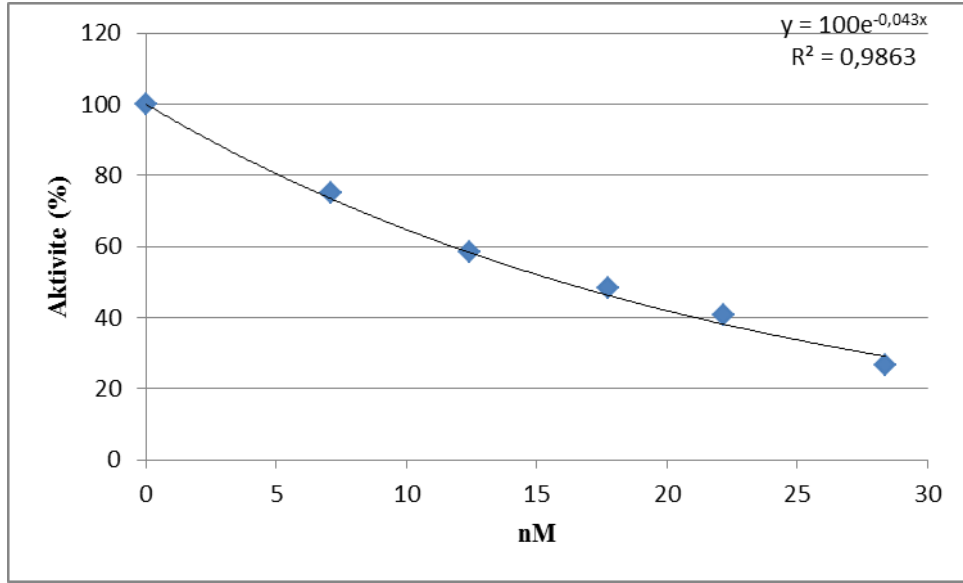
Şekil 4.13. hCA I enzimi için 6 farklı **8f** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8f**] grafiği



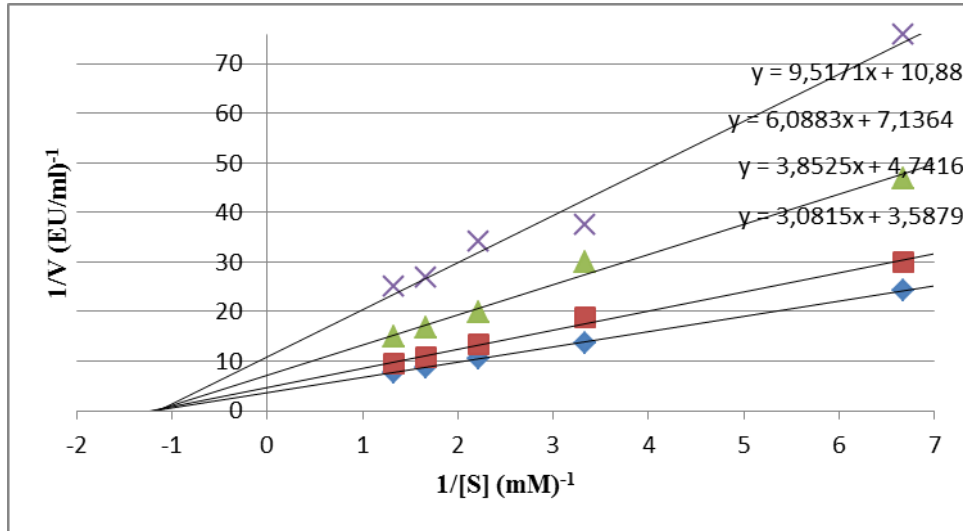
Şekil 4.14. hCA I enzimi üzerine **8f** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği(□= Kontrol, □= 40 mM, △= 110 mM, X= 160 mM)

Çizelge 4.1.7. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8g** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8g** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	25	215	1000	–	100
360	400	25	195	1000	2	64.38
360	400	25	185	1000	3	49.60
360	400	25	155	1000	4	35.13
360	400	25	155	1000	6	24.96
360	400	25	135	1000	8	21.14
360	400	25	115	1000	10	17.01



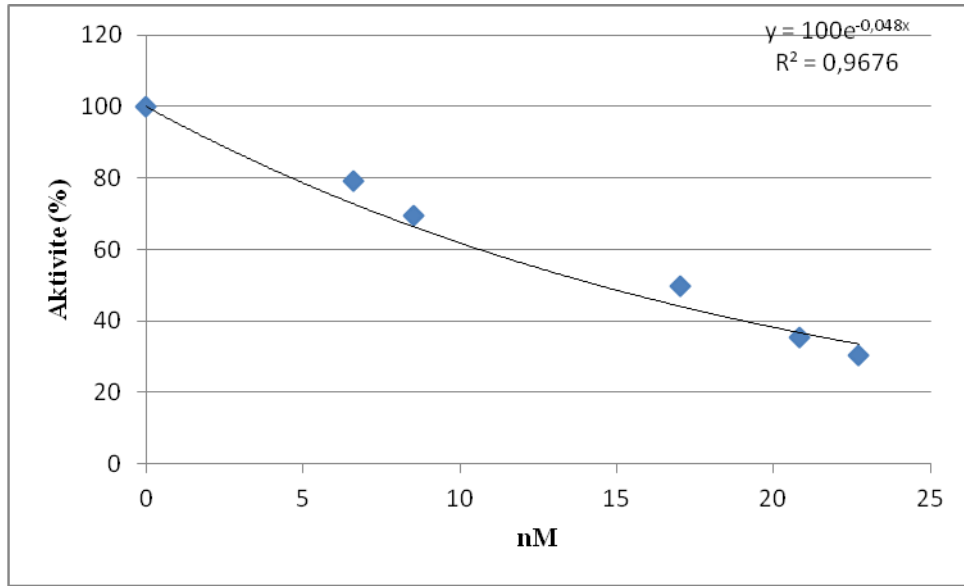
Şekil 4.15. hCA I enzimi için 6 farklı **8g** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8g**] grafiği



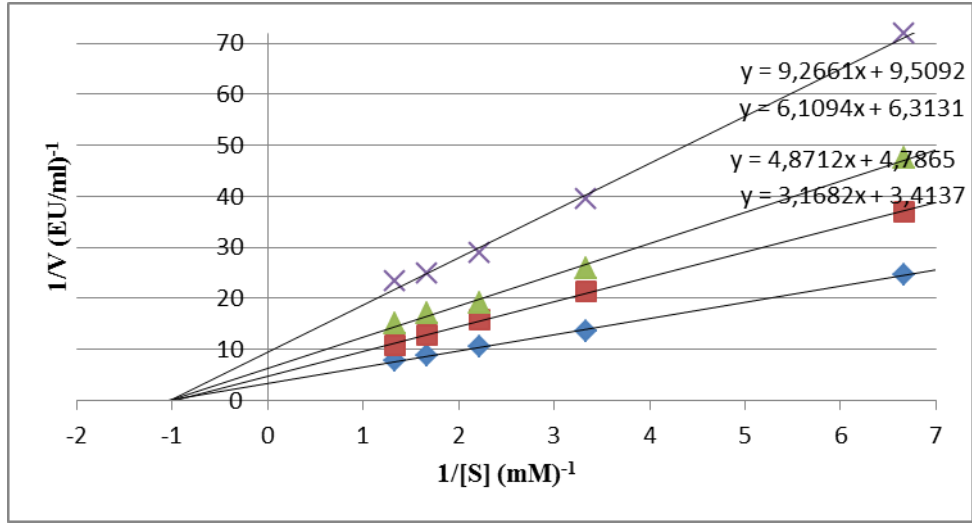
Şekil 4.16. hCA I enzimi üzerine **8g** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 40 mM, △ = 100 mM, X = 160 mM)

Çizelge 4.1.8. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8h** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8h** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	210	1000	0.1	73.31
360	400	20	200	1000	0.2	64.02
360	400	20	190	1000	0.3	45.32
360	400	20	180	1000	0.4	41.79
360	400	20	170	1000	0.5	35.80
360	400	20	160	1000	0.6	33.50
360	400	20	150	1000	0.7	24.69
360	400	20	140	1000	0.8	20.63



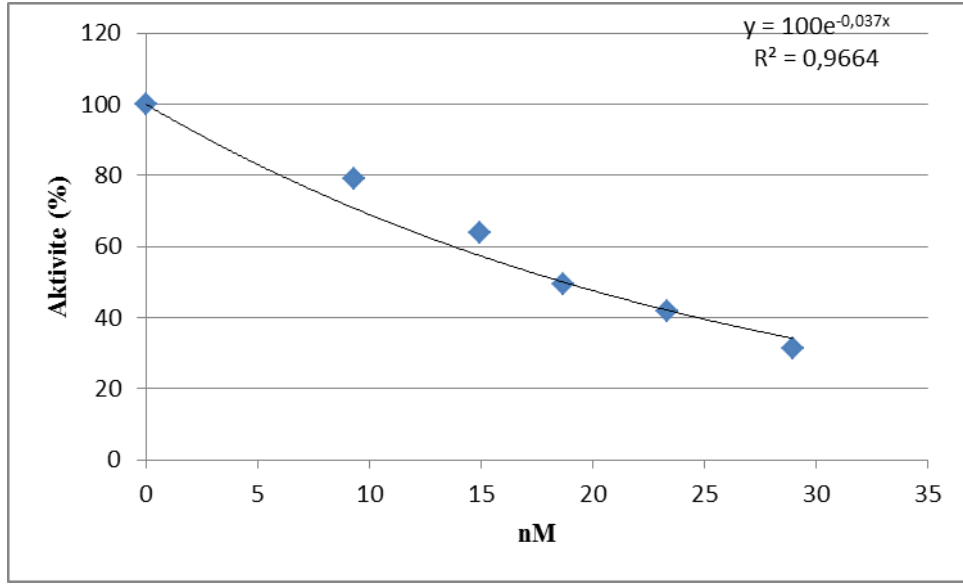
Şekil 4.17. hCA I enzimi için 6 farklı **8h** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8h**] grafiği



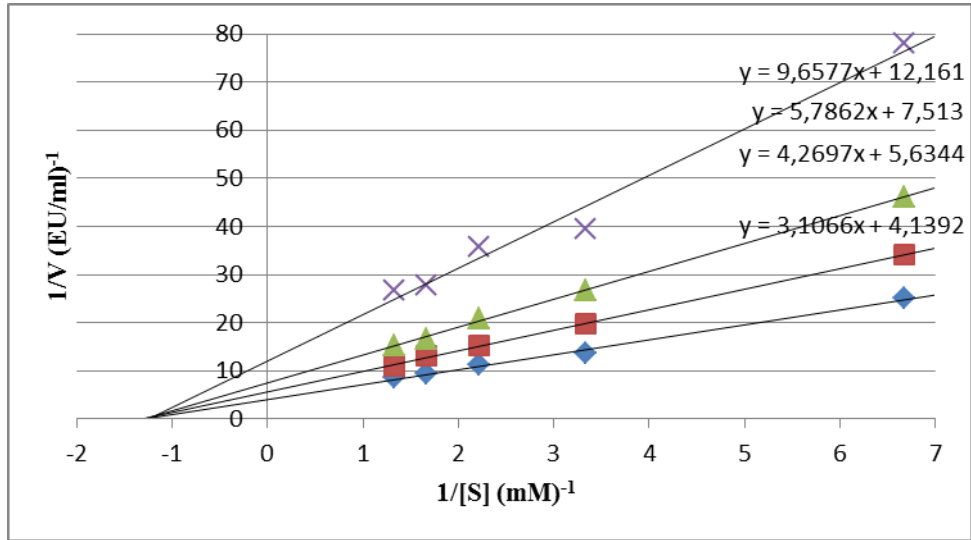
Şekil 4.18. hCA I enzimi üzerine **8h** nolu organik bileşiği için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 35 mM, △ = 90 mM, X = 120 mM)

Çizelge 4.1.9. hCA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8i** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8i** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	25	215	1000	–	100.00
360	400	25	135	1000	8	73.93
360	400	25	115	1000	10	69.04
360	400	25	95	1000	12	49.10
360	400	25	85	1000	13	39.10
360	400	25	65	1000	15	32.58



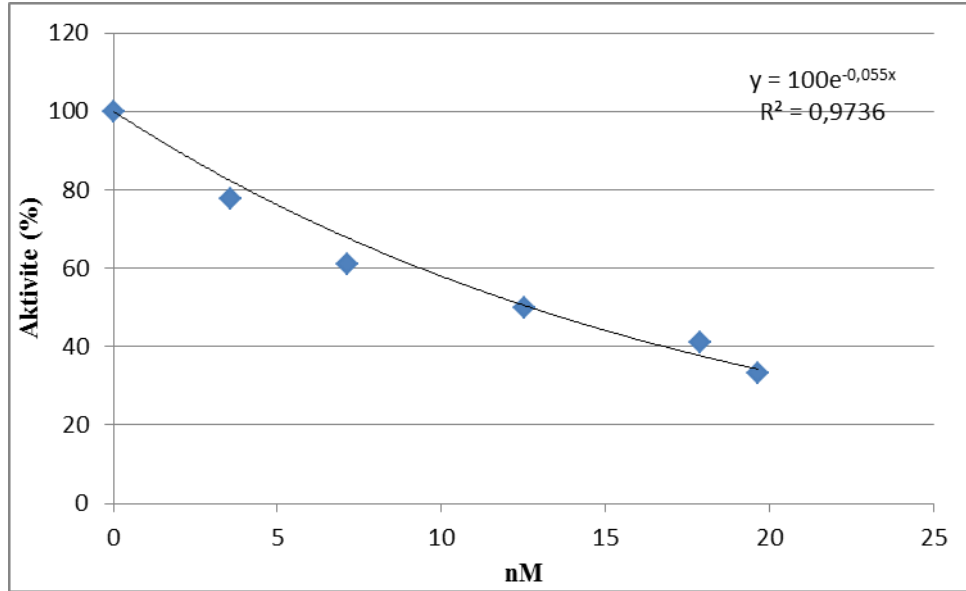
Şekil 4.19. hCA I enzimi için 6 farklı **8i** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8i**] grafiği



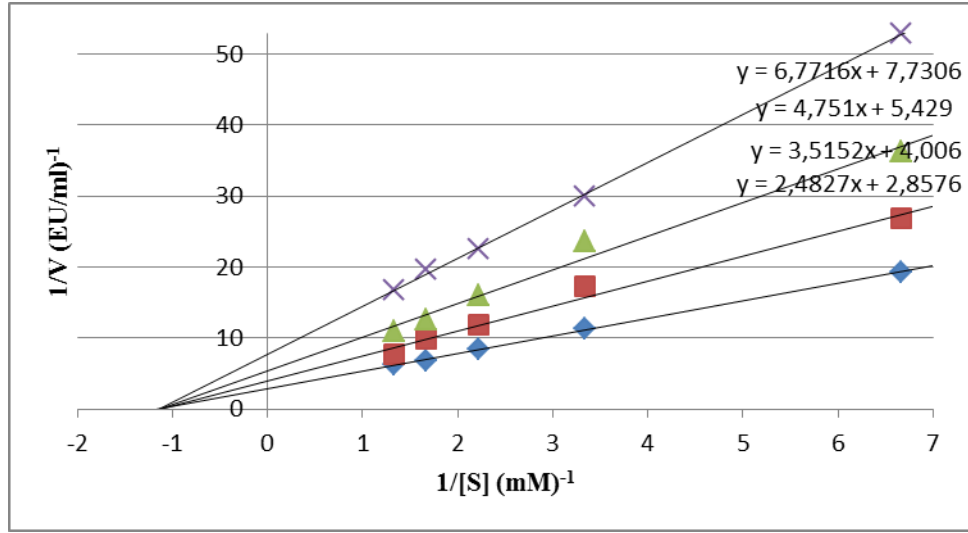
Şekil 4.20. hCA I enzimi üzerine **8i** nolu organik bileşiği için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 50 mM, △ = 100 mM, X = 155 mM)

Çizelge 4.2.1. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8a** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8a** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	200	1000	2.0	69.75
360	400	20	190	1000	3.0	45.23
360	400	20	185	1000	3.5	40.18
360	400	20	180	1000	4.0	33.86
360	400	20	170	1000	5.0	29.43



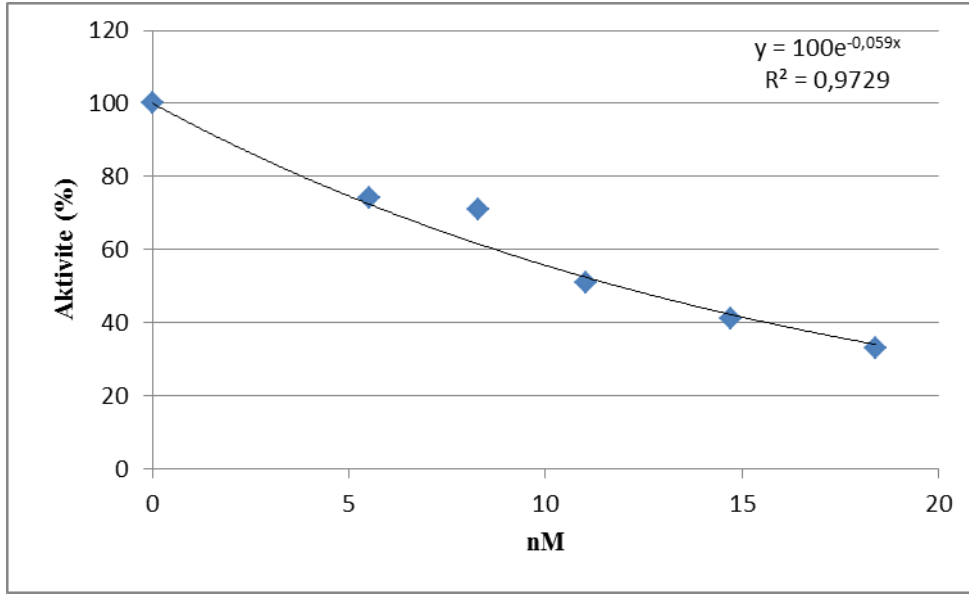
Şekil 4.2.1. hCA II enzimi için 6 farklı **8a** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8a**] grafiği



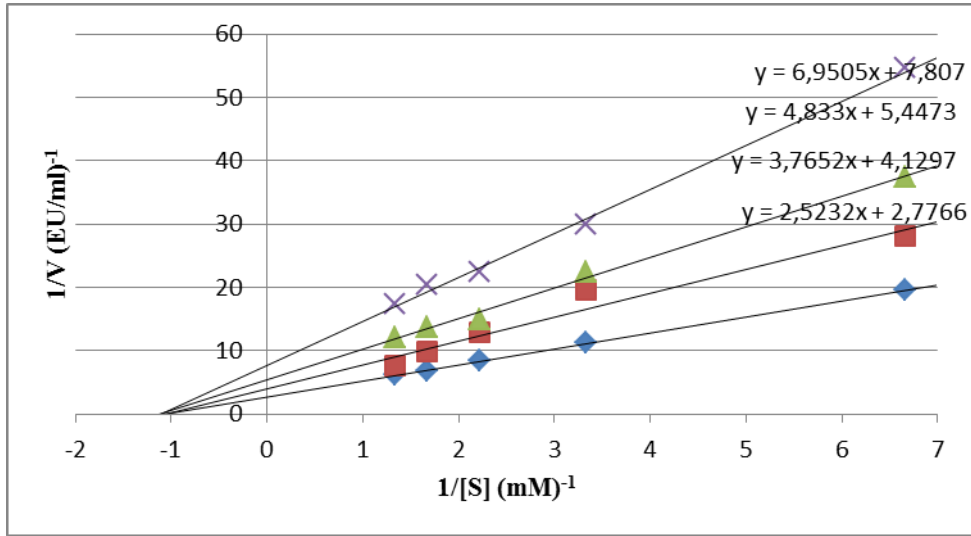
Şekil 4.2.2. hCAII enzimi üzerine **8a** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□= Kontrol, □= 20 mM, △= 70 mM, X= 110 mM)

Çizelge 4.2.2. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine 8b nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen 8b iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	210	1000	0.1	76.07
360	400	20	200	1000	0.2	63.21
360	400	20	180	1000	0.4	51.07
360	400	20	160	1000	0.6	36.78
360	400	20	140	1000	0.8	15.36
360	400	20	120	1000	1.0	11.76



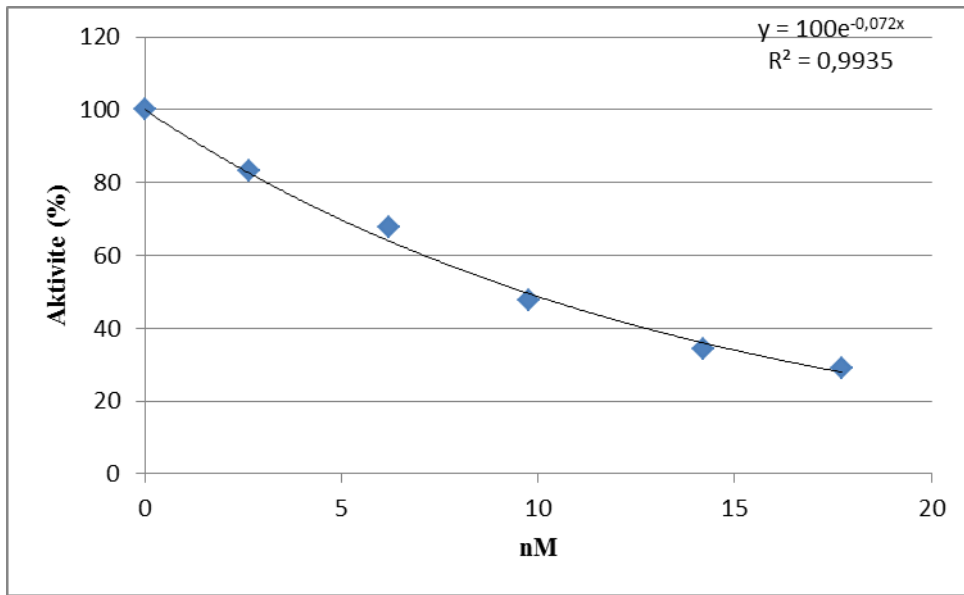
Şekil 4.2.3. hCA I I enzimi için 6 farklı **8b** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8b**] grafiği



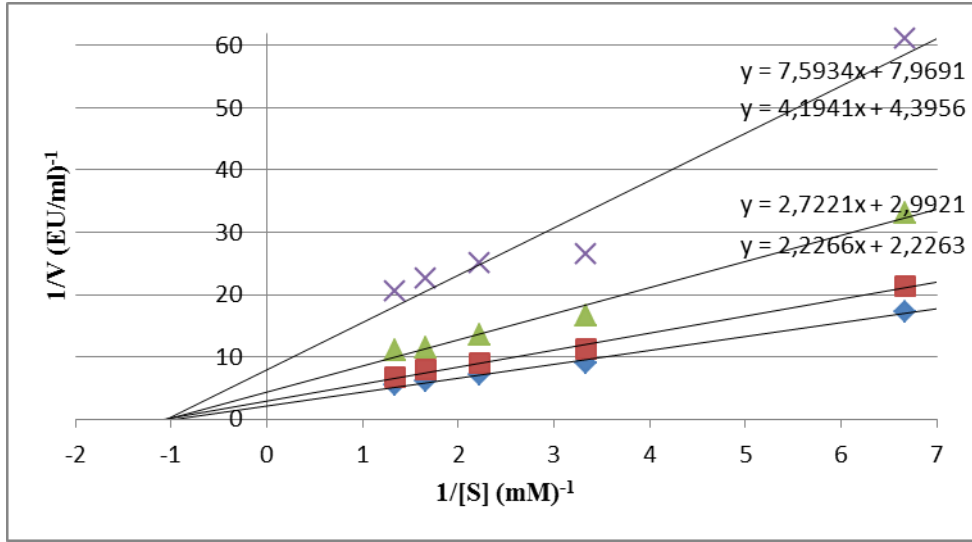
Şekil 4.2.4. hCAII enzimi üzerine **8b** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 30 mM, △ = 60 mM, X = 100 mM)

Çizelge 4.2.3. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8c** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8c** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	205	1000	1.5	62.26
360	400	20	200	1000	2.0	56.09
360	400	20	195	1000	2.5	50.94
360	400	20	190	1000	3.0	32.59
360	400	20	185	1000	3.5	20.58
360	400	20	180	1000	4.0	18.85



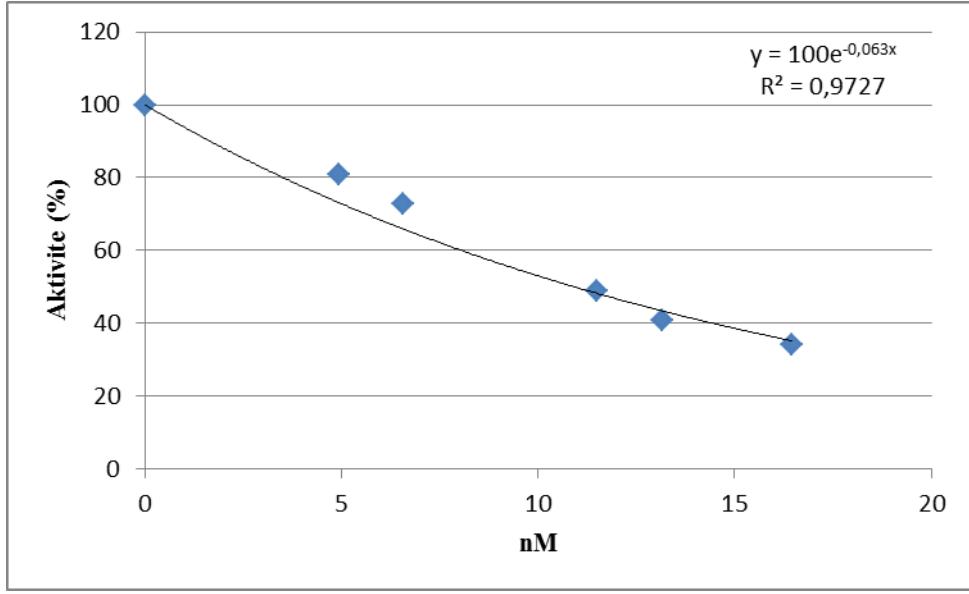
Şekil 4.2.5 . hCA II enzimi için 6 farklı **8c** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8c**] grafiği



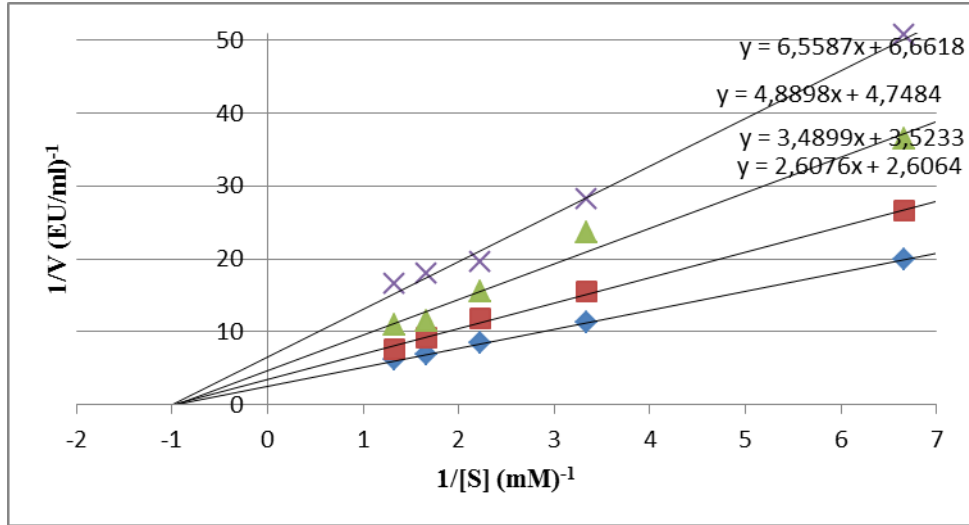
Şekil 4.2.6. hCA II enzimi üzerine **8c** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, ■ = 15 mM, ▲ = 55 mM, X = 100 mM)

Çizelge 4.2.4. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8d** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8d** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	200	1000	2.0	69.75
360	400	20	190	1000	3.0	45.23
360	400	20	185	1000	3.5	40.18
360	400	20	180	1000	4.0	33.86
360	400	20	170	1000	5.0	29.43



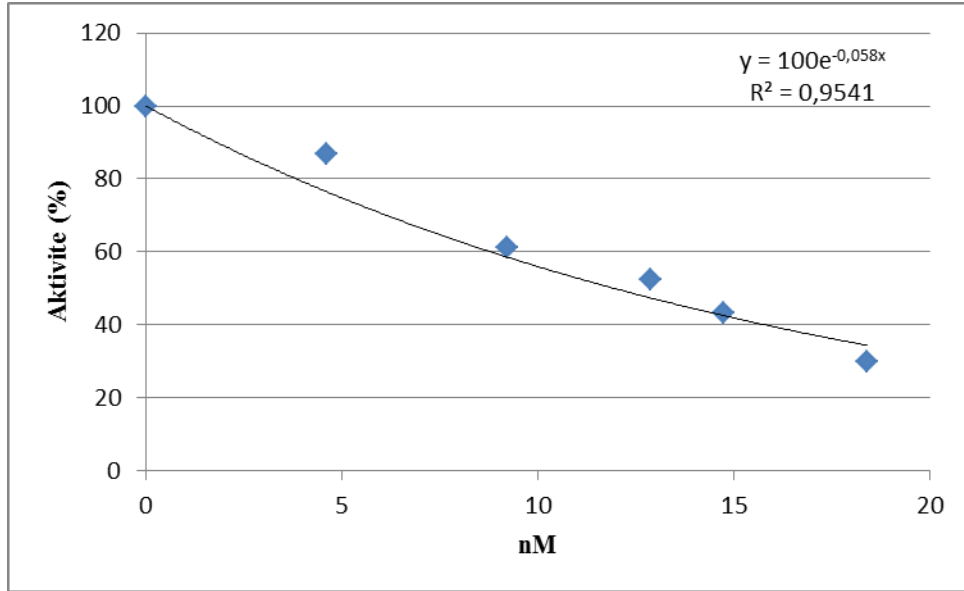
Şekil 4.2.7. hCA I I enzimi için 6 farklı **8d** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8d**] grafiği



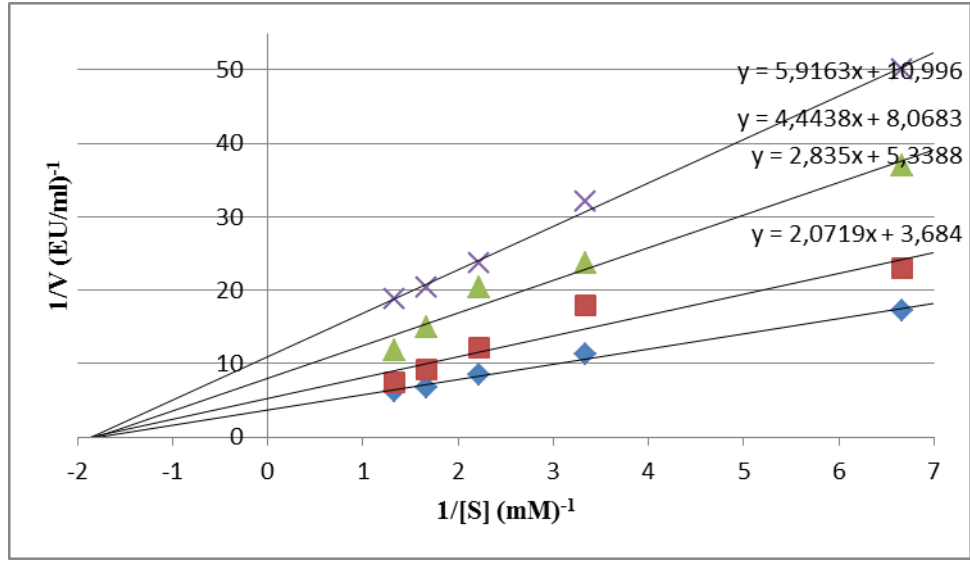
Şekil 4.2.8. hCA II enzimi üzerine **8d** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, ■ = 30 mM, ▲ = 70 mM, X = 100 mM)

Çizelge 4.2.5. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8e** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8e** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	200	1000	2.0	69.75
360	400	20	190	1000	3.0	45.23
360	400	20	185	1000	3.5	40.18
360	400	20	180	1000	4.0	33.86
360	400	20	170	1000	5.0	29.43



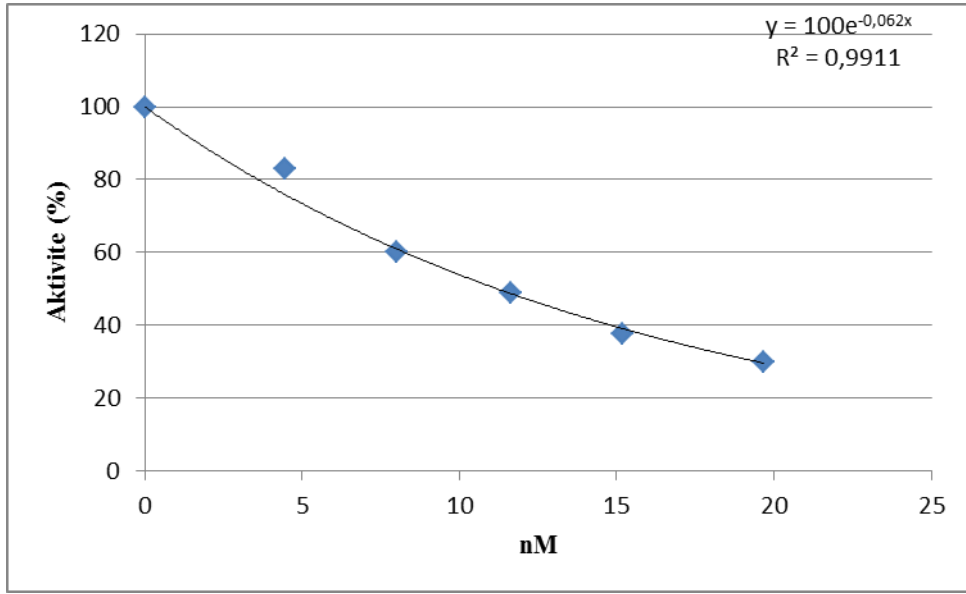
Şekil 4.2.9. hCA I I enzimi için 6 farklı **8e** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8e**] grafiği



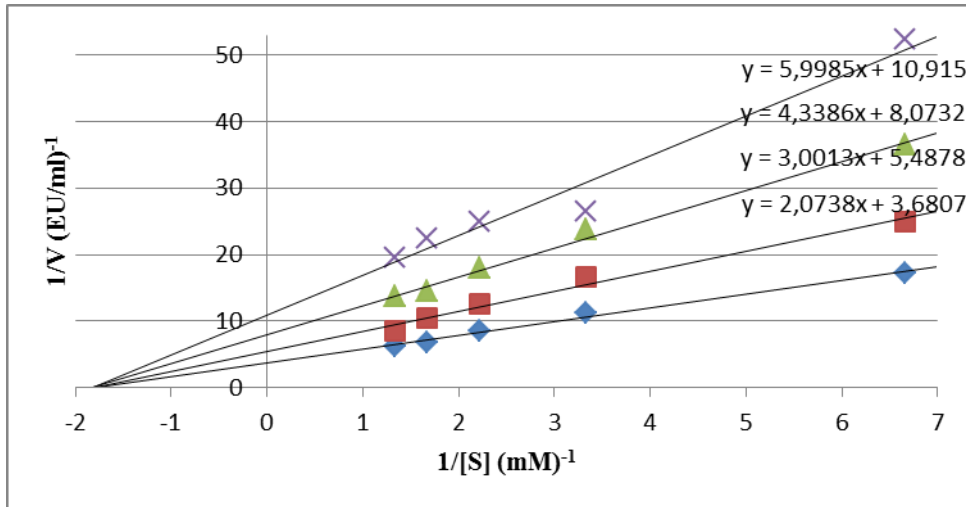
Şekil 4.2.10. hCA II enzimi üzerine **8e** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 25 mM, △ = 70 mM, X = 100 mM)

Çizelge 4.2.6. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8f** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8f** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	215	1000	5	69.75
360	400	20	212	1000	8	45.23
360	400	20	210	1000	10	40.18
360	400	20	208	1000	12	33.86
360	400	20	205	1000	15	29.43
360	400	20	200	1000	20	6.32



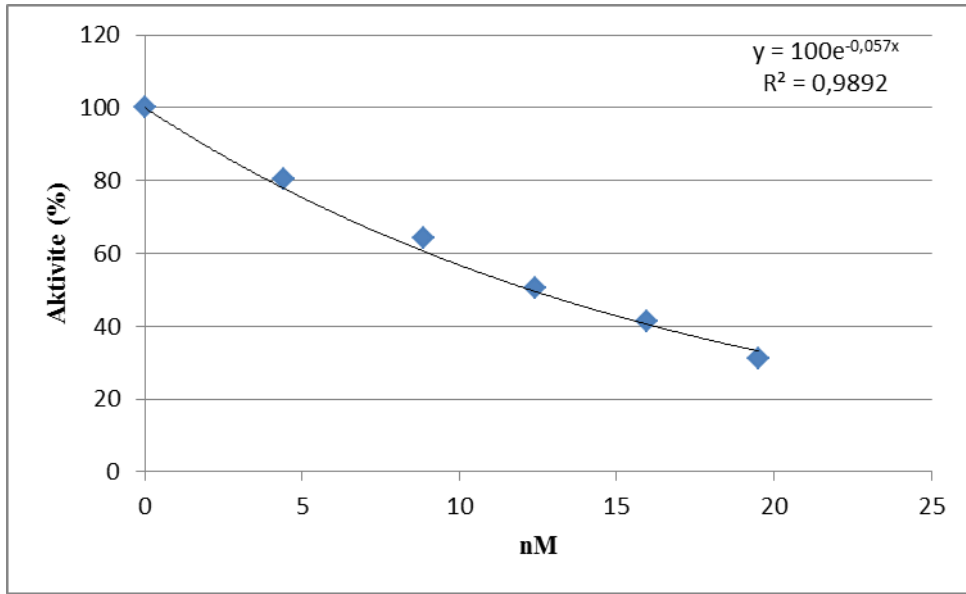
Şekil 4.2.11. hCA I I enzimi için 6 farklı **8f** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8f**] grafiği



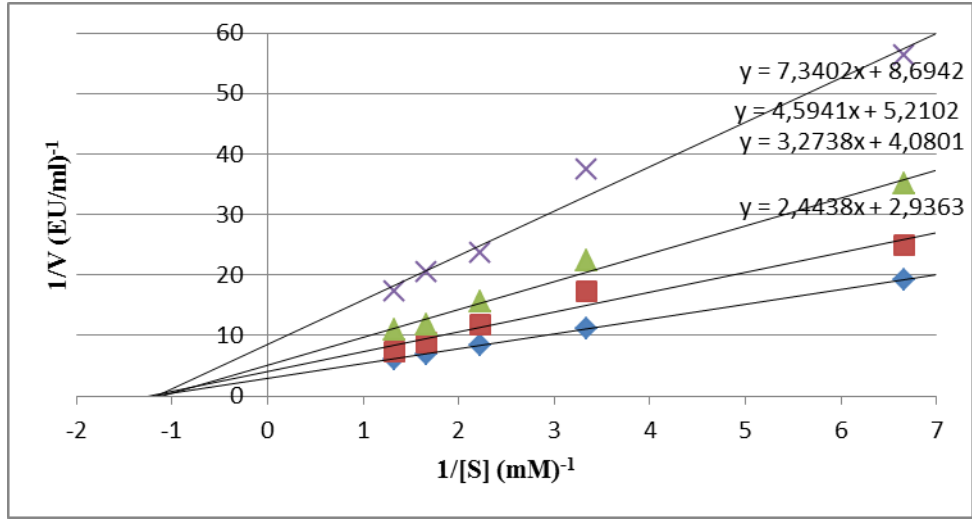
Şekil 4.2.12. hCA II enzimi üzerine **8f** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 25 mM, △ = 65 mM, X = 110 mM)

Çizelge 4.2.7. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8g** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8g** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	—	100.00
360	400	20	210	1000	0.1	76.07
360	400	20	200	1000	0.2	63.21
360	400	20	180	1000	0.4	51.07
360	400	20	160	1000	0.6	36.78
360	400	20	140	1000	0.8	15.36
360	400	20	120	1000	1.0	11.76



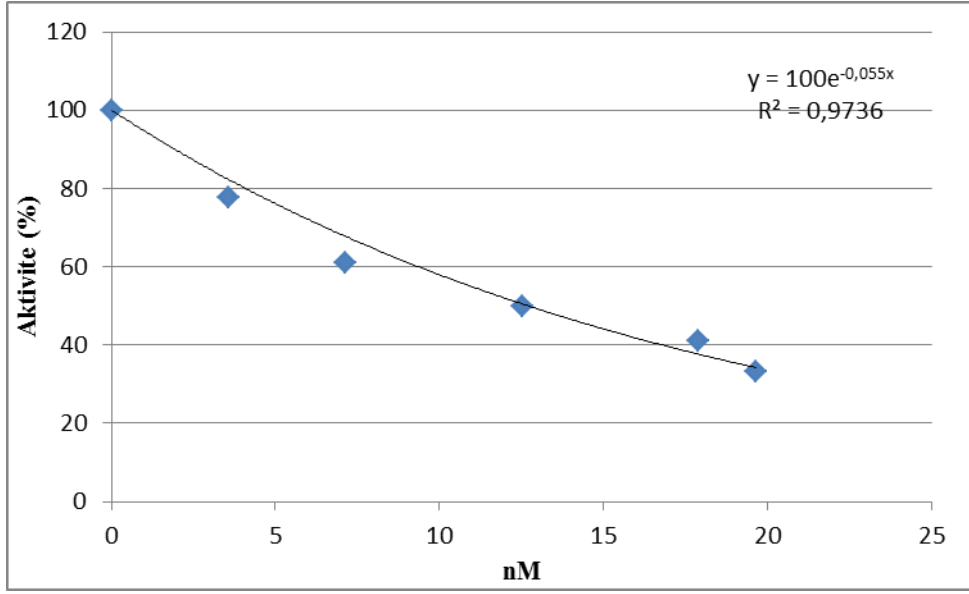
Şekil 4.2.13. hCA I I enzimi için 6 farklı **8g** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8g**] grafiği



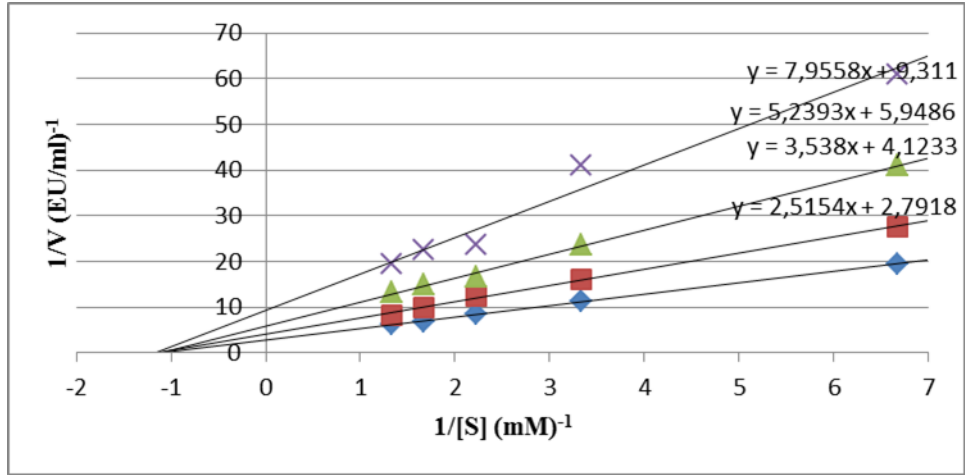
Şekil 4.2.14. hCA II enzimi üzerine **8g** nolu organik bileşik için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 25 mM, △ = 70 mM, X = 110 mM)

Çizelge 4.2.8. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8h** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8h** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	–	100.00
360	400	20	200	1000	20	69.75
360	400	20	190	1000	3.0	45.23
360	400	20	185	1000	3.5	40.18
360	400	20	180	1000	4.0	33.86
360	400	20	170	1000	5.0	29.43



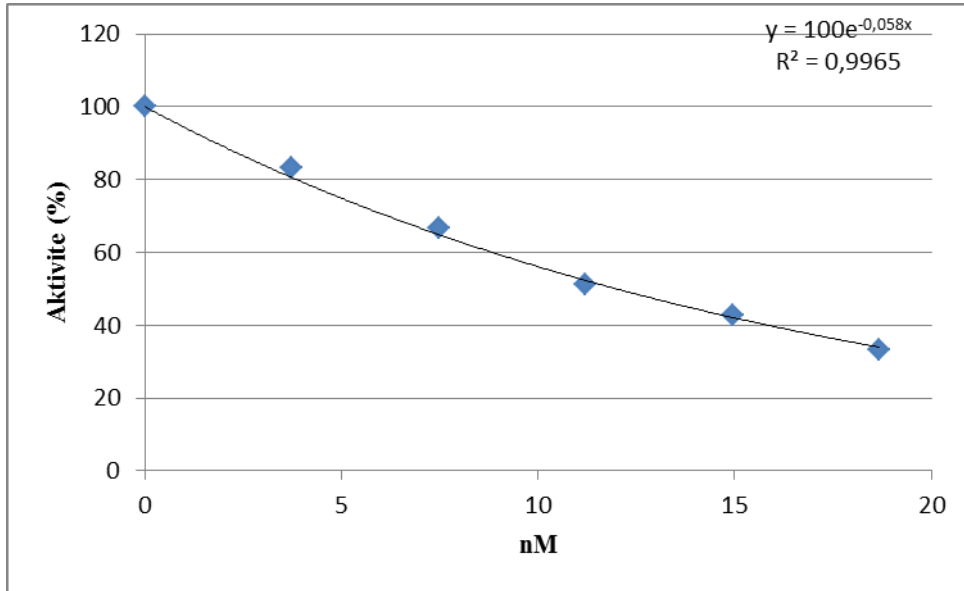
Şekil 4.2.15. hCA I I enzimi için 6 farklı **8h** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8h**] grafiği



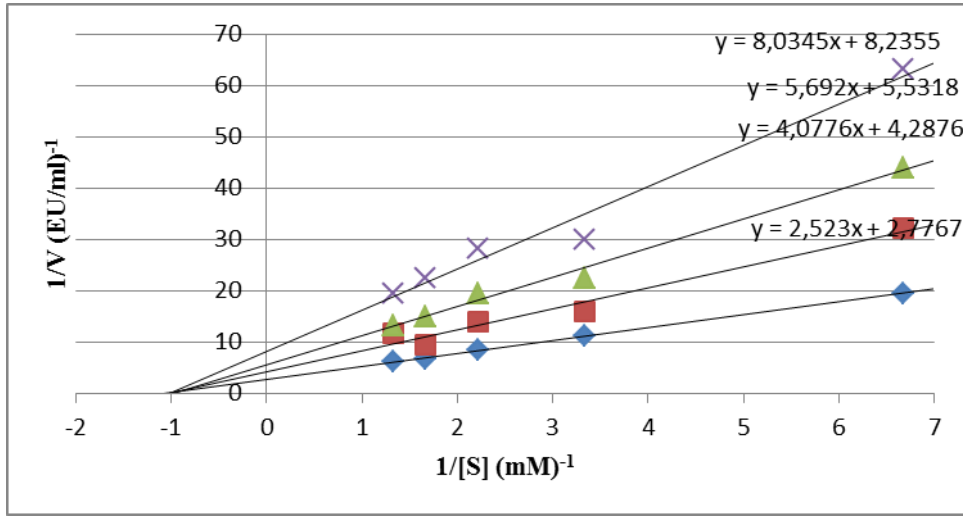
Şekil 4.2.16. hCA II enzimi üzerine **8h** nolu organik bileşiği için çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, □ = 30 mM, △ = 60 mM, X = 100 mM)

Çizelge 4.2.9. hCA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine **8i** nolu organik madde ile yapılan çalışmalarda kullanılan çözelti miktarları, bunlara karşılık gelen **8i** iyonu konsantrasyonları ve % aktivite değerleri

Substrat (µl)	Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim (µl)	Saf su (µl)	Toplam Hacim (µl)	[I] (mM)	% Aktivite
360	400	20	220	1000	—	100.00
360	400	20	140	1000	0.8	62.50
360	400	20	130	1000	0.9	55.66
360	400	20	120	1000	1.0	48.25
360	400	20	110	1000	1.1	43.25
360	400	20	100	1000	1.2	33.45



Şekil 4.2.17 . hCA I I enzimi için 6 farklı **8i** konsantrasyonunda elde edilen % Aktivite-[**8i**] grafiği



Şekil 4.2.18. hCA II enzimi üzerine **8i** nolu organik bileşiğin etkisi çizilen Lineweaver-Burk grafiği (□ = Kontrol, ■ = 20 mM, ▲ = 60 mM, X = 100 mM)

Çizelge 4.3.1. hCA I enzimi üzerine **8a** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ tamponu (µl)	Enzim Hacmi (µl)	Saf su (µl)	Substrat Hacmi (µl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (µl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000

Çizelge 4.3.2. hCA I enzimi üzerine **8b** nolu organik bileşimin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.3. hCA I enzimi üzerine **8c** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO ₄ tamponu (μ l)	Enzim Hacmi (μ l)	Saf su (μ l)	Substrat Hacmi (μ l)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μ l)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.4. hCA I enzimi üzerine **8d** nolu organik bileşimin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.5. hCA I enzimi üzerine **8e** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.6. hCA I enzimi üzerine **8f** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.7. hCA I enzimi üzerine **8g** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.8. hCA I enzimi üzerine **8h** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.3.9. hCA I enzimi üzerine **8i** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.4.1. hCA II enzimi üzerine **8a** nolu organik bileşimin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	515	50	0.15	1.5	1000
400	20	505	50	0.15	2.5	1000
400	20	495	50	0.15	3.5	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	415	100	0.30	1.5	1000
400	20	405	100	0.30	2.5	1000
400	20	395	100	0.30	3.5	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	365	150	0.45	1.5	1000
400	20	355	150	0.45	2.5	1000
400	20	345	150	0.45	3.5	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	315	200	0.60	1.5	1000
400	20	305	200	0.60	2.5	1000
400	20	295	200	0.60	3.5	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	265	250	0.75	1.5	1000
400	20	255	250	0.75	2.5	1000
400	20	245	250	0.75	3.5	1000

Çizelge 4.4.2. hCA II enzimi üzerine **8b** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	515	50	0.15	1.5	1000
400	20	505	50	0.15	2.5	1000
400	20	495	50	0.15	3.5	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	415	100	0.30	1.5	1000
400	20	405	100	0.30	2.5	1000
400	20	395	100	0.30	3.5	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	365	150	0.45	1.5	1000
400	20	355	150	0.45	2.5	1000
400	20	345	150	0.45	3.5	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	315	200	0.60	1.5	1000
400	20	305	200	0.60	2.5	1000
400	20	295	200	0.60	3.5	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	265	250	0.75	1.5	1000
400	20	255	250	0.75	2.5	1000
400	20	245	250	0.75	3.5	1000

Çizelge 4.4.3. hCA II enzimi üzerine **8c** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	495	50	0.15	30	1000
400	25	475	50	0.15	50	1000
400	25	465	50	0.15	60	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	395	100	0.30	30	1000
400	25	375	100	0.30	50	1000
400	25	365	100	0.30	60	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	345	150	0.45	30	1000
400	25	325	150	0.45	50	1000
400	25	315	150	0.45	60	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	295	200	0.60	30	1000
400	25	275	200	0.60	50	1000
400	25	265	200	0.60	60	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	245	250	0.75	30	1000
400	25	225	250	0.75	50	1000
400	25	215	250	0.75	60	1000

Çizelge 4.4.4. hCA II enzimi üzerine **8d** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	515	50	0.15	1.5	1000
400	20	505	50	0.15	2.5	1000
400	20	495	50	0.15	3.5	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	415	100	0.30	1.5	1000
400	20	405	100	0.30	2.5	1000
400	20	395	100	0.30	3.5	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	365	150	0.45	1.5	1000
400	20	355	150	0.45	2.5	1000
400	20	345	150	0.45	3.5	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	315	200	0.60	1.5	1000
400	20	305	200	0.60	2.5	1000
400	20	295	200	0.60	3.5	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	265	250	0.75	1.5	1000
400	20	255	250	0.75	2.5	1000
400	20	245	250	0.75	3.5	1000

Çizelge 4.4.5. hCA II enzimi üzerine **8e** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	515	50	0.15	1.5	1000
400	20	505	50	0.15	2.5	1000
400	20	495	50	0.15	3.5	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	415	100	0.30	1.5	1000
400	20	405	100	0.30	2.5	1000
400	20	395	100	0.30	3.5	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	365	150	0.45	1.5	1000
400	20	355	150	0.45	2.5	1000
400	20	345	150	0.45	3.5	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	315	200	0.60	1.5	1000
400	20	305	200	0.60	2.5	1000
400	20	295	200	0.60	3.5	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	265	250	0.75	1.5	1000
400	20	255	250	0.75	2.5	1000
400	20	245	250	0.75	3.5	1000

Çizelge 4.4.6. hCA II enzimi üzerine **8f** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	520	50	0.15	0.1	1000
400	20	500	50	0.15	0.3	1000
400	20	480	50	0.15	0.5	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	420	100	0.30	0.1	1000
400	20	400	100	0.30	0.3	1000
400	20	380	100	0.30	0.5	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	370	150	0.45	0.1	1000
400	20	350	150	0.45	0.3	1000
400	20	330	150	0.45	0.5	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	320	200	0.60	0.1	1000
400	20	300	200	0.60	0.3	1000
400	20	280	200	0.60	0.5	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	270	250	0.75	0.1	1000
400	20	250	250	0.75	0.3	1000
400	20	230	250	0.75	0.5	1000

Çizelge 4.4.7. hCA II enzimi üzerine **8g** nolu organik bileşimin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	25	525	50	0.15	-	1000
400	25	505	50	0.15	2	1000
400	25	495	50	0.15	3	1000
400	25	465	50	0.15	6	1000
400	25	425	100	0.30	-	1000
400	25	405	100	0.30	2	1000
400	25	395	100	0.30	3	1000
400	25	365	100	0.30	6	1000
400	25	375	150	0.45	-	1000
400	25	355	150	0.45	2	1000
400	25	345	150	0.45	3	1000
400	25	315	150	0.45	6	1000
400	25	325	200	0.60	-	1000
400	25	305	200	0.60	2	1000
400	25	295	200	0.60	3	1000
400	25	265	200	0.60	6	1000
400	25	275	250	0.75	-	1000
400	25	255	250	0.75	2	1000
400	25	245	250	0.75	3	1000
400	25	215	250	0.75	6	1000

Çizelge 4.4.8. hCA II enzimi üzerine **8h** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	515	50	0.15	1.5	1000
400	20	505	50	0.15	2.5	1000
400	20	495	50	0.15	3.5	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	415	100	0.30	1.5	1000
400	20	405	100	0.30	2.5	1000
400	20	395	100	0.30	3.5	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	365	150	0.45	1.5	1000
400	20	355	150	0.45	2.5	1000
400	20	345	150	0.45	3.5	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	315	200	0.60	1.5	1000
400	20	305	200	0.60	2.5	1000
400	20	295	200	0.60	3.5	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	265	250	0.75	1.5	1000
400	20	255	250	0.75	2.5	1000
400	20	245	250	0.75	3.5	1000

Çizelge 4.4.9. hCA II enzimi üzerine **8i** nolu organik bileşiğin K_i değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları

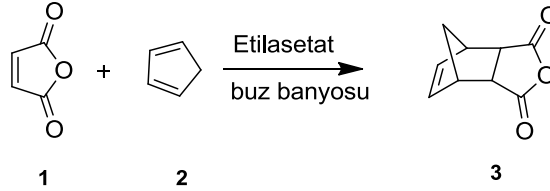
Tris-SO₄ tamponu (μl)	Enzim Hacmi (μl)	Saf su (μl)	Substrat Hacmi (μl)	Küvetteki substrat konst. (mM)	Küvetteki inhibitör konst. (mM)	Toplam Hacim (μl)
400	20	530	50	0.15	-	1000
400	20	520	50	0.15	10	1000
400	20	500	50	0.15	30	1000
400	20	490	50	0.15	40	1000
400	20	430	100	0.30	-	1000
400	20	420	100	0.30	10	1000
400	20	400	100	0.30	30	1000
400	20	390	100	0.30	40	1000
400	20	380	150	0.45	-	1000
400	20	370	150	0.45	10	1000
400	20	350	150	0.45	30	1000
400	20	340	150	0.45	40	1000
400	20	330	200	0.60	-	1000
400	20	320	200	0.60	10	1000
400	20	300	200	0.60	30	1000
400	20	290	200	0.60	40	1000
400	20	280	250	0.75	-	1000
400	20	270	250	0.75	10	1000
400	20	250	250	0.75	30	1000
400	20	240	250	0.75	40	1000

Çizelge 4.5. İnsan kanı eritrosit hücrelerinden elde edilen hCA I ve h CA II izoenzimlerinin 9 farklı organik bileşik için Ki ve IC₅₀ değerleri

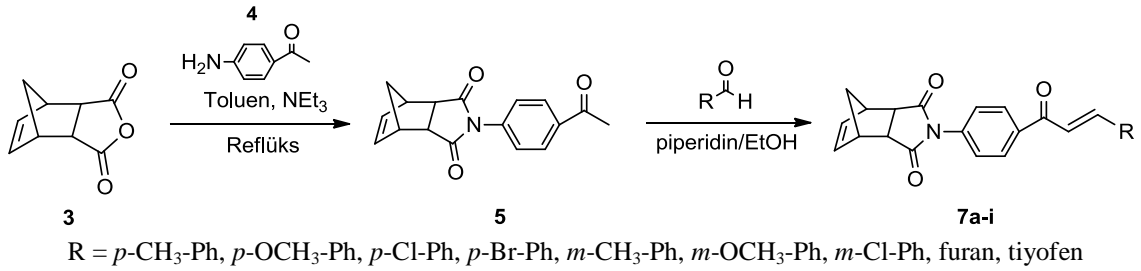
Organik Madde	IC ₅₀ (nM)				K _I (nM)	
	hCA I	r ²	hCA II	r ²	hCA I	hCA II
8a	14.1428	0.9701	12.600	0.9736	11.304±2.016	11.4473±2.508
8b	15.75	0.9634	11.745	0.9729	18.2632±7.303	10.9855±0.726
8c	16.5	0.9546	9.625	0.9935	15.1763±3.14	8.2099±1.62
8d	13.5882	0.9694	11.004	0.9727	13.094±4.487	12.865±1.98
8e	15.6971	0.9566	11.898	0.9541	15.709±4.12	10.114±0.785
8f	18.2368	0.9824	11.177	0.9911	17.507±3.728	9.615±0.456
8g	16.1162	0.9863	12.157	0.9892	17.9081±4.13	12.4556±3.182
8h	14.4375	0.9676	12.375	0.9796	16.4189±3.676	10.0206±1.907
8i	18.7297	0.9664	11.948	0.9965	21.2215±5.63	9.2196±2.22
AZA	40.4592	0.9996	24.160	0.993	34.5043±0.015	28.9279±0.053

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

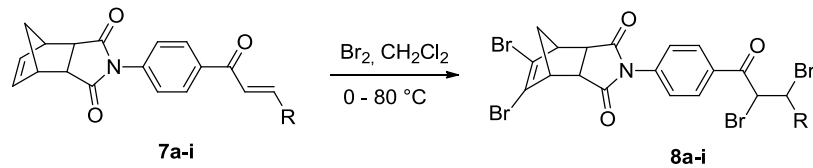
Çalışmamızda ilk önce, Diels-Alder tepkimesi ile 1,3-siklopentadien ve maleikanhidrit'in katılma reaksiyonu gerçekleştirildi. Yapısı spektroskopik analizler ve literatür bilgilerinden faydalanılarak aydınlatıldı.



Çalışmanın ikinci kademesinde ise Diels-Alder katılma ürünü ile altı farklı benzaldehit türevinin Claisen-Schmidt kondenzasyonu sonucunda farklı substitüentlere sahip kalkon birimi içeren bileşikler sentezlendi. İlgili bileşikler metilen klorürde çözüldü ve üzerine piperidin ilave edilerek 24 saat reflüks işlemi uygulaması yapıldı.



Çalışmanın bu aşamasında; saf olarak elde edilen kalkon türevlerine brom katılma reaksiyonları gerçekleştirildi. Bunun için ilgili kalkon bileşiği metilenklorürde çözüldü. Metilenklorür üzerine alınan Br₂ damla damla ilave edildi. Reaksiyon esnasında HBr gazı çıkışı olduğu için kurutucu başlığında gaz çıkışı tutuldu. Reaksiyon oda koşullarında 24 saat manyetik olarak karıştırıldı. 24 saat sonrasında ekstraksiyon yapıldı. Kristallendirme işlemi sonucu madde saf olarak elde edildi.



R = *p*-OCH₃Ph, *p*-CH₃Ph, *p*-ClPh, *p*-BrPh, *m*-CH₃Ph, *m*-OCH₃Ph, *m*-ClPh, 2-furan, 2-tiyofen

Projede sentezi gerçekleştirilen katılma ürünlerinin yapıları spektroskopik analizler ve literatür bilgilerinden faydalanılarak aydınlatıldı. Bu çalışma sonucunda elde edilen Brom katılma ürünleri ilk defa sentezlenmiş oldu.

Ayrıca elde edilen kalkon türevlerinin insan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine etkileri araştırıldı. Günümüzde bilinen birçok hCA enzimi inhibitörleri sentezlenmiştir. Bu enzimler manyetik rezonans ve nörolojik rahatsızlıkların belirlenmesinde, ağrı kesici, anti ülser gibi ilaçların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. hCA izoenzimleri ile ilgili yapılan inhibisyon çalışmalarında dokulardaki dağılımı ve çok önemsenen hayati fonksiyonlarının aydınlatılması sağlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızın ikinci kısmında ise kalkon türevlerinin insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine *in vitro* etkisi araştırıldı. Bunun için öncelikle hCA I ve hCA II izoenzimleri sırasıyla Sepharose-4B-L-Tirozin sülfanamit afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kalkon türevlerinin hCA I ve hCA II üzerine inhibisyon etkileri esteraz aktivitesi kullanılarak değerlendirildi. Sentezlenen kalkon türevlerinin hCA I için 13.094-34.504 μM arasında ve hCA II için de 8.209 – 28.927 μM arasında K_i değerlerine sahip oldukları gözlemlendi. Aynı şekilde bu kalkon türevlerinin hCA I için 0.9546- 0.9996 μM arasında ve hCA II için de 0.9541- 0.9965 μM arasında IC_{50} değerlerine sahip oldukları gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar toplu halde çizelge 4.5.te verilmiştir. Kalkon türevlerinin tamamı hem hCA I hem de hCA II için yarışmasız inhibisyon göstermiştir.

6. KAYNAKLAR

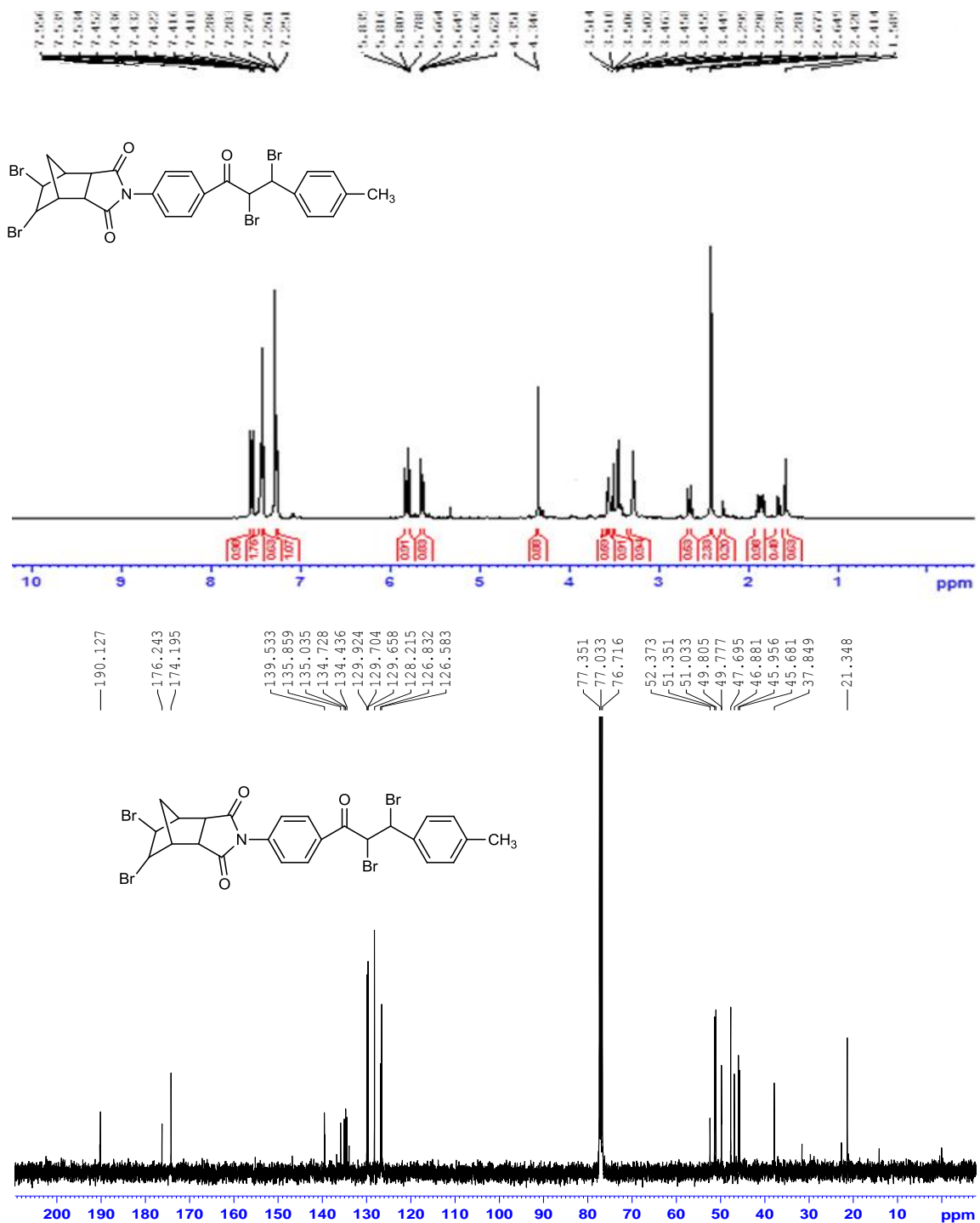
- Ankhiwala, M. D., 1990. Studies on Flavonoids, Part II, Synthesis and antimicrobial Activity of 8-bromo-7-n-butoxy-6-nitro-flavones, -flavonols, -flavanones. Journal of the Indian Chemical Society,(67), 913-915. Kumar, S.K., Erin H., Catherina P., Gurulingappa, H., Davidson, N. E. ve Khan, S. R., 2003. Design, Synthesis, And Evaluation Of Novel Boronic-Chalcone Derivatives As Antitumor Agents. J. Med. Chemistry, 46, 2813-2815.
- Antunes, R., Batista H., Srivastava R., Thomas G., and Araujo C., "New phthalimide derivatives with potent analgesic activity: II," Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, vol. 8, no. 21, pp. 3071–3076, 1998.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. and Supuran, C.T., 2005. Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity in vitro and rat erythrocytes in vivo. Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry, 20, 35-39.
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., 2004. Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19, 193-197.
- Budak, Y., Ceylan, M., 2009. Chinese Journal of Chemistry,(27), 1575-1581.
- Burt, E., Darlington, M.V., Graf, G., Meyer, H.J., 1992. Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 22, 285-291.
- Bülbül, M., Hisar, R.O., Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2003. The in vitro and in vivo inhibitory effects of some sulfonamide derivatives on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte carbonic anhydrase activity. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 18, 371-375.
- Calo, V., Lopez, L., Valentino, D.S., 1978. Synthesis., 139
- Chandrasekhar S, Thakhi M, Uma G., 1997. Solvent free N-alkyl and N-arylimides preparation from anhydrides catalyzed by TaCl₅-Silica gel. Tetrahedron Lett;38(46): 80-89- 92.
- Christie, K.N., Thomson, C., Xue, L.Z., Lucocq, J.M., Hopwood, D., 1997. Carbonic anhydrase isoenzymes I, II, III, and IV are present in human esophageal epithelium. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45, 35-40.
- Correa, R, Filho VC, Rosa PW, Pereira CI, Schlemper V, Nunes RJ., 1997. Synthesis of new succinimides and sulphonated derivatives with analgesic action in mice. Pharm Pharmacol Comm;3(2):67-71.
- Crider, AM, Kolczynski TM, Yates KM., 1980. Synthesis and anticancer activity of nitrosourea derivatives of phensuximide. J Med Chem;23(3):324-6.
- Celik, C, Kulu I, Ocal N, Dieter E. Kaufmann., 2009. Domino-*Heck* Reactions of Carba- and Oxabicyclic, Unsaturated Dicarboximides: Synthesis of Aryl-Substituted, Bridged Perhydroisoindole Derivatives. Helvetica Chimica Acta Volume 92, Issue 6, pages 1092–1101.
- Duckie, S., Forrest R., Hadfield J.A., Kendall A., Lawrence N.J., MCGOWN A.T. ve Rennison D., 1998. Potent Antimitotic and Cell Growth Inhibitory Properties of Substituted Chalcones. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 8, 1051-1056.

- Ertürk, F., 2014. 6-(4-(1-asetil-5-aril-4,5-dihidro-1H-pirozol-3-il)fenil)-3-metil-4,4a,8,8a-tetrahidro-3aH-4,8-metanoisoksazol[4,5-f]isoindol-5,7(6H,7aH)-dion türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi.(Yükseklisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya- Tokat.
- Fayed, T. A. ve Awad, M. K., 2004. Dual Emission of Chalcone-Analogue Dyes Emitting in the Red Region. *Chemical Physics*, 303, 317-326.
- Filho, VC, Nunes RJ, Calixto JB, Yunes RA., 1995. Inhibition of Guinea-pig ileum contraction by phyllanthimide analogues: Structure-activity relationships. *Pharm Pharmacol Comm*, 1(8):399-401.
- Hall, G.E., Schraer, R., 1983. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of salmo gairdneri. *Comparative. Biochemistry and Physiology-B*, 75, 81-92.
- Hargreaves, MK, Pritchard, JG, Dave, HR., 1970. Cyclic carboxylic monoimides. *Chem Rev*, 70(4):439-69), (Patil, M. M., Rajput, S. S., 2014. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol 6, Issue 11, 8-14.)
- Hazra BG, Pore VS, Day SK, Datta S, Darokar MP, Saikia D, *et al.*, 2004. Bile acid amides derived from chiral amino alcohols: novel antimicrobials and antifungals. *Bioorg Med Chem Lett*,14(3):773-7.
- Herencia, F., Ferrandiz, M. L., Ubeda, A., Dominguez, J. N., Charris, J. E., Lobo, G. M. ve Alcaez, M. J., 1998. Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Chalcone Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8, 1169-1174
- Inukain, N., Iwamoto, H., 1976. *Chem.Pharm.Bull.Japan.*, 24,820
- Jiu-Hong Wu, Xi-Hong Wang, Yang-Hua Yi and Kuo-Hsiung Lee., 2003. Anti-AIDS Agents 54. A Potent Anti-HIV Chalcone and Flavonoids from Genus *Desmos*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,13 , 1813–1815.
- Johnston TP, Piper JR, Stringfellow CR., 1971. Terminal dicarboximido analogs of S-2-omega.-aminoalkylamino) ethyl dihydrogen phosphorothioates and related compounds as potential antiradiation agents. 2. Succinimides, glutarimides, and cis-1,2-cyclohexanedicarboximides. *J Med Chem*, 14 (4) : 350-4.
- Kaczorowski GJ, McManus OB, Priest BT, Garcia ML., 2008. Ion channels as drug targets: The next GPCRs. *J Gen Physiol* ,131(5):399-405.
- Keilin, D., Martin, T., 1944. Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107-108.
- Khalil A., Berghot M., and Gouda M., 2010. Synthesis and study of some new 1, 3-isoindole-dione derivatives as potential antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45,no. 4, pp. 1552–1559,
- Kornet MJ, Crider AM, Magarian EO. Potential long-acting anticonvulsants. *J Med Chem* 1977;20(3):405-9.
- Krungkrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., Krungkrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in plasmodium falciparum. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Lin, Y. M., Zhou, Y., Flavin, M. T., Zhou, L. M., Nie, W. ve Chen, F. C., 2002. Chalcones and Flavonoids as Anti-Tuberculosis Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (10), 2795-2802.
- Lionetto, M.G., Giordano, M.E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquatic Toxicology*, 48, 561-571.

- Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A. T., Correa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E. C., Assreuy, J., Calixto, J. B. ve Santos, A. R. S., 2003. Tripanocidal and Leishmanicidal Properties of Substitution-Containing Chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47,1449-1451.
- Lonnerholm, G., Selking, O., Wistrand, P.J., 1985. Amount and distribution of carbonic-anhydrases CA-I and CA-II in the gastrointestinal-tract. *Gastroenterology*, 88, 1151-1161.
- March, J., 1987. *Advanced Organic Chemistry*, Third ed., McGraw Hill, New York, 659.
- Martin SF, Limberakis C., 1997. Diprotection of primary amines as N-substituted-2,5-bis[(triosopropylsilyl)oxy]pyrroles (BIPSOP). *Tetrahedron Lett*, 38(15):2617-20.
- Meldrum, N.N., Roughton, F.J.F., 1933. Carbonic Anhydrase, Its preparation and properties. *Nature*, 80, 113-142.
- Mrisra, S. S. & Tenari, R. S. (1973). *J. Indian Chem. Soc*, 50, 68–70.
- Mukherjee, S.,Kumar, V., Prasad, A.K., Raj, H.G., Bracke, M.E., Olsen, C.E., Jain, S. C. ve Parmar, V.S., 2001. Synthetic And Biological Activity Evaluation Studies on Novel 1,3-Diarylpropenones. *Bioorg.Med.Chem*,9,337-345.
- Musso DL, Cochran FR, Kelley JL, McLean EW, Selph JL, Rigdon GC, *et al.*, 2003. Design and synthesis of (E)-2-(4,6-Difluoro-1-indanylidene)acetamide, a potent, centrally acting muscle relaxant with antiinflammatory and analgesic activity. *J Med Chem*, 46(3):399-408.
- Parkkila, S., Parkkila, A.K., 1996. Carbonic anhydrase in the alimentary tract-roles of the different isozymes and salivary factors in the maintenance of optimal conditions in the gastrointestinal canal. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31, 305-317.
- Pennington FC, Guercio PA, Solomons I A., 1953. The antihypertensive effect of a selective central muscarinic cholinergic antagonist: N-(4-diethylamino-2-butynyl)-succinimide. *J Am Chem Soc*, 75(9):2261-1.
- Pitchumani, K., Velusamy, P., Sabithamala, S., Srinivasan, C., 1994. Modification of chemical reactivity upon cyclodextrin encapsulation: Asymmetric bromination of chalcone and benzylideneacetone. *Tetrahedron*,50, 7903.
- Rajput AP, Rajput SS., 2007. Preparation and antimicrobial activity of 2,5-dichloro-3,4-diformyl-(N-substituted phenyl)Pyroles. *Asian J Chem*, 19(6):4939-41.
- Raisanen, S.R., Lehenkari, P., Tasanen, M., Rahkila, P., Harkonen, P.L., Vaananen, H.K., 1999. Carbonic Anhydrase III protects cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis. *FASEB Journal*, 13, 513-522.
- Raddy PY, Kondu S, Toru T, Ueno Y., 1997. Lewis Acid and Hexamethyldisilazane promoted efficient synthesis of N-alkyl-and N-arylimide derivatives. *J Org Chem*, 62(8):26524.
- Rao, Y. K., Fang, S. H. ve Tzeng, Y. M., 2004. Differential Effects of Synthesized 2' Oxyaneted Chalcone Derivatives: Modulation of Human Cell Cycle Phase Distribution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (12), 2679-2686.
- Rich DH, Gardner JH., 1983. Synthesis of the cytostatic cyclic tetrapeptide, chlamydocin. *Tetrahedron Lett*, 24(48):5305-8
- Rolf, V.H., Wellinga, K. ve Grosscurt, C., 1978. 1-Phenylcarbomoyl-2-Pyrazolines: a New Class Of Insecticides. 2.Synthesis and Insecticidal Properties of 3,5- Diphenyl-1-Phenylcarbomoyl-2-Pyrazolines. *J. Agric. Food. Chem*, 28, 915-918

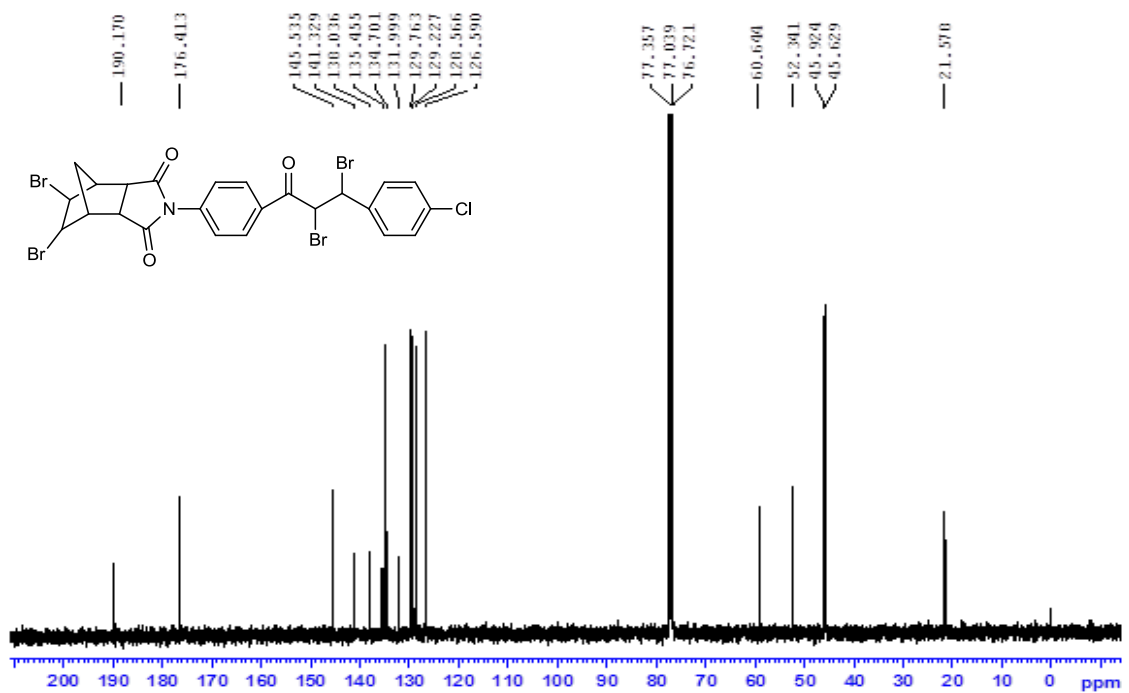
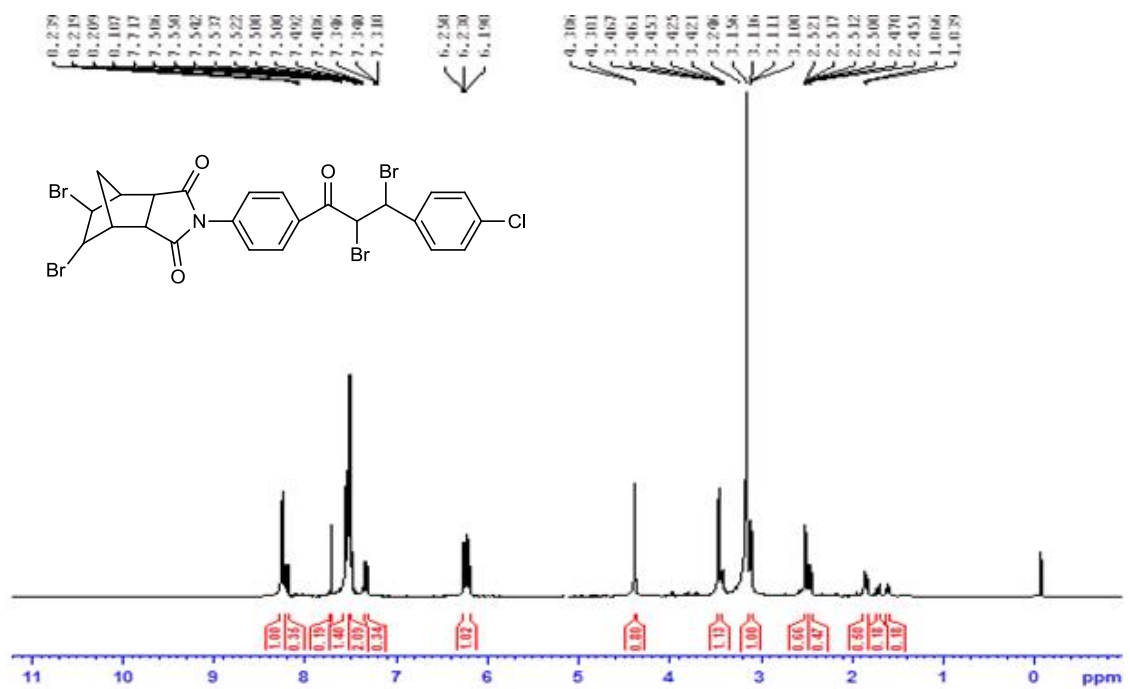
- Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T., 2006. Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16, 1627-1664.
- Shunmugam R., Mane S. R., Rao N. V., 2012. Reversible pH- and Lipid-Sensitive Vesicles from Amphiphilic Norbornene-Derived Thiobarbiturate Homopolymers. *ACS Macro Letters*, 1, 482-488.
- Singh J., Singha T., Naskar A., Kundu M., and Kumar R., 2011. "Synthesis and Antiproliferative Activity of Some Isoindoline-1, 3-Dione Derivatives Against Ehrlich's Ascites Carcinoma Bearing Mice Model," *Pharmacologyonline*, 2, 976-987
- Stotter, P.L., Hill, K.A., 1973. *J.Org.*, 40,2976.
- Suetsugu, K., Tomita, S., 1987. *Jpn. Kohai Tokkyo JP*, 62, p. 158- 206
- Upadhyay SK, Pingali SRK, Jursic BS., 2010. Comparison of microwave-assisted and conventional preparation of cyclic imides. *Tetrahedron Lett*, 51(17):2215-7.
- Yasui, H., Nagaoka, N., Mike, A., Hayakawa, K., and Ohwaki, M., 1992. Detection of Bifidobacterium stains that induce large quantities of IgA. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* (5), 155-162.
- Walker MA., 1995. A high yielding synthesis of N-alkyl maleimides using a novel modification of the Mitsunobu reaction. *J Org Chem*, 60(16):5352-5. 24.

7.EKLER



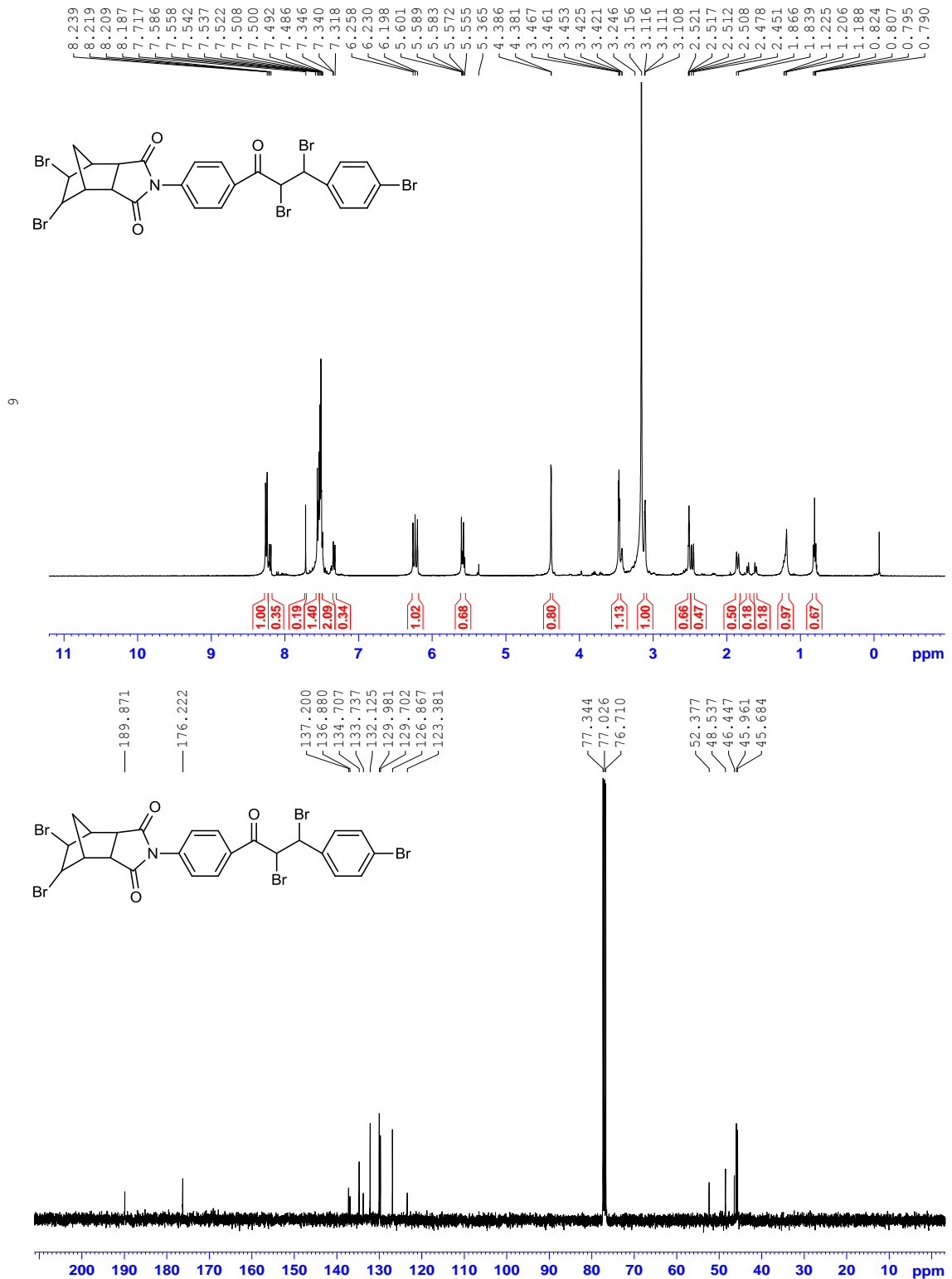
Şekil 7.1. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(p-toli)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(**8b**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



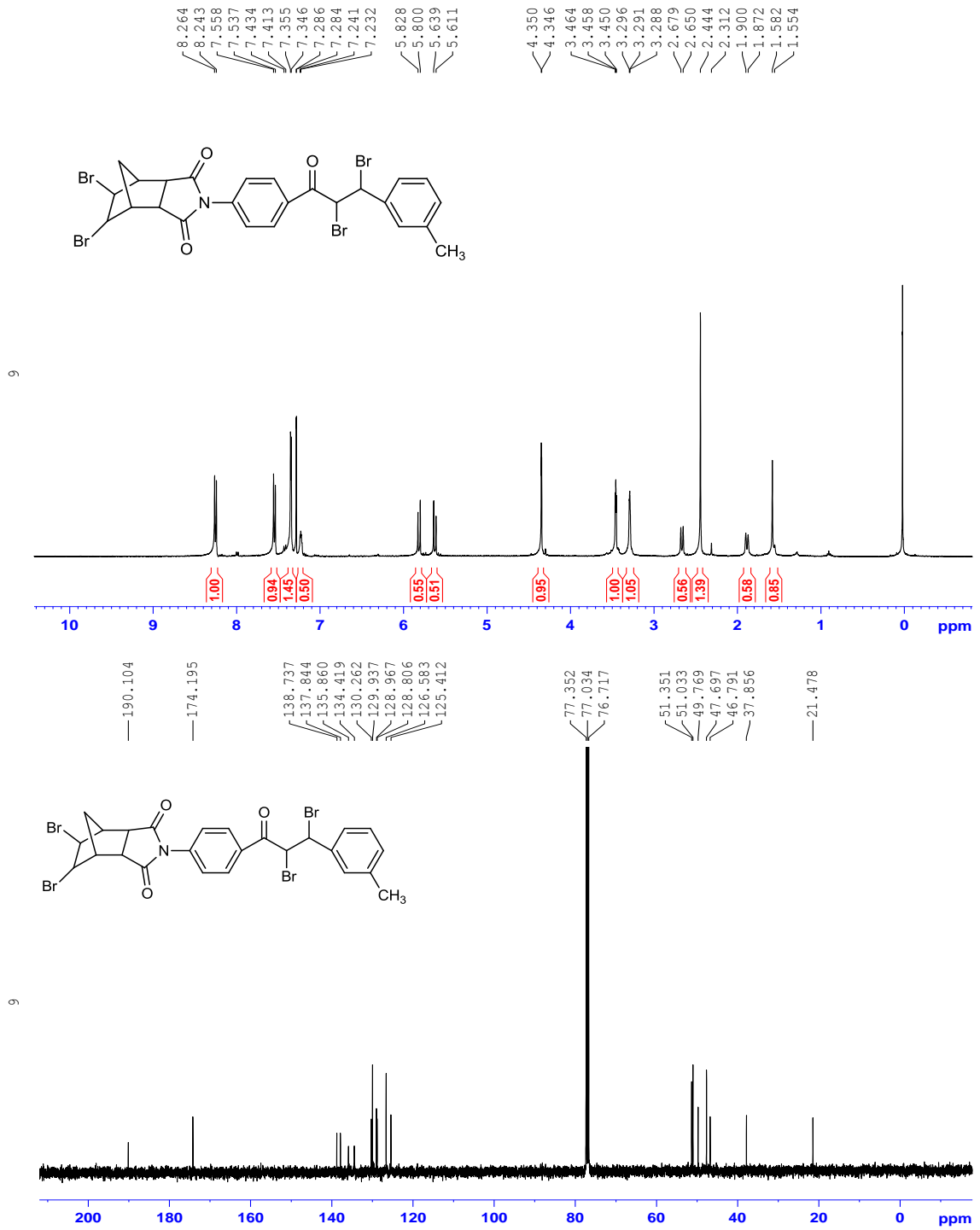
Şekil 7.2. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-klorofenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(**8c**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



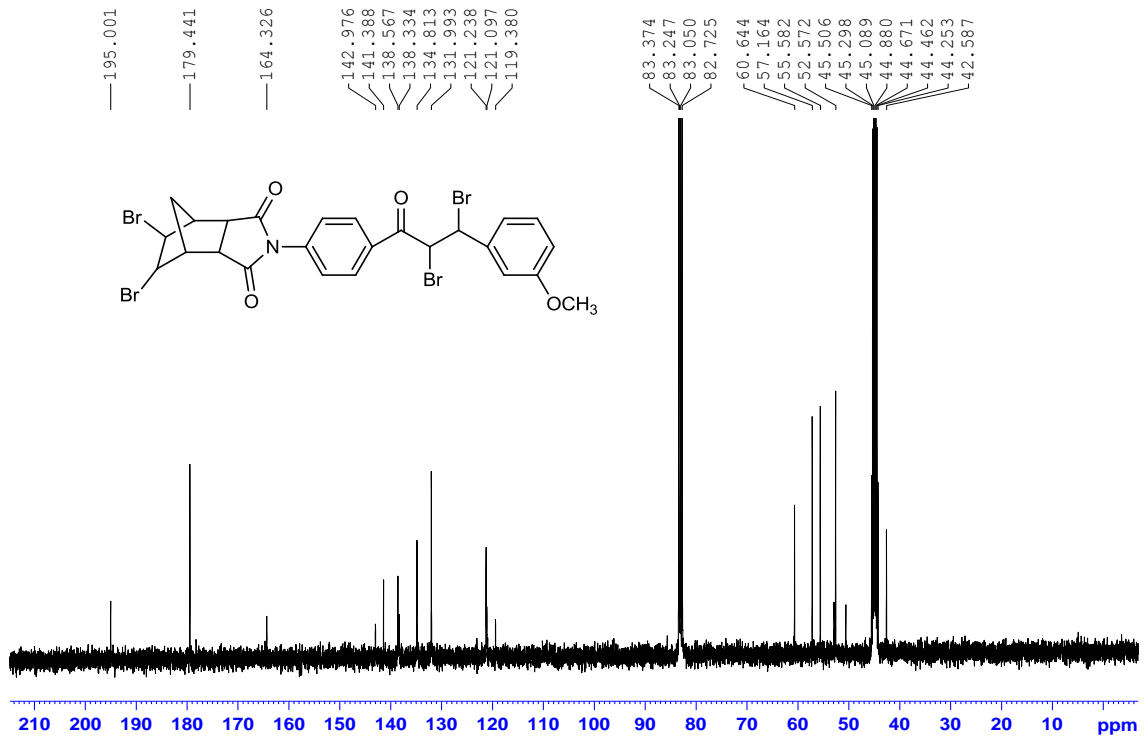
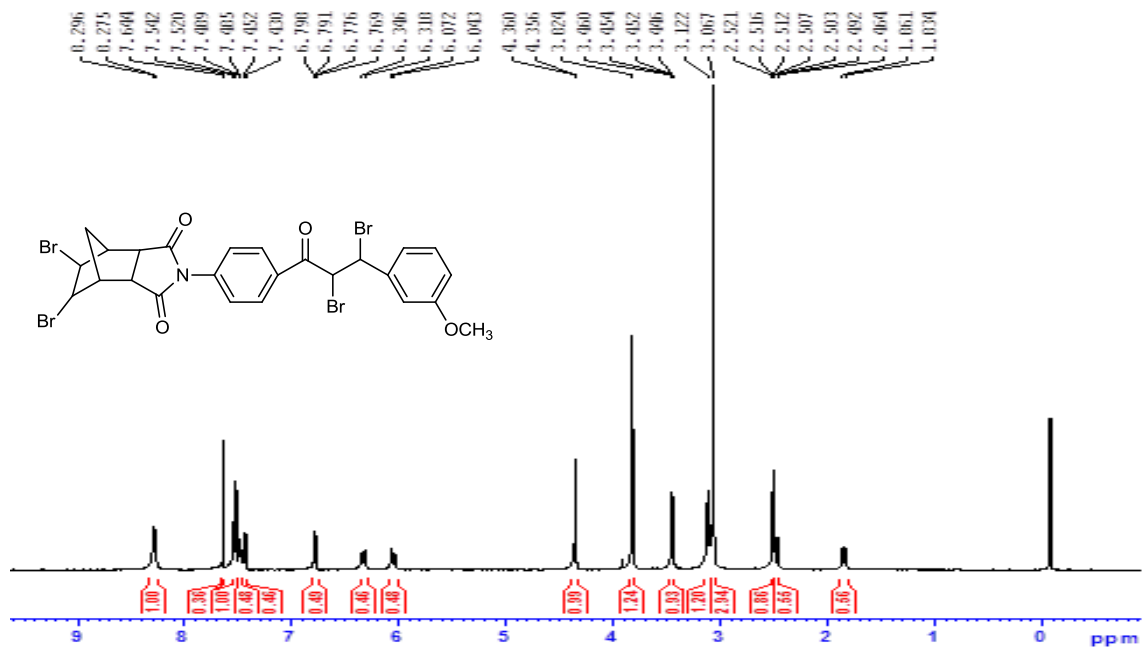
Şekil 7.3. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(4-bromofenil)propanoil)fenil)hekzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion (**8d**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



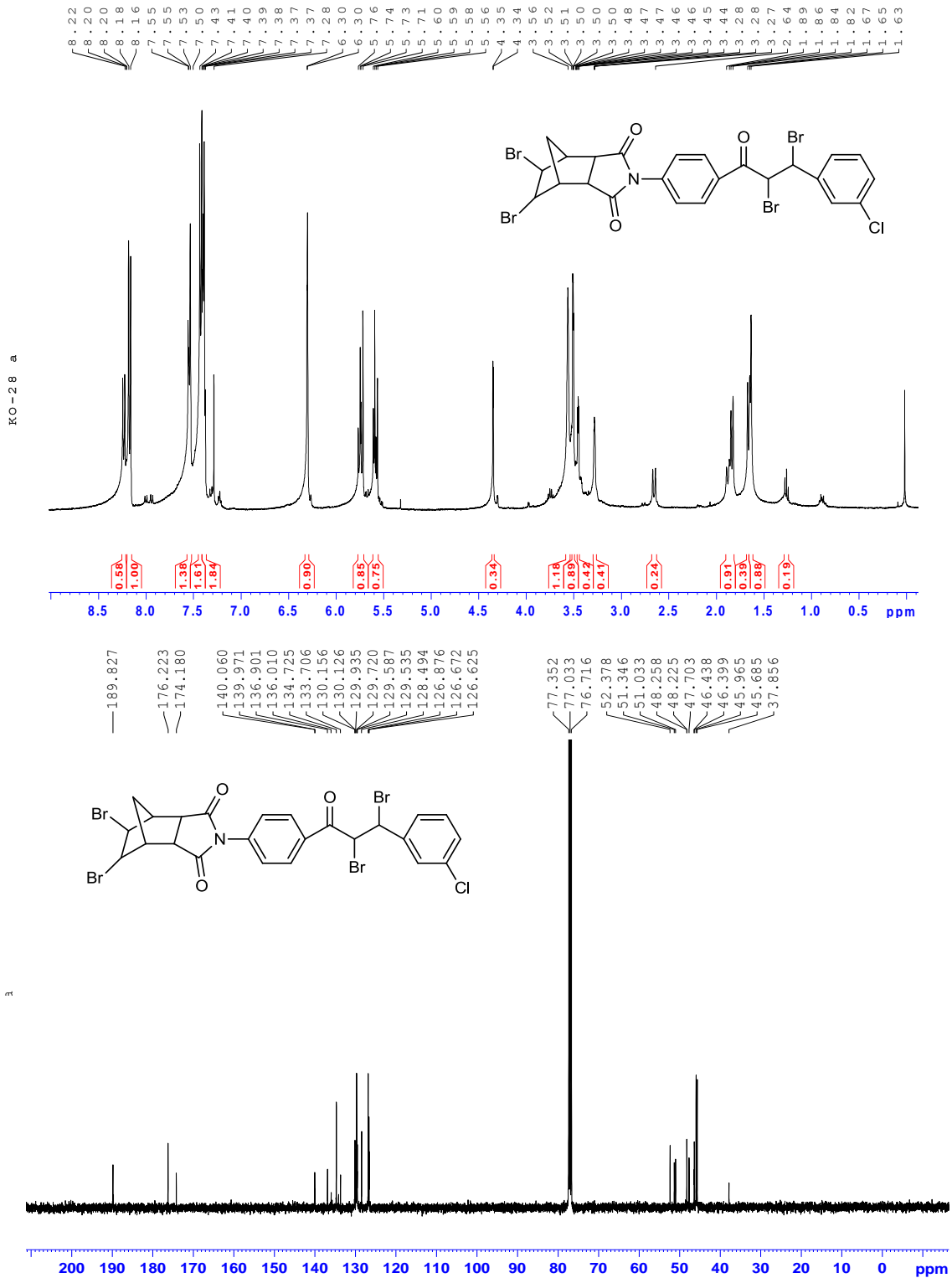
Şekil 7.4. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(3-metoksifenil)propanoil)fenil)hekzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(**8e**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



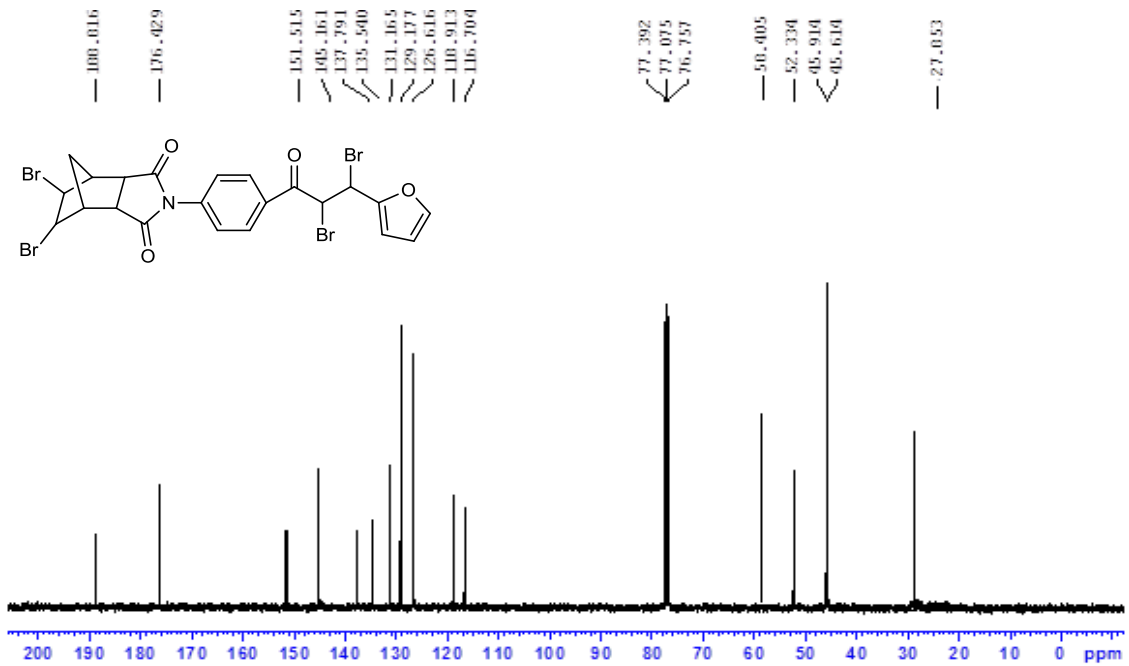
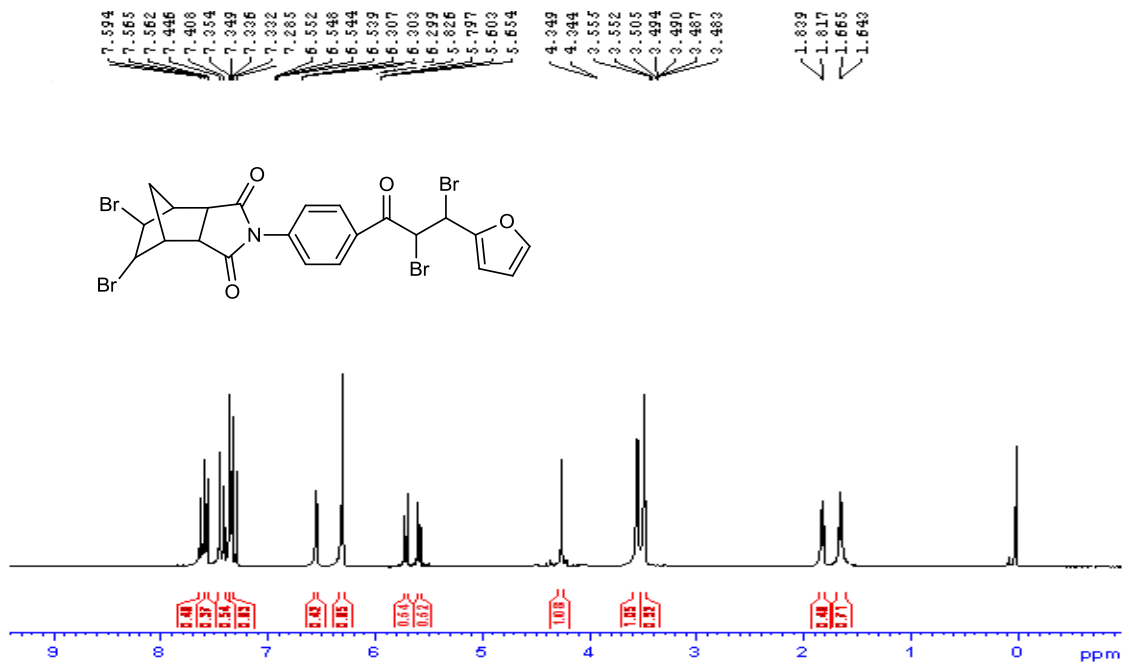
Şekil 7.5. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(3-metoksifenil)propanoil)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion (**8f**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



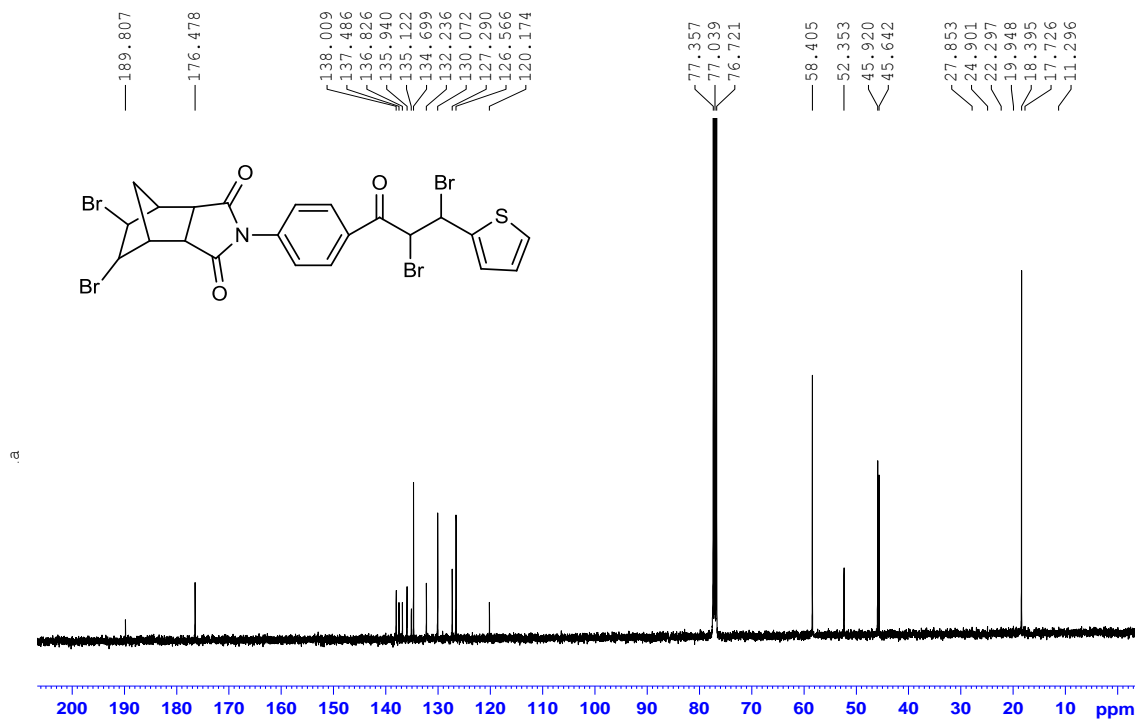
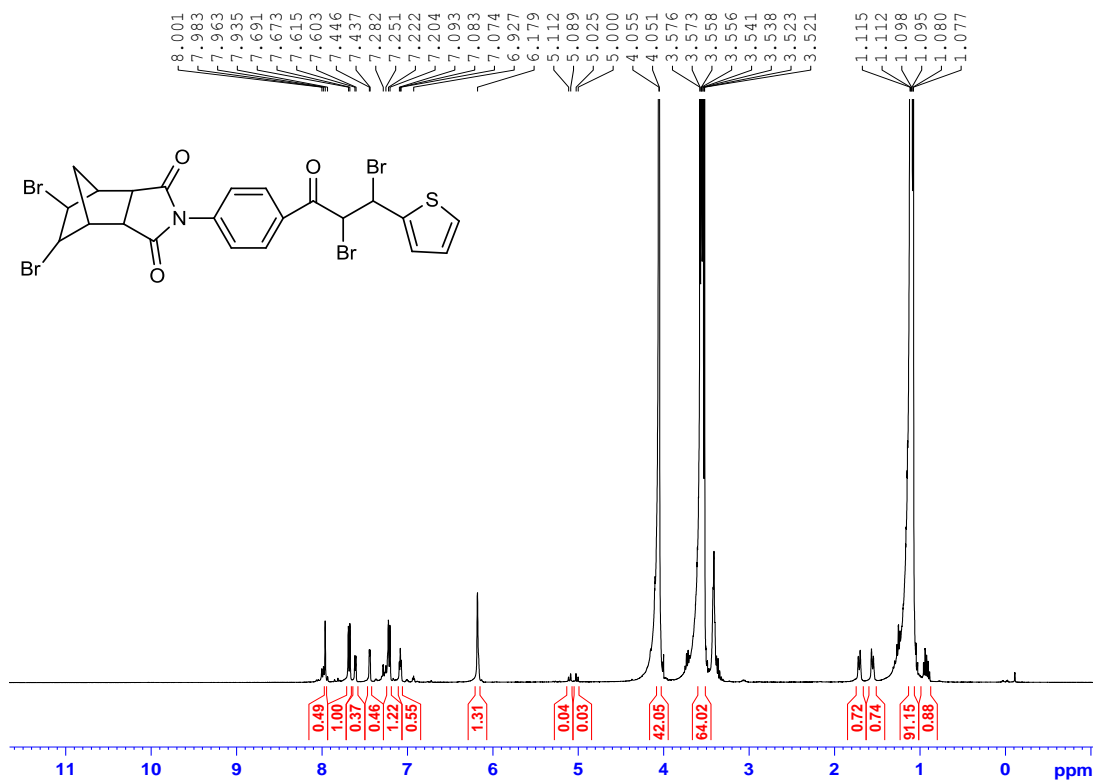
Şekil 7.6. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(3-klorofenil)propanoil)phenyl)heksahidro-1H-4,7-metanoisoindol-1,3(2H)-dion (**8g**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



Şekil 7.7. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(furan-2-il)propanoil)fenil)hekzahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion(**8h**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)



Şekil 7.8. (3aR,4S,5S,7R,7aS)-5,6-dibromo-2-(4-(2,3-dibromo-3-(tiyofen-2-il)propano-il)fenil)heksahidro-1H-4,7-metanoisindol-1,3(2H)-dion (**8i**)

a) 400 MHz ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃) b) 400 MHz ¹³C-NMR spektrumu (CDCl₃)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Fikret ELİGÜZEL

Doğum Tarihi ve Yeri: 24.01.1970 / Turnalı

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Telefon: 505 713 11 41

E-mail: fikreteliguzel@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Yılı
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı - TOKAT	2010
Lisans	Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği	1989-1993
Lise	Sivas Kongre Lisesi	1984-1987