

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3-AMİNO-5-ARİL-RHODANİN TÜREVLERİNİN ÇÖZÜCÜ
KONTROLLÜ BÖLGESEL SEÇİCİ SENTEZİ VE İNSAN
KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (*hCA* I ve *hCA* II)
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU BİLEN ÖZER

KİMYA ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SİNAN BAYINDIR**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. CÜNEYT ÇAĞLAYAN**

BİNGÖL-2022

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3-AMİNO-5-ARİL-RHODANİN TÜREVLERİNİN ÇÖZÜCÜ
KONTROLLÜ BÖLGESEL SEÇİCİ SENTEZİ VE İNSAN
KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (*h*CA I ve *h*CA II)
ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU BİLEN ÖZER

KİMYA ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SİNAN BAYINDIR**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. CÜNEYT ÇAĞLAYAN**

BİNGÖL-2022



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**3-AMİNO-5-ARİL-RHODANİN TÜREVLERİNİN ÇÖZÜCÜ KONTROLLÜ
BÖLGESEL SEÇİCİ SENTEZİ VE İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİMLERİ (hCA I ve hCA II) ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Sinan BAYINDIR ve Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN danışmanlığında, Ebru BİLEN ÖZER tarafından hazırlanan bu çalışma/...../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu** (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ÇETİN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Ebru AKKEMİK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Sinan BAYINDIR

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve/
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması Bingöl Üniversitesi BÜBAP tarafından Bağımsız Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: BAP-FEF.2021.002

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

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın ortaya çıkmasına katkı sunan Bingöl Üniversitesi BÜBAP birimine (Bağımsız Araştırma Projeleri- Proje No: BAP-FEF.2021.002) çok teşekkür ederiz.

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvar çalışmalarımı yaparken desteklerini esirgemeyen Fen Edebiyat ve Veteriner Fakültesi yönetimlerine çok teşekkür ederiz.

Tez çalışmaları süresince yardımlarını ve bilgi birikimini esirgemeyen, tez yazım çalışmalarının ve deneysel çalışmaların tamamlanabilmesi için mesai kavramını bir kenara bırakarak gerekli desteği veren değerli danışman hocalarım Doç. Dr. Sinan BAYINDIR ve Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN'a çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarda ve moleküler analizlerin yapılmasında gösterdikleri sabır ve özverili çalışmalarından dolayı başta çalışma arkadaşım Kemal YARARLI olmak üzere tüm Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar sorumlu çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Son olarak bende büyük emekleri olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen güzel aileme, tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı değerli eşim Yahya ÖZER'e ve biricik kızım Defne Zilan ÖZER'e özellikle teşekkürü bir borç bilirim.

Ebru BİLEN ÖZER

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Rhodanin.....	1
1.2. Rhodanin Reaktivitesi.....	2
1.3. Rhodanin ve Türevlerinin Biyolojik Aktivitesi	3
1.4. Knoevenagel Reaksiyonu	6
1.5. Enzimler.....	9
1.6. Karbonik Anhidraz Enzimi.....	12
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	16
2.1. Çalışmanın Amacı	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Genel Yöntemler.....	25
3.2. Deneyler.....	26
3.2.1. 5-Aril-Rhodaninlerin (5-Ar-Rhs) Sentezi için Genel Prosedür.....	26
3.2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	32
3.2.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması.....	34
3.2.4. 5-Ar-Rh Türevlerinin hCA I ve II Enzimleri Üzerine Aktivasyon Çalışmaları	35
3.2.4.1. hCA Enzim Aktivitesi Tayini	35
3.2.4.2. Protein Tayini	36
3.2.4.3. İnhibisyon Çalışmaları	37

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. 5-Süstitüe-Rhodanin Türevlerinin Eldesi	38
4.1.1. <i>h</i> CA I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması.....	45
4.1.2. SDS-Page Elektroforez Sonuçları	45
4.1.3. İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	64
Ek A. NMR spektrumları.....	64
EK B. IC ₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri.....	77
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AH	: Alzheimer Hastalığı
AZA	: Asetazolamid
BCG	: Mycobacterium Bovis
CA	: Karbonik Anhidraz
C ₅ H ₁₁ N	: Piperidin
CH ₃ CO ₂ H	: Asetik Asit
CO ₂	: Karbondioksit
d	: Dublet
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EtOH	: Etanol
hCA	: Karbanik Anhidraz İzoenzim
hCA I	: Karbonik Anhidraz İzoenzimi I
hCA II	: Karbonik Anhidraz İzoenzimi II
HCV-NS5b	: Hepatit C NS5b RNA Polimeraz
K _i	: İnhibisyon Sabiti
kDA	: Kilodalton
MTB	: Mycobacterium Tuberculosis
NaCl	: İzotonik Çözelti
NH ₂	: Amin
OxI	: İzatin
pH	: Asit – Baz derecesi
ppm	: Milyonda bir kısım (part per million)
q	: Kuarted
Rh	: Rhodanin
rt	: Oda Sıcaklığı
s	: Singlet
t	: Triplet
(TBA) ₂ (W ₆ O ₁₉)	: Tetra Bütil Amonyum Hekzantungstat
THF	: Tetrahidrofuran

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Rhodanin (1) ve 3-amino-2-rhodanin (2) yapısı.....	1
Şekil 1.2.	Rhodanin (Rh, 1) molekülünün reaktivitesi.....	2
Şekil 1.3.	Rhodanin (1) türevlerinin sentezi.....	3
Şekil 1.4.	Rhodanin (Rh, 1) ve bazı Rhodanin temelli ilaçların yapısı.....	4
Şekil 1.5.	Knoevenagel kondenzasyon tepkimesi.....	7
Şekil 1.6.	<i>h</i> CA II izoenziminin kataliz mekanizması.....	14
Şekil 2.1.	N- ve 5-sübstitüe-rhodanin türevlerinin sentez stratejileri.....	24
Şekil 3.1.	<i>p</i> -Nitrofenilasetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması.....	36
Şekil 4.1.	5-Ar-Rh 4a ve 3-Ar-Rh 5a'nın ¹ H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.2.	5-Ar-Rh türevleri 4a-4j'nin sentezi.....	41
Şekil 4.3.	5-Ar-Rh türevleri 4a-4j için önerilen oluşum mekanizması.....	42
Şekil 4.4.	5-Ar-Rh türevleri 4j ve 6j için önerilen oluşum mekanizması.....	43
Şekil 4.5.	5-Ar-Rh 4h için önerilen oluşum mekanizması.....	44
Şekil 4.6.	5-Ar-Rh türevi 4h'ın gram ölçek sentezi.....	45
Şekil 4.7.	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan <i>h</i> CA izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı.....	46
Şekil 4.8.	5-Ar-Rh türevi 4j için <i>h</i> CA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan Aktivite (%)-[4j] grafiği.....	49
Şekil 4.9.	5-Ar-Rh türevi 4j için <i>h</i> CA I izoenziminin esteraz aktivitesi ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	49
Şekil 4.10.	Şekil 4.10. 5-Ar-Rh türevi 4i için <i>h</i> CA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan Aktivite (%)-[4j] grafiği.....	50
Şekil 4.11.	Şekil 4.11. 5-Ar-Rh türevi 4i için <i>h</i> CA II izoenziminin esteraz aktivitesi ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 5.1.	5-Aril-rhodanin (5-Ar-Rh) türevlerinin sentezi.....	51
Şekil 5.2.	5-Ar-Rh türevlerinin sentez mekanizması.....	52
Şekil 5.3.	5-Ar-Rh 4i için önerilen <i>h</i> CA II inhibisyon mekanizması.....	54

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1.	CA I ve CA II bulunduğu yerler ve ilgili olduğu hastalıklar	15
Tablo 3.1.	Esteraz aktivitesi için 1 mL'lik kuvars küvetlere kullanılan çözeltiler.....	36
Tablo 4.1.	Reaksiyon koşullarının optimizasyonu.....	39
Tablo 4.2.	Saflaştırma prosesi.....	45
Tablo 4.3.	5-Ar-Rh türevlerinin hCAs I ve II enzimlerine üzerine IC ₅₀ değeri	47
Tablo 4.4.	5-Ar-Rh türevlerinin hCAs I ve II enzimleri üzerine K _i değeri.....	48
Tablo 5.1.	5-Ar-Rh türevlerinin hCAs I ve II enzimlerine karşı inhibisyon değeri	53

3-AMİNO-5-ARİL-RHODANİN TÜREVLERİNİN ÇÖZÜCÜ KONTROLLÜ BÖLGESEL SEÇİCİ SENTEZİ VE İNSAN KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (*hCA I* ve *hCA II*) ÜZERİNE İNHİBİSYON ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Rhodanin türevleri biyolojik aktiviteleri ve teknolojik uygulamaları nedeniyle büyük öneme sahiptir. Rhodanin türevlerinden en önemli sınıfı ise 5-süstitüe-rhodanin türevleri oluşturmaktadır. Knoevenagel kondenzasyon reaksiyonu, sentetik organik kimyada 5-ikameli rhodanin gibi çeşitli önemli tıbbi ürünlerin üretimine izin veren C-C bağı oluşumu için oldukça önemli prosedürlerden birisidir.

Çevreci bir yaklaşımla 3-NH₂-Rh (2)'nin daha nükleofilik NH₂'si yerine C5 konumundan bölgesel seçici reaksiyonu önemli bir zorluğu temsil etmektedir. Bu bağlamda, bu çalışmanın birincil amacı, katalizör içermeyen koşullar altında 3-NH₂-Rh (2) ile çözücü destekli ve kontrollü bölgesel seçici arilasyon reaksiyonlarını geliştirmektir. Çözücü olarak suyun mevcudiyetinde, 3-NH₂-Rh (2)'in aldehitlerle C5-süstitüe arilasyon reaksiyonları verimli bir şekilde C5-aril-rhodanin (5-Ar-Rhs) türevlerini verdi. Öte yandan, etanol içinde katalitik miktarlarda bir asit katalizörü kullanılarak gerçekleştirilen 3-NH₂-Rh (2) ve aldehitlerin reaksiyonu ise NH-pozisyonundan rhodanin arilasyonu ile sonuçlandı. Burada su (H₂O), reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır. Buna göre, su molekülleri burada, 3-NH₂-Rh (2)'yi iki dişli nükleofillere dönüştürmesinin yanı sıra, aynı zamanda hidrojen bağı kümeleri yoluyla Knoevenagel yoğunlaşmasını elde etmek için 3-NH₂-Rh (2)'nin C-5 konumunu aktive etmektedir. Diğer bir değişle, 3-NH₂-Rh (2), su ile 3-NH₂-Rh (2)'nin amino grubu arasındaki H-bağı kümeleri nedeniyle bir C-nükleofil görevi görürken, saf etanol içinde katalitik miktarlarda asetik asit veya katalizörsüz reaksiyonlarından ise bileşikler bir NH₂-nükleofil görevi gördüğü düşünülmektedir.

Ayrıca, yeni 5-Ar-Rhs'nin sitozolik karbonik anhidraz (*hCA*'lar) I ve II izoformlarına karşı enzim inhibisyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Bu biyolojik çalışmalar sonucunda *hCA I* ve *hCA II* için inhibisyon sabitleri (*K_i*) sırasıyla 239,88±79,31 ila 610,24±111,43nM ve 262,69±13,20 ila 638,10±127,73nM aralığında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: 3-Amino-rhodanin, isatin, *hCA I*, *hCA II*, inhibisyon, rhodanin, rhodanin türevleri.

THE SOLVENT-CONTROLLED REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF 3-AMINO-5-ARYL-RHODANINES AND INVESTIGATION OF INHIBITION EFFECT ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES (*hCA* I and *hCA* II)

ABSTRACT

Rhodanine derivatives have great importance due to their biological activities and technological applications. Additionally, the Knoevenagel condensation reaction is one of the most major procedures for C–C bond formation in synthetic organic chemistry that allows the production of various significant medicinal products such as 5-substituted rhodanine.

The regioselective functionalization from C5-position instead of more nucleophilic NH₂ of 3-NH₂-Rh (**2**) via a green approach is representing a challenge. The primary goal of this study is to develop the solvent-promoted and -controlled regioselective bond alkylation reactions of 3-NH₂-Rh (**2**) with NH₂ free-rhodanine under catalyst-free conditions. In the presence of water as the solvent, C5-addition arylation reactions of 3-NH₂-Rh (**2**) with aldehydes efficiently gave C5-arylated-rhodanine (5-Ar-Rhs). On the other hand, using catalytic amounts of an acid catalyst in ethanol, the reaction of 3-NH₂-Rh (**2**) and aldehydes resulted in the arylation of rhodanine at the NH-position. Water plays two roles in the reactions: converting the 3-NH₂-Rh (**2**) into bidentate nucleophiles and activating the C-5 position of 3-NH₂-Rh (**2**) to achieve the Knoevenagel condensation via hydrogen bond clusters. The 3-NH₂-Rh (**2**) act as a C-nucleophile due to the H-bond clusters between water and the amino group of 3-NH₂-Rh (**2**), whereas upon using catalytic amounts of CH₃CO₂H in pure ethanol the compounds act as an NH₂-nucleophile.

Moreover, the enzyme inhibition studies of novel 5-Ar-Rhs against cytosolic carbonic anhydrase (*hCAs*) I, and II isoforms was carried out. As a result of these biological studies, inhibition constants (*K_i*) for *hCA* I and *hCA* II were found in the range of 239.88 ± 79.31 to 610.24 ± 111.43 nM, and 262.69 ± 13.20 to 638.10 ± 127.73 nM, respectively.

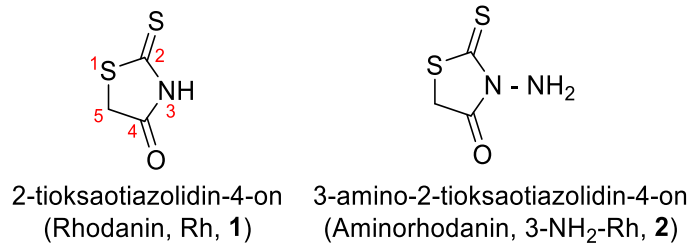
Keywords: 3-Amino-rhodanine, isatine, *hCA* I, *hCA* II, inhibition, rhodanine, rhodanine derivatives.

1. GİRİŞ

1.1. Rhodanin

Doğada saf halde bulunan birçok bileşik canlılar için büyük bir öneme sahiptir ve canlıların daha kaliteli yaşam sürmeleri için gereklidir. Bu bileşikler doğada çok sayıda bulunmakla beraber yapılarında en az bir tane hetero atom içeren halkalı bileşiklerdir. Doğada yer alan bu önemli hetero halkalı yapıları arasında biri olan tioksaotiazolidin halkası içeren bileşikler günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların yapısında oldukça yaygın bir şekilde yer almaktadır (Tomasic et al., 2010). Ayrıca bazı gıda katkı maddeleri ve tatlandırıcılar da hetero halkalı bileşik gruplarının kullanılmasıyla elde edilirler (Yılmaz ve Doğan, 2008). Hetero halkalı bileşikler arasında tiyazol bileşikleri organik kimya bilimciler için oldukça büyük bir öneme sahiptir. Bu bileşiklerden biri olan ve Rhodanin (Rh, 1) olarak da adlandırılan; 2-thioxothiazolidin-4-one (1) ve türevlerinin oldukça geniş biyolojik aktiviteleri 20. yüzyıldan beri bilinmekte ve üzerine birçok araştırmalar yapılmaktadır. Rhodanin ile ilgili araştırmalar günümüzde de önemli bir yer tutmaktadır (Şekil 1.1) (Tomasic and Masic, 2009).

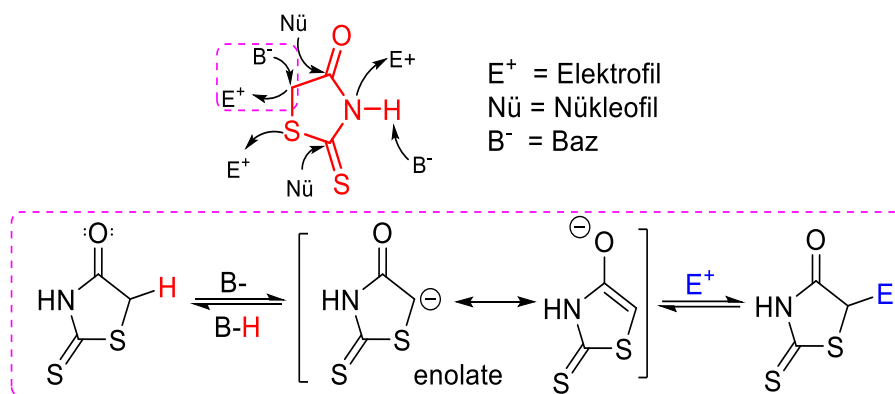
Ayrıca, Rhodanin (Rh, 1) ve türevleri bazı soy metal iyonlarının analizi için seçici ve duyarlı davranış sergilemekte ve korozyon önleyici olarak da kullanılırlar (Solmaz vd., 2005). Yapılarında azot, kükürt ve oksijen (üç hetero atom) bulundurdıkları için aktif merkez konumunda yer alırlar ve kolay bir şekilde üretilip saflaştırılabilirler (Tomasic and Masic, 2012).



Şekil 1.1. Rhodanin (1) ve 3-amino-2-rhodanin (2) yapısı

1.2. Rhodanin Reaktivitesi

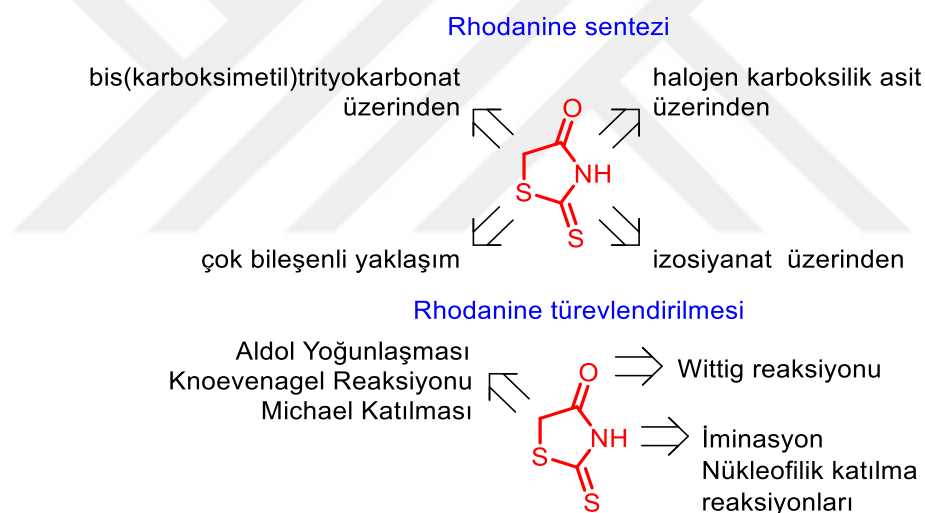
Tiazolidinden türetilen Rhodanine (Rh, 1) potansiyel biyolojik aktiviteleri ve farmakolojik özellikleri olan ilginç bir organik moleküldür. Bütün bu özelliklerinden dolayı Rhodanine türevlerinin daha çevreci yöntemlerle ve daha etkin bir şekilde sentezi geçmişten günümüze kadar araştırmacıların oldukça fazla ilgisini çekmektedir. Rhodanine, bazı aktif merkezlerin varlığından dolayı organik sentezlerde çok çeşitli uygulamalara sahiptir. Rhodaninde iki nükleofilik merkez, kükürt ve nitrojen üzerinde lokalizedir. Rhodaninin metilen kısmı, organik sentezlerde nükleofilik bir merkez olarak hareket edebilir (Şekil 1.2). Bir elektrofilik merkez de tiyokarbonil karbon atomuyla ilişkilidir. Rhodaninler kendileri için uygun olan bileşikler ile reaksiyona girdiklerinde öncelikle bir ara ürün oluşur. Meydana gelen ara ürün su kaybederek doymamış özelliğine sahip yeni sübsitüe Rhodanin türevlerini meydana getirir. Rhodaninlerin yapısında 5-konumunda yer alan metilen karbon atomu ile beraber 2-konumunda bulunan bazı gruplar da nükleofilik aktiviteye sahiptir. Rhodanin yapısında 5-konumunda bulunan metilen grubu içeren bileşikler aldehid ya da ketonun karbonil grubu bazik ortamda reaksiyona girerek 5-ariliden rhodanin türevi elde edilir (Kirpi, 2007).



Şekil 1.2. Rhodanin (Rh, 1) molekülünün reaktivitesi

Rhodanin iskeletinin sahip olduğu bu zengin reaktivite çeşitliliği nedeniyle araştırmacılar yeni Rhodanin türevlerinin sentezini oldukça fazla sayıda reaksiyon türü kullanarak gerçekleştirebilmektedir. Rhodanine türevlerinin sentezi için yaygın yöntemlerden birisi de Rhodanine halkasının sentezlenmesidir. Yine birçok araştırmacı 2-thioxothiazolidin-4-one (1) halkasının sentezlenmesi üzerinden yeni mono veya disübsitüe-Rhodanine

türevlerinin sentezini gerçekleştirebilmişlerdir. Araştırmacılar genel olarak, 5-sübstitü veya 3,5-disübstitüe-Rhodanine türevlerinin sentezi üzerine odaklanmışlardır. Rhodanin (Rh, 1) iskeletinin C5-pozisyonundaki metilen grubu, kimyasal reaksiyonu kolaylaştıracak kadar aktiftir. Bunun temel sebeplerinden biri kolayca protondan arındırılabilen aktif metilen karbon atomunun asitliğine bağlanabilir. Ayrıca konjuge baz, negatif yükün elektronegatif oksijen atomuna delokalizasyonu yolu ile stabilize edilebilmektedir. Bu bağlamda, ilgili metilen karbon atomunun nükleofilik aktivitesine bağlı olarak Rhodanine halkası aldol yoğunlaşması, Michael katılma, Knoevenagel reaksiyonu gibi oldukça geniş yelpazede reaksiyon çeşitliliğine sahiptir (Şekil 1.3). Bu reaksiyonlar α , β doymamış bileşikler içermektedir ve 5-sübstitüe-Rhodanin türevlerinin sentezlenebilmesi adına aldehit, keton, Michael akseptörleri (α , β doymamış karbonil bileşikleri) gibi elektrofilik merkezlerle oldukça yüksek verimlerde reaksiyon verirler (Brown, 1961).

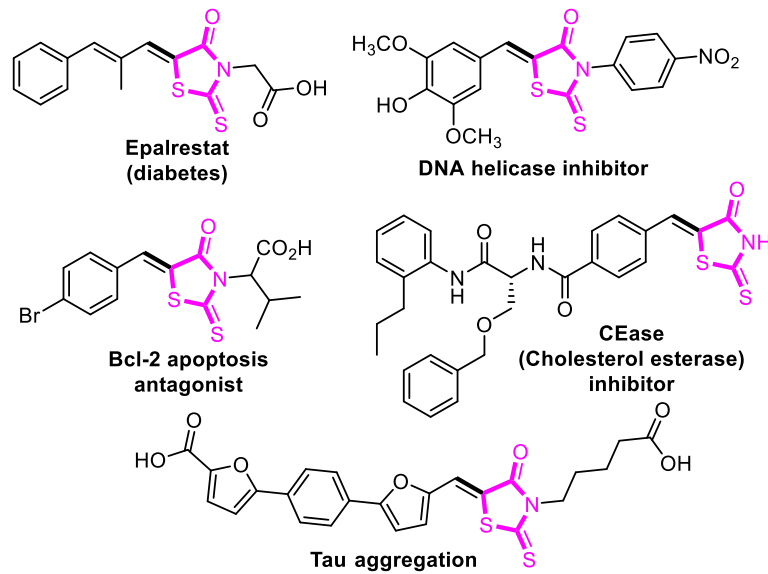


Şekil 1.3. Rhodanin (1) türevlerinin sentezi

1.3. Rhodanin ve Türevlerinin Biyolojik Aktivitesi

Heterosiklik bileşikler, kimya ve biyoloji bilimlerinin önemli bir parçasıdır. Bu bağlamda, en az bir heteroatom içeren organik bileşikler biyolojik sistemimizde çok önemli bir role sahiptir (Tomasic and Masic, 2009). Heterosiklik bileşikler içerisinde en önemlilerinden birisi ise Rhodanine bileşiğidir. Son yirmi yıl boyunca 5-ariliden rhodanin türevleri, ilaç keşfinde ayrıcalıklı iskeleleri temsil etmelerinden dolayı organik kimyagerler ve biyologlar tarafından yoğun araştırma konusu olmuştur. Son literatür incelemeleri, bu bileşiklerin çok

çeşitli farmasötik özellikler sergilediğini göstermiştir (Lesky and Zimenkovsky, 2004). Örneğin, epalrestat (2) diyabetik periferik nöropatinin (Hotta et al., 2006) tedavisinde kullanılmış ve aldoz redüktaz inhibitörü olarak değerlendirilmiştir (El- Kabbani et al., 2005). Yine 5-benziliden rhodanin çekirdeği 3'ün pankreas kolesterol esterazı (Heng et al., 2011). (CEase) inhibe ettiği gösterilmiştir. Rhodanine temelli dimerik analog 4, tam bir SAR çalışması (Wang et al., 2008) aracılığıyla apoptoz için küçük moleküllü Bcl-2 antagonistleri olarak geliştirilmiştir. Son zamanların önemli ve üzerine en çok çalışmalar gerçekleştirilen Alzheimer hastalığı için ise 5-ariliden rhodanin parçasını içeren rhodanine türevi 5'in tau agregasyonu (Strittmatter et al., 2011), amiloid polipeptid fibril oluşumu (Bulic et al., 2009; Bulic et al., 2010) katepsin-D immüno reaktivitesinin regülasyonu inhibitör etkisine sahip olduğu bildirilmiştir. Bütün bu çalışmalara ek olarak rhodanin bazlı moleküller, sıtma (Kumar et al., 2007); (Soltero, 2004), Hepatit C (Powers et al., 2006), HIV enfeksiyonu (Rajamaki et al., 2009) ve çok sayıda hedef için popüler iyi birer küçük moleküllü inhibitör ailesi haline gelmiştir. Rhodanin (Rh, 1) ve türevlerinin yapılarında bulunan (N-C=S) gruplarından dolayı; antibakteriyal, antifungal, antiviral, antimaleral, antitümör, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler (Tomasic and Masic, 2009). Son yıllarda Rhodanin -kinolin türevlerinin antitüberküloz etki gösterdiği de tespit edilmiştir. Tiyadiazol türevli bileşikler biyolojik aktivitelerinden farklı olarak tarımda herbisit (zararlı bitkiler için öldürücü) ve pestisit (mikroorganizma öldürücü) olarak da kullanılmaktadır (Şekil 1.4) (Vachani et al., 2012).



Şekil 1.4. Rhodanin (Rh, 1) ve bazı Rhodanin temelli ilaçların yapısı

Rhodanine (Rh, 1) ve türevleri üzerine oldukça fazla sayıda biyolojik çalışma vardır. Birçok araştırmacı sentezini gerçekleştirdikleri yeni Rhodanine türevlerinin biyolojik çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Literatür verileri ışığında Rhodanine iskeleti taşıyan organik bileşiklerin biyolojik etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir;

Antibakteriyel etkisi; Rhodanine (Rh, 1) ve türevlerinin antimikrobiyal aktivitesinin var olduğu 60 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir. Bu heterosiklik yapıyı taşıyan Rhodanine (Rh, 1) üzerinden antibakteriyel ilaçlar üretilmektedir. Özellikle Rhodaninin indol-2,3-dionlarla yoğunlaştırılmış türevleri S.aureus ve E.coli'ye karşı güçlü bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bakterilere özgü spesifik enzimleri hedef aldıkları da tespit edilmiştir (Ottanà et al., 2009).

Antifungal etkisi; Rhodanine (Rh, 1) ve türevlerinin uzun yıllardan beri mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçların üretiminde de etkin bir rolünün olduğu bilinmektedir. Mantar enfeksiyonlarında Rhodanin türevlerinin çok erken etki ettiği görülmüştür. Rhodanine (Rh, 1) iskeleti içeren bileşiklerin, Aspergil, Helminthosporium Oryzae, Cephalosporium Saccharii, Penicillium SP, A.ni, Candida izolatları, Cryptococcus Neoformans mantarlarına ve daha birçok mantar hastalığına karşı antifungal aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Bayındır et al., 2019a).

Antiviral etkisi; Rhodanine (Rh, 1) ve türevleri virüslerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların yapısında da yer almaktadır. Özellikle HIV-1 intergraz ve hepatit c NS5b RNA polimerazın (HCV-NS5b) inhibitörlerinin geliştirilmesinde Rhodanin ve salisilik asit gruplarının kullanıldığı bileşiklerin etkili olduğu rapor edilmiştir (Powers et al., 2006).

Antimalaryal etkisi; Plasmodium türünden kaynaklanan sıtma hastalığının tedavisinde Rhodanine (Rh, 1) ve türevlerinin antimalaryal etkiye sahip olduğu görülmüştür (Tomasic and Masic, 2009).

Antitümör etkisi; Rhodanine (Rh, 1) ana iskeleti içeren ilaçların kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir. Akciğer kanseri, kolon kanseri ve

meme kanseri tedavilerinde tiyazolidin bazlı bileşiklerin kullanıldığı görülmüştür (Azizmohammadi et al., 2013).

Antiinflatuar etkisi; İnflatuar (kronik) hastalıkların tedavisinde romatoid artrit ve gastrointestinal sistem üzerinde kullanılan ilaçların yapısında Rhodanin ve türevlerinin biyolojik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Tomasic and Masic, 2009).

Antidiyabetik etkisi; Rhodaninlerin en iyi bilinen farmakolojik aktiviteleri arasında antidiyabetik ajanlar olarak, özellikle alzheimer hastalığı dâhil çoğu hastalık durumundan sorumlu tutulan bir enzim olan (kathepsin-D ve aspartil proteaz) peptidsiz inhibitörü olarak kullanılmaları gösterilmektedir (Murugan et al., 2009).

Antimikrobiyal etkisi; Birçok hastalığın ortaya çıkması ve kompleks halde olmasından dolayı son 60 yıldır birçok antibiyotik geliştirilmiştir. Bu antibiyotiklerin yapısında Rhodanin en çok kullanılan bileşiktir (Tejchman et al., 2017).

Ayrıca Rhodanin türevleri sentetik kauçuk elde edilmesinde vulkonizasyon (kükürt ile sertleştirme) hızlandırıcı maddelerdir. Rhodanin ve türevleri gresit yağlama yağları karıştırıldığında korozyonu önleyici etki gösterirler. Rhodanin ve türevleri, şeker hastalığı tedavisinde, romatizmal eklem iltihabı tedavisinde, ilaç sanayisinde yaygın olarak etinopati gibi kronik şeker hastalığı olanlarda görülen komplikasyonların ilerlemesinde serbest glikoz fazlalığının tetiklediği görülmüştür (Lesky and Zimenkovsky, 2004). Bu komplikasyonların ortadan kaldırılması, önlenmesi ve azaltılmasında en önemli yöntem aldoz reduktaz inhibisyonudur.

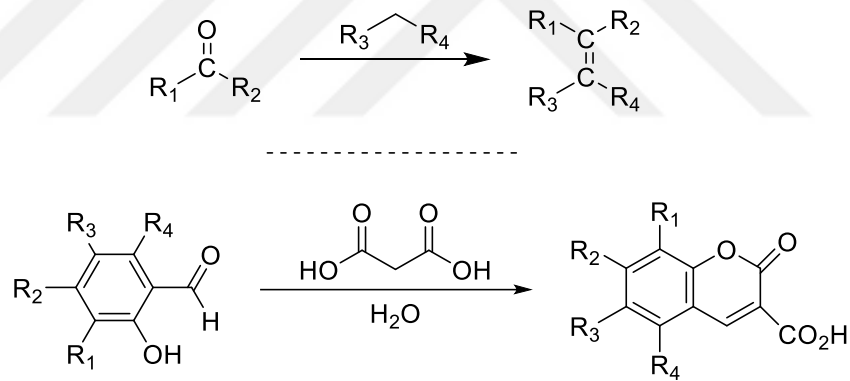
Sonuç olarak, canlı yaşamı için oldukça önemli olan yeni Rhodanin türevlerinin sentezi, karakterizasyonu ve uygulama çalışmaları güncel ve detaylı bilimsel araştırmalara konu olmaktadır (Bhuiyan et al., 2010).

1.4. Knoevenagel Reaksiyonu

Heinrich Emil Albert Knoevenagel 18 Haziran 1865 - 11 Ağustos 1921 “Knoevenagel Kondenzasyon Reaksiyonu” nu bulan bir Alman kimyagerdir. 1896 ve 1898 yılları

arasında organik kimya alanında bazı çalışmalar gerçekleştirmiştir. Yaptığı bu çalışmalarında aldehid türevlerinin malonik asid ve türevleri ile oluşturduğu reaksiyonları incelemiştir (Rahnema et al., 2007).

Emil Knoevenagel incelemiş olduğu bu reaksiyonlarda çeşitli bazları kullanarak aldehit ile malonik asitlerin birbirleriyle tepkimeye girerek kondenzasyon tepkimelerini oluşturduğunu ifade etmiştir. 1898 yılından günümüze kadar yapılan sayısız araştırmalar Emil Knoevenagel'in tezini doğrulamaktadır. Bu nedenle bu tür tepkimelere 'Knoevenagel Kondenzasyonu' adı verilmiştir (Rahnema et al., 2007). Genel olarak yapılarında α - hidrojeni barındırmayan aldehidlerin, aktif metilen grubu bulunduran $R_3-CH_2-R_4$ ya da $R_3-CHR-R_4$ yapısındaki bileşiklerle amonyak veya aminlerin varlığında girmiş olduğu tepkimelere 'Knoevenagel Kondenzasyonu' tepkimeleri denir R_3 ve R_4 ; CHO, COR, COOH, COOR, CN, NO₂, SOR, SO₂, SO₂OR olabileceği gibi benzer başka gruplar da olabilir (Şekil 1.5) (Smith and March, 2001).



Şekil 1.5. Knoevenagel kondenzasyon tepkimesi

Knoevenagel reaksiyonlar genel itibariyle aromatik sistemlerin aldehitler kullanılarak türetildiği reaksiyonlardır. Knoevenagel Kondenzasyon reaksiyonları kullanılan çözücülere göre ayrılabilir.

Organik Çözücü Kullanılması: Knoevenagel Kondenzasyonunda etanol ve metanol gibi organik solventler sıklıkla kullanılır. Literatür taramaları incelendiğinde etanol solventi ile beraber tetra bütül amonyum hekzatangstat $[TBA]_2 [W_6O_{19}]$ katalizörünün kullanıldığı Knoevenagel Kondenzasyonu çalışmaları mevcuttur (Davoodnia, 2012).

Suyun Kullanılması: Knoevenagel Kondenzasyonun su kaybının olduğu aşamaları olsa da solvent olarak suyun kullanıldığı reaksiyonlarda, reaksiyonların olumlu bir şekilde ilerlediği belirtilmiştir. Örneğin, Kumarın heterosiklik bir bileşiktir ve elektrolitik alkenlerin üretilmesi için suyun solvent olarak seçildiği çalışmalar mevcuttur (Bigi and Qmarontelli, 2012).

Solvent Olmadan İlerleyen Knoevenagel Kondenzasyonları: Knoevenagel Kondenzasyonlarının solvent olmadan da ilerlediği pek çok reaksiyon mevcuttur. MgO, ZrO₂ kompoziti kullanılarak Knoevenagel Kondenzasyonu elde edilmiştir. Çözücüsüz ortamın avantajlarından biri reaksiyonda yer alan ürünlerin çok kolay bir şekilde izole edilebilmeleridir. Bu reaksiyondan kompozitlerin aktivitelerini yitirmemeleri avantajdır (Jayarom and Gawende, 2006). Knoevenagel reaksiyonlarda bir diğer önemli bileşen de katalizör seçimidir. Knoevenagel reaksiyonlarda bazı kompozitler heterojen bazik katalizör olarak kullanılabilir. Örneğin malononitril ve karbonil bileşikleri çözücüsüz ortamlarda heterojen bazik katalizör olarak kullanılmaktadır (Kalbasi et al., 2011).

Knoevenagel reaksiyonları katalizörsüz ortamda da gerçekleşmektedir. İzolasyon kolaylığı ve ileri saflaştırma işlemi gerekmemesi metodun avantajlarından (Bhuyan and Deb, 2005). Katalizör olarak tuzların kullanıldığı reaksiyonlar kısa sürede, yüksek verimlilikte ve oda koşullarında gerçekleşmiş olup katalizörlerin aktivitesini yitirmedikleri görülmüştür (Liu and Ai, 2012).

Rhodanin üzerine oldukça fazla Knoevenagel reaksiyonu mevcuttur. Özellikle son 25-30 yıldır organik bilimciler tarafından Rhodanin ve türevleri araştırmalara konu olmaktadır. Çünkü ilaç ana iskelesinde yer alıp, biyologlar ve kimyagerlerin temsili haline gelmiş bu bileşikler geniş farmasötik özelliklere sahiptir (Guiheneuf et al., 2014).

Geçmişten günümüze karbon-karbon bağı oluşturabilen tepkimeler üzerine çalışmalar yapılmaya devam edilmektedir. Bu tepkimelere bakıldığında malononitril gibi aktif metilen bileşiklerin aldehitler ile tepkimesiyle gerçekleşen Knoevenagel kondenzasyonu büyük önem taşımaktadır. Çünkü Knoevenagel kondenzasyonu ile antikanser, antioksidant, antibakteriyel, antikonvülsan gibi önemli biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip benzilidenmalononitril türevlerinin elde edilmesini sağlar (Nişancı, 2019).

Aldehit analoglarının aktif metilen bileşikleri ile reaksiyonu ilk olarak Emil Knoevenagel (1984) tarafından ileri sürülmüş ve literatürde yerini almıştır (Shirini and Daneshvar, 2016). Özellikle günümüzde çok bileşenli reaksiyonlar verimi yüksek, düşük maliyet, minimum atık ve minimum reaksiyon süresiyle çok fonksiyonlu moleküllerin elde edilmesi katalizörsüz ortamlarda Knoevenagel reaksiyonlar ile gerçekleştirilmeye çalışılmışlardır (Moemeni et al., 2015).

Knoevenagel reaksiyonları olefinlerin (elektron eksikliği olan) sentezinde önemli bir sentetik yöntem olarak literatürde yerini almıştır. Ayrıca kozmetik ve ilaç ara ürünlerinin elde edilmesinde de Knoevenagel reaksiyonlardan faydalanılmaktadır. Knoevenagel ürünlere olan ilginin her geçen gün daha da artmasının sebebi reaksiyon ürünlerinin büyük bir çoğunluğunun önemli biyolojik aktivitelere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Kalbasi et al., 2011).

Sonuç olarak Rhodanin ve türevlerinin sentezi Knoevenagel kondenzasyonu neticesinde gerçekleşebilmektedir. Rhodanin ve türevlerinin sentezinin Knoevenagel reaksiyonlar ile gerçekleştirilmesi hem daha verimli hem daha düşük maliyet gerektirmesi hem de daha çevreci olmasından dolayı yeni araştırmalarda uygun görülmektedir.

1.5. Enzimler

Canlı organizmalar için hayati öneme sahip olan enzimler canlılar tarafından sentezlenen ve metabolizmadaki kimyasal reaksiyonların spesifik olarak gerçekleşmesini sağlayan katalizörlerdir. Enzimler reaksiyonların hızını arttırırlar ve değişikliğe uğramazlar. Enzim ile katalize edilen reaksiyonların hızını azaltan maddelere inhibitör adı verilir. Bunlar enzim substrat ilişkisini bozarak etki ederler (Keha ve Küfrevioğlu, 2020).

Enzimler protein yapısına sahip bileşiklerdir. Proteinlerin en spesifik ve en büyük oluşumu enzimlerden ibarettir (Keha ve Küfrevioğlu, 2020). Protein yapısına sahip oldukları için bu yapının bozulması veya aminoasit alt birimlerine parçalanması durumunda katalitik etkilerini kaybederler. Enzimler katalitik etki gösterebilmeleri için enzim içinde yer alan proteinlerin primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapılarına sahip olmaları gerekir. Bazı

enzimler ise katalitik aktivite gösterebilmek için bu yapılara ek olarak kofaktör adı verilen ek kimyasal yapılara ihtiyaç duyarlar (Nelson and Cox, 2004).

Enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılması yapılırken enzim-substrat adlarına göre ya da aktivitelerini tamamlayan enzim veya kelimelerin bitimine -az- eki getirilerek adlandırılır. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu (ECIUB) enzimleri sınıflandırırken, enzimleri katalizledikleri reaksiyon şekillerine göre altı ana grupta sınıflandırmışlardır (Nelson and Cox, 2004). Bu altı ana grup sınıflandırılması şöyledir:

Oksidoredüktazlar: Yükseltgenme-İndirgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim gruplarıdır. Dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar, oksijenazlar ve proksidazlara ek olarak koenzim olarak da FADH₂, NADH, NADPH örnek olarak verilebilir.

Transferazlar: Hidrojen hariç diğer grupların transferini substratlar arasında sağlayarak katalize eden enzimlerdir. Aldehitler, ketonlar ve fosfat bu gruba örnek olarak verilebilir.

Hidrolazlar: Eter, ester, glikozid, peptid ve anhidrid gibi kompleks bağların yanı sıra P-N, C-X gibi bağlara da su bileşiğinin katılmasıyla parçalanmayı katalizleyen enzimlerdir. Esteraz, lipaz, glikozidaz, fosfataz, proteinaz ve tüm nükleaz enzimler bu grupta yer alırlar.

Liyazlar: Oksidasyon ve hidroliz yapmadan farklı bir mekanizma ile karbonlardan grupların uzaklaştırılmasıyla ikili bağ oluşturan ya da ikili bağa katılma reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Hidratasyon ve dehidratasyon reaksiyonlarını da katalizlerler.

İzomerazlar: Yapısal, optik ya da geometrik izomerlerin birbirine dönüşümlerini sağlayan enzimlerdir. Rasemeraz, epimeraz ve mutazlar bu sınıftadır.

Ligazlar: Yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının koparılmasıyla ortaya çıkan enerjinin kullanılarak C-O, C-S, C-N, C-C bağlarının oluşmasını sağlayan enzimlerdir (Keha ve Küfrevioğlu, 2020).

Enzimler, kofaktörler ile beraber katalitik aktivite gösterirler. Bu kofaktörler Fe²⁺ ve Zn²⁺ gibi iyonlar olabileceği gibi kompleks yapıya sahip organik ya da metaloorganik

moleküller de olabilir. Enzimin kofaktörlerle beraber katalitik olarak aktifleşmesiyle holoenzimler oluşur. Holoenzimin yapısında yer alan proteinlere apoprotein ya da apoenzim denir. Enzime nonkovalent olarak bağlanan kofaktör gruplarına ise ko-substrat denir (Nelson and Cox, 2004). Enzimler özelliklerine bağlı olarak tek substrata ya da birden fazla substrata etki edebilirler. Genel olarak enzimler stereo spesifiklik gösterebilirler (Keha ve Küfrevioğlu, 2020).

Enzimler protein yapısına sahip olduklarından maksimum verimle çalıştıkları bir pH (asit-baz derecesi) aralığı bulunmaktadır. Bu pH aralığı, optimum pH olarak adlandırılır. Genel itibariyle fizyolojik pH'da enzimler maksimum etkinlik gösterirler (Nelson and Cox, 1993; Keha ve Küfrevioğlu, 2020). Örnek vermek gerekirse pepsin enzimi pH 2.0 de, tripsin enzimi pH 8.5 te maksimum aktivite gösterirler.

Reaksiyon hızına ortamda bulunan substrat da etki etmektedir. Yeterli miktarda substrat olduğunda enzim konsantrasyonunun artmasıyla tepkimenin hızı artar. Ancak bu artış belirli bir noktaya ulaştıktan sonra sabitlenir. Bu, enzimin substrat ile doyuma ulaştığı noktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2020).

Enzimatik reaksiyonların genel çerçevede enzimin aktif yerine substratın bağlanmasıyla enzim substrat bileşeninin elde edilmesi, substratın kaybolarak yerini enzim ve ürüne bırakmasıyla oluşmaktadır. Enzimlerin inhibisyonu iki şekilde olur. Bunlar; reversible (geri dönüşümlü) ve irreversible (geri dönüşümsüz) olmaktadır. Reversible inhibisyon kendi arasında üçe ayrılır.

- Kompetitif (yarışmalı) inhibisyon
- Unkompetitif (yarı yarışmalı) inhibisyon
- Non kompetitif (yarışmasız) inhibisyon

Kompetitif inhibisyon, enzim-substrat ilişkisine benzer ve enzimin aktif olan yerine bağlanır. Substratın enzime bağlanmasını engeller. Eğer substratın konsantrasyonu arttırılırsa inhibisyon azalır. V_{max} (enzimin maksimum hızı) değişmez, K_m değeri yani V_{max} 'ın 1/2 sine yetişişi için gerekli olan substrat miktarı artar. Non kompetitif inhibisyon, inhibitör ile substrat benzer yapılara sahip değildirler. İkisi de enzime

bağlanabilir. İnhibitör enzimde yer alan aktif alan dışına bağlanarak enzim substrat birleşmesini engeller ve enzimi inhibe eder. Bu durumda inhibitör enzimin katalitik aktivitesini azaltır ve enzim ile substratın reaksiyona girme hızını da düşürür. Burada substrat miktarının artırılması inhibisyonu engellemez. V_{max} değeri azalırken K_m değeri enzim için sabit kalır. Unkompetitif inhibisyonunda ise inhibitör enzim-substrat kompleksine beraber bağlanır. Bu durum enzim yapısının birden fazla substrat ile reaksiyona girebildiği sistemlerde daha çok görülür. V_{max} düşer, K_m değeri ise azalır (Sarıgüney, 2018).

1.6. Karbonik Anhidraz Enzimi

Canlı yaşamı için çok önemli enzimlerden biri olan Karbonik Anhidraz (CA: karbonat hidrolizaz, EC 4.2.1.1) enzimi ilk olarak Meldrum ve Roughton tarafından 1933 yılında Eritrositler üzerine yaptıkları çalışma sonucunda bulunmuştur (Supuran 2008). CA enzimi, eritrositlerden akciğer kılcal damarlarına bikarbonatın hızlı transferini gerçekleştiren katalitik faktörün arandığı bir çalışma sonucunda karakterize edilmiştir (Dökmeci, 1992).

Günümüzden yaklaşık seksen dokuz yıl önce keşfedilen CA enzimi halen güncel olarak biyokimya ve biyomedikal bilimciler tarafından araştırmalara konu edilmektedir (Supuran, 2010a). Keilin ve Mann (1944) yılında yapmış oldukları çalışmada CA aktivitesinin çinko (Zn^{+2}) içeriği ile doğrusal ilişkili olduğunu keşfetmiştir. Böylece CA enzimi tanımlanmış ilk Metalloenzim enzim olarak tarihe geçmiştir. CA enzimi Zn^{+2} prostetik grubu taşıyan tek polipeptit zincirden meydana gelmektedir. Karbonik anhidraz enzimi 260 aminoasitten meydana gelmiş olup yaklaşık olarak 30 kDA molekül ağırlığına sahiptir (Atmaca vd., 2021).

Şimdiye kadar sekiz farklı CA ailesi keşfedilmiştir. Değişik türlerde olmak üzere bunlar; α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι -CA'lar şeklinde tanımlanmıştır. α -CA (bakteriler, omurgalılar, algler ve Çevreci bitkilerin sitoplazmasında), β -CA (algler, bakteriler, tek ve çift çenekli bitkilerin kloroplastlarında), γ -CA (temel olarak archealar da ve bazı bakterilerde), δ -CA (bazı deniz diatomlarında) bulunmaktadır (Supuran, 2008; Atmaca vd., 2021).

Değişik ailelerde gösterilen homolog enzimler arasında ciddi bir farklılık yoktur, tam tersine bunların hepsinde ortak olarak Zn^{+2} iyonu mevcuttur. Bundan ötürü bu ailelerin

hepsi, katalitik fonksiyonları bakımından birbirine benzeyen formlardadır (Supuran, 2010b). Karbonik anhidraz enziminin memelilerde 16 α -CA izoenzimi bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin; 5 tanesi (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII) sitozolik yapıda, 2 tanesi (CA VA, VB) mitokondriyal yapıda, 1 tanesi (CA VI) salgısal yapıda, 5 tanesi (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV ve CA XV) membrana bağlı yapıda ve 3 tanesi (CA VIII, CA X ve CA XI) nonkatalitik yapıdadır. CA XV izoenziminin katalitik aktivitesinin az olduğu ve CA IV gibi benzer özelliklerinin olduğu görülmüştür. CA VIII, IX ve XII izoenzimlerinin tümörojen özelliğinin olduğu rapor edilmiştir (Supuran, 2010b).

İlk olarak memeli eritrositlerinden izole edilen CA, sonraki yıllarda ise insan eritrositleri, sıçan eritrositleri, balık eritrositleri, sığır kemiği, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Bu enzim özellikle; canlılarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizlemesiyle ön plana çıkmaktadır. CA enzimi vücut sıvısının dengelenmesi, kemik gelişimi, pH düzenleyici ve diğer pek çok fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (Supuran, 2010b).

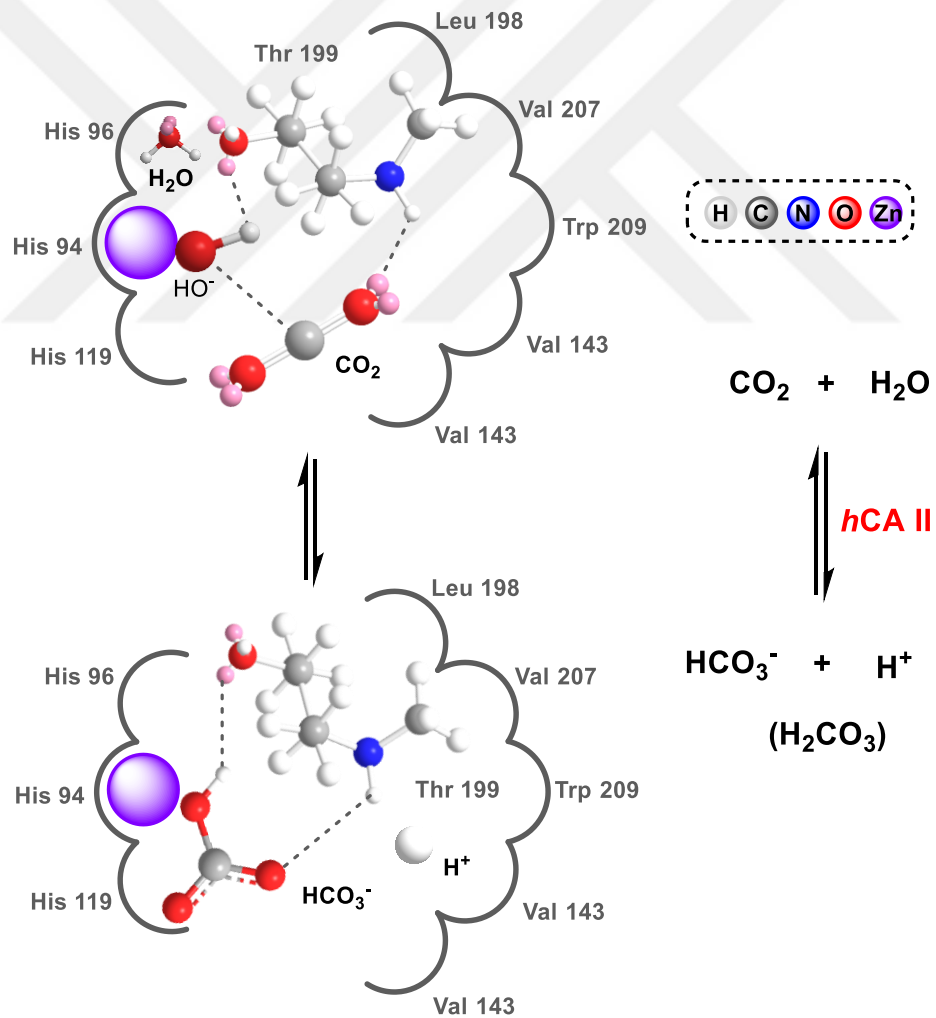
Karbonik anhidrazın aktif bölgesi oyuk şeklinde olup geniş bir alana yerleşmiştir. Zn^{2+} iyonu bu oyukun alt kısmına bitişik bir durumdadır. Zn^{2+} iyonları, üç histidin (His-94, His-96 ve His-119) ve H_2O molekülü tarafından koordine edilerek enzimin aktif bölgesinin altında yer alır. CA'ların aktif alanı, CO_2 'nin tersinir hidrasyon reaksiyonunu katalize etmek için bir substrat H_2O 'ya bağlanan ve onu aktive eden güçlü bir Lewis asidi olan aktif bir Zn^{2+} iyon bölgesi içerir (Şekil 1.6) (Sağlamtaş, 2021; Çağlayan, 2019).

CA enziminin katalizlediği bu reaksiyon;

- Ortamın pH ve CO_2 dengesini sağlar.
- Kemik resorpsiyonu/kalsifikasyonunu sağlar
- Dokulardan CO_2 transferini sağlar.
- Vücudun elektrolit dengesini sağlar.
- Biyosentetik reaksiyonları (glukoneogenez, lipogenez, üreagenez) gerçekleştirir (Çağlayan, 2019).

CA enziminin inhibisyonu veya aktivasyonu ile açıklanabilen bazı hastalıklar mevcuttur. Bu hastalıkları şu şekilde sayabiliriz;

- Glokom
- Obezite
- Kanser
- Epilepsi
- Osteoporoz
- Nöropotik ağrı
- Alzheimer (Bayındır et al., 2019a; Göçer et al., 2016).



Şekil 1.6. *hCA II* izoenziminin kataliz mekanizması

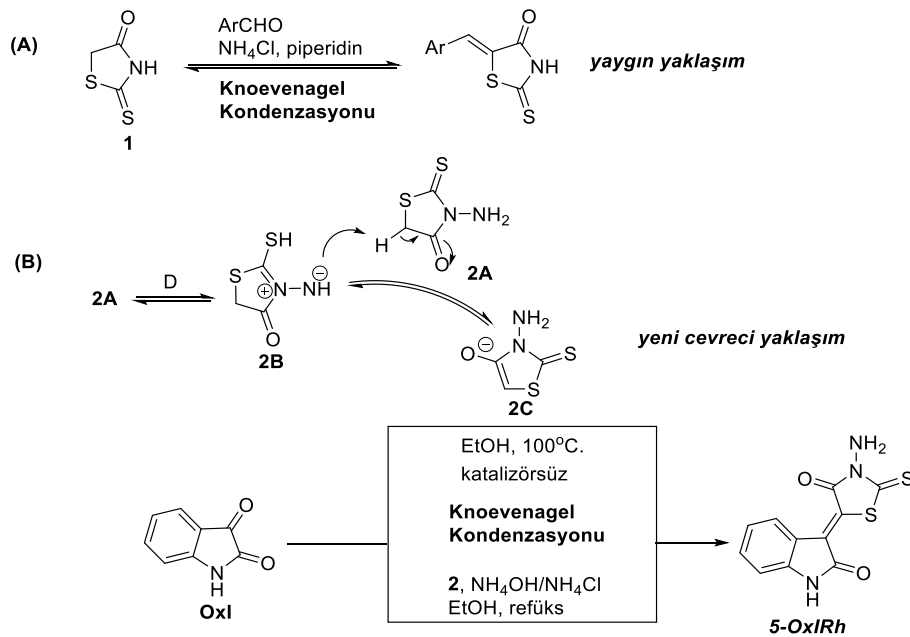
Literatüre göre CAI ve CAII korneal endotelyumda yer aldığı bildirilmiştir. Yine CA VII izoenzimi sinir sisteminin üzerine etkileri bulunmaktadır (Bayındır et al., 2019c). Fenolik bileşikler ve asitler CA I ve CA II izoenzimleri için inhibitör görevi görmektedir. Böyle bileşikler, tıbben ilgili CA'lerden bazılarını amaçlayan spesifik inhibitörlerdir. CA I ve CA II sitozolik izoenzimler olduğu ve mide hücrelerinde CA II izoenzimi yer aldığı görülmüştür. Yapılan incelemeler CA I in mukoza zarında ve pankreas langerhans adacıklarının alfa hücrelerinde bulunduğunu göstermiştir (Gülçin ve Baydemir, 2013). Yine CA XIII tükürük bezi, böbrek, ileum, kolon, rahim ve testisi de barındıran farklı dokularda exprese halde bir izoenzimdir. CA XIII izoenziminin CA I ve CA II ile CA III sitozolik enzimleriyle büyük ölçüde benzerlik gösterdiği (% 60) bildirilmiştir (Gökçe, 2009).

Tablo 1.1. CA I ve CA II bulunduğu yerler ve ilgili olduğu hastalıklar (Gülçin et al. 2013)

	Bulunduğu yer	Hücre içi yerleşim	Katalitik aktivite	İnhibitör ilgisi	İlgili olduğu hastalık
CA I	Eritrosit Gastrointestinal sistem Göz	Sitozol	Düşük	Orta	Retina Beyin ödemi
CA II	Eritrosit Gastrointestinal sistem Göz Böbrek Karaciğer Beyin Kemik osteoklastları	Sitozol	Yüksek	Çok yüksek	Glokom Ödem Epilepsi Yüksek irtifa hastalığı

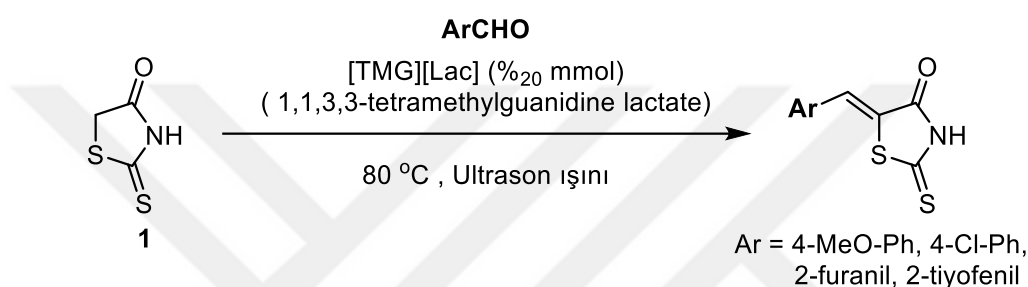
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Heterosiklik bileşikler içerisinde en önemlilerinden birisi ise Rhodanine bileşiğidir. Son yirmi yıl boyunca 5-ariliden rhodanin türevleri, ilaç keşfinde ayrıcalıklı iskeleleri temsil etmelerinden dolayı kimyagerler ve biyologlar tarafından yoğun araştırma konusu olmuştur. 5-Süstitüe rhodanin türevlerinin sentezi genel itibariyle aldehitlerle rhodanine türevlerinin trietilamin ya da piperidin (*sağlığa ciddi zararları bilinen maddelerdir*) gibi bazlar ile çözücü içerisinde Knoevenagel Kondenzasyonu sonucu elde edilirler. Bu reaksiyon her ne kadar kullanışlı bir yöntem olsa da rhodanin üç pozisyonunda bazlara karşı duyarlı grupların bulunması durumunda ciddi sıkıntılar oluşturmaktadır. Dolayısıyla Knoevenagel Kondenzasyonunun daha ılıman ve çevreci şartlarda gerçekleştirilmeleri de araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Bayındır ve gurubu yapmış oldukları bir çalışmada amino rhodanin bileşiği ile İsatın (**OxI**)'ün reaksiyonunu yüksek sıcaklıklarda katalizörsüz olarak gerçekleştirerek 5-süstitüe rhodanin türevi **5-OxIRh**'nin sentezini yüksek verimlerle elde etmişlerdir (Şema 1) (Bayındır, 2019a, Bayındır, 2019b).



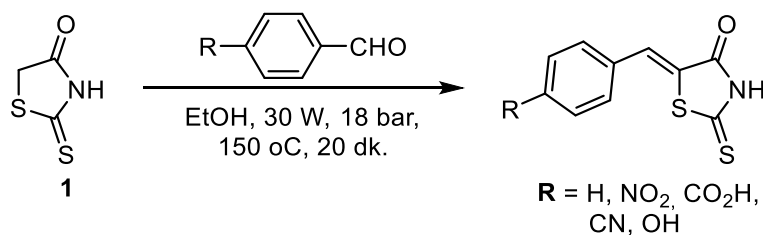
Şema 1

Birçok grup önemli bir heterosiklik bileşik olan rhodanine (1)'in reaksiyonları üzerine yoğunlaşmıştır. Özellikle 5-süstitüe-rhodanin türevlerini daha etkili yöntemlerle yüksek verimlerle sentezlenmesi bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur. Bu çalışmalardan birisi de Suresh vd. tarafından gerçekleştirilmiştir. Suresh vd. bu çalışmalarında 5-süstitüe-rhodanin türevlerinin etkili sentezlenmesi için yeni katalizör sistemleri üzerine araştırmalar yapmışlardır (Suresh et al., 2013). Bu çalışmada, bazı 1,1,3,3-tetramethylguanidine-temelli iyonik sıvılar (TSILs) katalizör olarak kullanılarak 2,4-thiazolidinedione (Rh) bileşiğinin aldehitlerle reaksiyonlarını incelemişlerdir (Şema 2).



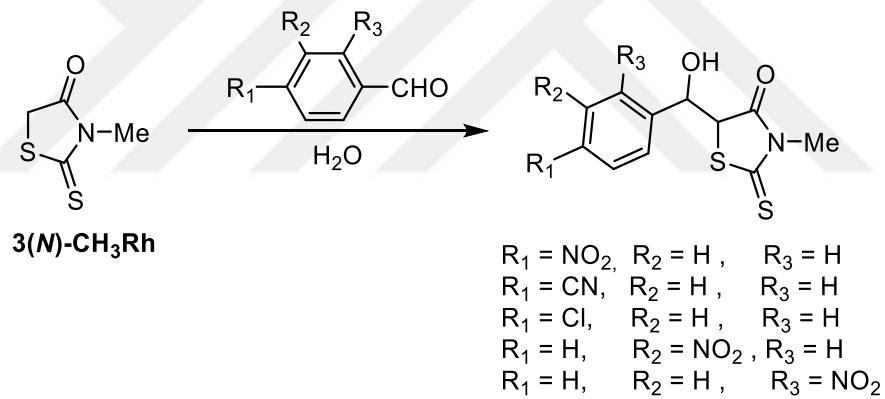
Şema 2

Birçok ilaç analogunun ana ikletetini oluşturmalarından dolayı 5-aril-sübstüte-rhodanin türevlerinin etkili sentezi ve biyolojik özelliklerinin incelenmesi geçmişten günümüze kadar popülerliğini korumaktadır. Bu çalışmalardan bir diğeri ise Arsovska vd. tarafından gerçekleştirilmiştir (Arsovska et al., 2014). Bu çalışmada, Arsovska vd. rhodanin (1) ve benzyl aldehitlerin etanol içersinde ve piperidin/AcOH katalizörlüğünde 5-benzliden-rhodanin türevlerinin sentezini gerçekleştirmişlerdir (Şema 3). Daha sonra, elde edilen 5-benzliden-rhodanin türevlerinin indirgenmesi neticesinde indirgenmiş 5-benzil-rhodanin türevlerinin sentezini de rapor etmişlerdir.



Şema 3

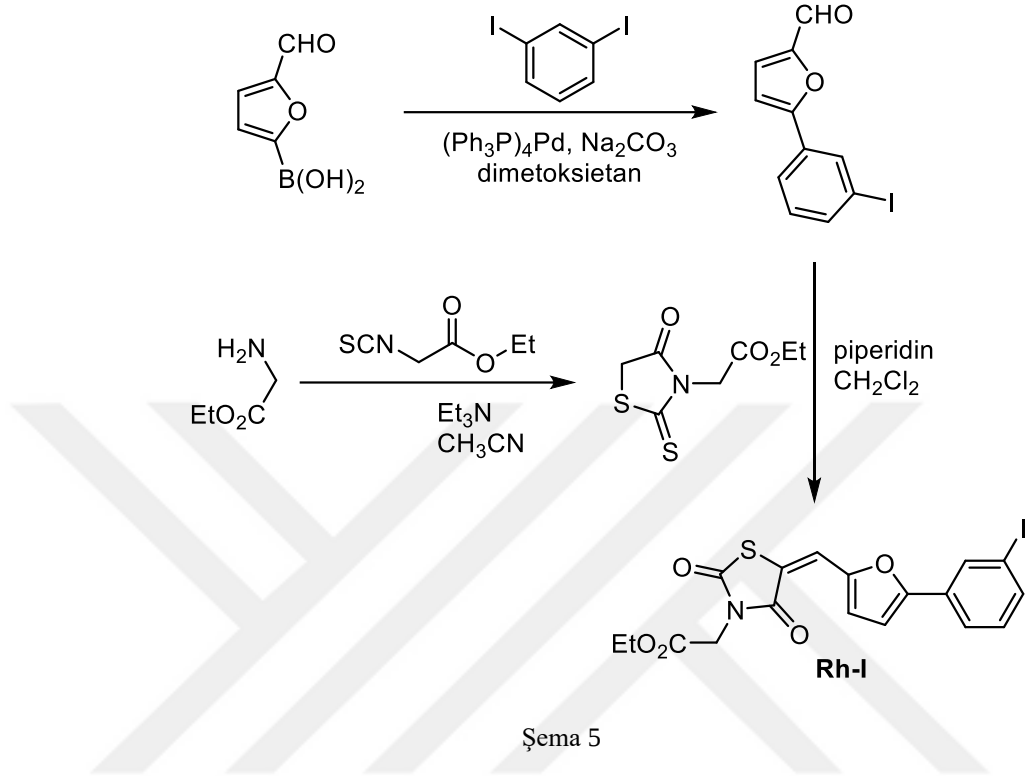
5-Ariliden-rhodaninlerin sentezi için basit, verimli ve çevreci bir diğer yaklaşım ise Bouregghda vd. tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada rhodanine (1) ve aldehitlerin etanol içerisindeki reaksiyonları Na_2SO_3 lewis asit katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir (Bouregghda et al., 2020). Görüldüğü gibi birçok grup 5-sübstütüe-rhodanin türevlerinin daha yüksek verimlerle elde edilebilmeleri için etkili katalizör ve/veya çözücü sistemlerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Genel itibariyle baz katalizörlüğünde gerçekleştirilen sentez yaklaşımları ağır basmaktadır. İlaç keşfinde oldukça değerli olan rhodanine türevlerinin daha çevreci katalizör sistemleri ve ılıman reaksiyon şartları altında sentezlenmesi oldukça önemlidir. Devi ve grubu rhodanine (1) ile aldehitlerin su içerisindeki reaksiyonlarını inceleyerek aldol tipi reaksiyonlar neticesinde 5-aril-sübstütüe-alkol türevlerinin sentezini ilk olarak rapor etmişlerdir (Şema 4) (Devi and Devi, 2018). Bu çalışmada tek dezavantajlı durum kullanılan aldehitlerin neredeyse tamamının elektron çekiçi gruplar ihtiva ediyor olmalarıdır.



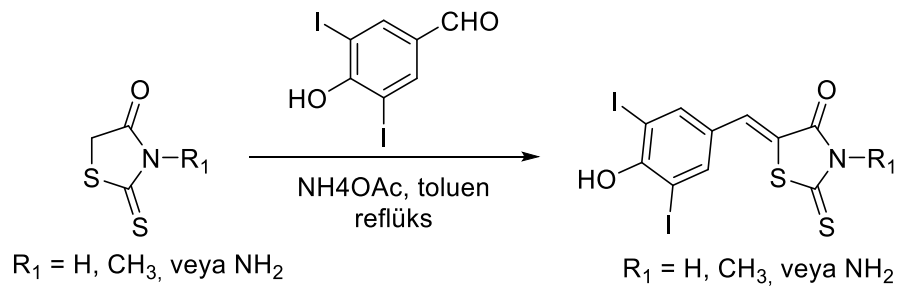
Şema 4

Alzheimer hastalığı (AH), β -amiloid ($\text{A}\beta$) peptitlerinden oluşan bol miktarda senil plaklar (SP'ler) ve beyinde yüksek oranda fosforile edilmiş tau proteinlerinin filamentleri tarafından oluşturulan sayısız nörofibriller yumaklar (NFT'ler) ile karakterize ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Şu anda, yalnızca AD'nin kesin teyidi, beyindeki SP'lerin ve NFT'lerin ölüm sonrası histopatolojik incelemesine bağlıdır. Bunun için, Ono vd. yeni bir dizi rhodanin (Rh) türevlerini Alzheimer hastalığı (AH) olan hastaların beyinlerindeki tau patolojisini saptamak için tasarlanmış ve sentezlenmiştir (Ono et al., 2011). Tau ve β -amiloid ($\text{A}\beta$) agregatlarının kullanıldığı *in vitro* deneylerde, sentezlenen yeni 5-sübstütüe-rhodanin türevlerinin tau agregatlarına karşı yüksek spesifik bağlanma gösterdiğini

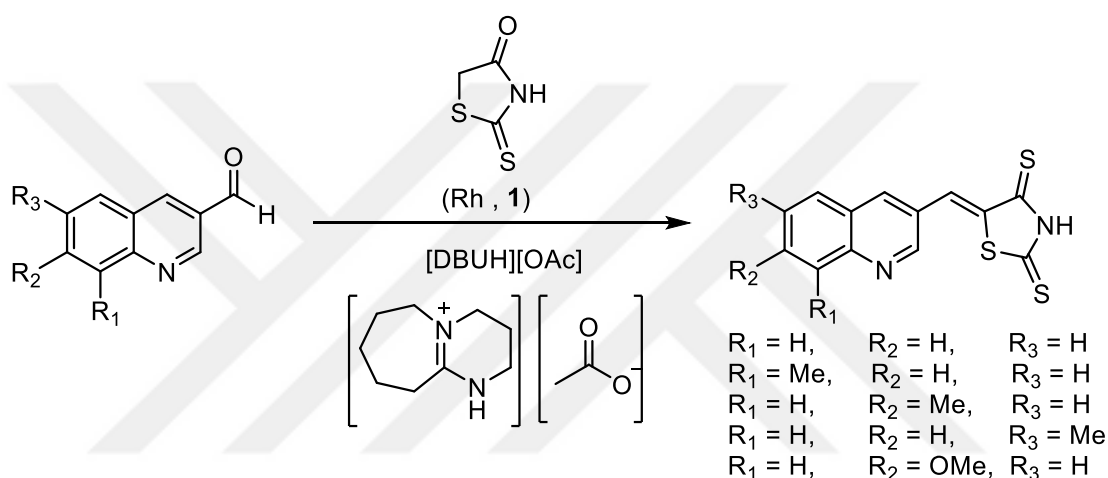
belirlemişler. Hedef 5-Ar-Rh türevi birbirini takip eden beş basamaklı reaksiyon serisi sonucunda elde etmişlerdir (Şema 5).



Rhodanin (**1**) ve 3-amino-rhodanin (**2**, 3-NH₂-Rh) temelli biyolojik bileşiklerin sentezi üzerine diğer bir çalışma ise sim ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Russell vd. insan arilamin N-asetiltransferaz enziminin seçici inhibitörleri olarak bir dizi rhodanin türevinin sentezini gerçekleştirmişlerdir (Russell et al., 2009). Bu sayede, tanımlanan en güçlü inhibitörler olan submikromolarla kıyaslandığında etkili sayılabilecek yeni inhibitörlerin literatüre kazandırılmasını sağlamışlardır (Şema 6).

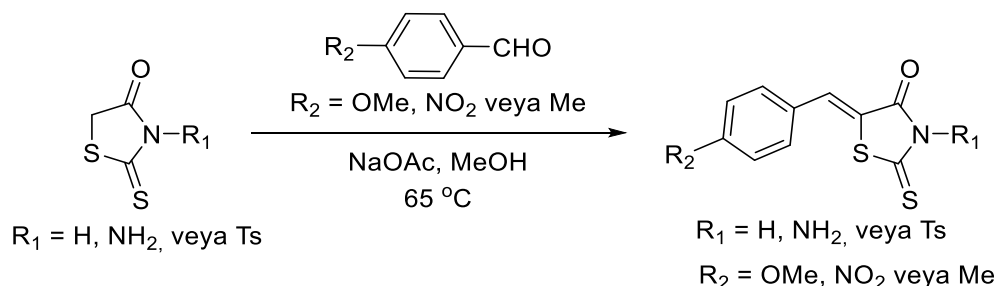


Rhodanin (Rh, **1**) gibi, kinolin, indole, oksindol vb. heterosiklik bileşikler de önemli biyolojik aktiviteye sahip organik bileşiklerin yapısında yaygın olarak bulunmaktadır. Dolayısıyla yeni ilaç analoglarının sentezinde bu önemli heterosiklik bileşiklerin bir veya daha fazlasını aynı anda yapısında bulunduran yeni türevlerin sentezi de büyük öneme sahiptir. Bu bağlamda Subheder vd. kinolin ve rhodanine iskeletlerini yapısında taşıyan yeni bir seri molekül sentezleyerek *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (MTB) (ATCC 25177) ve *Mycobacterium bovis* BCG'ye (ATCC 35743) karşı antitüberküler aktivitelerini incelemişlerdir (Şema 7) (Subheder et al., 2017).



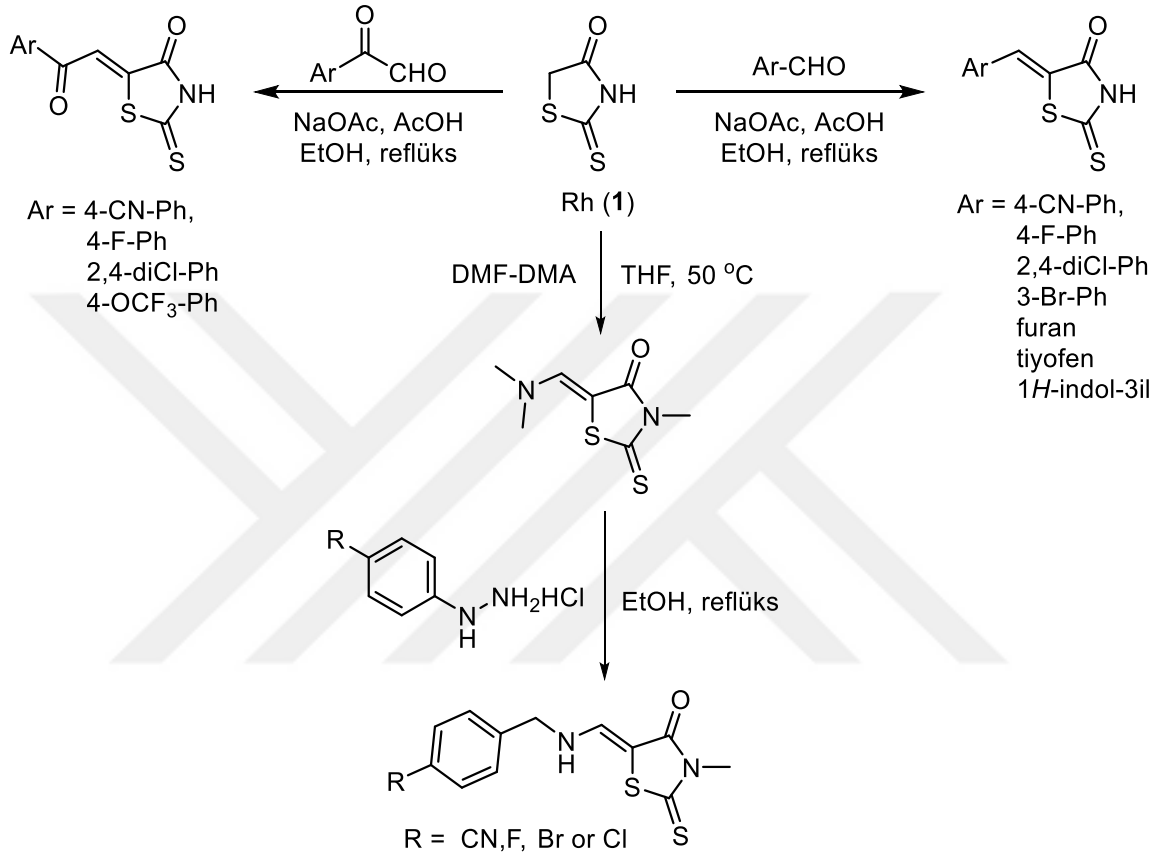
Şema 7

Rhodanin (**1**)'in üzerine oldukça fazla sayıda çalışma olmasına karşın 3-amino-rhodanin (**2**, 3-NH₂-Rh) üzerine oldukça sınırlı sayıda çalışma vardır. Bunlardan bir tanesi de Wang ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (Powers et al., 2006). Bu çalışma kapsamında sentezi gerçekleştirilen bir dizi 3,5-disüstitüe rhodanine türevinin HCV RNA polimeraz için yeni etkili inhibitörler olabileceği rapor edilmiştir (Şema 8).



Şema 8

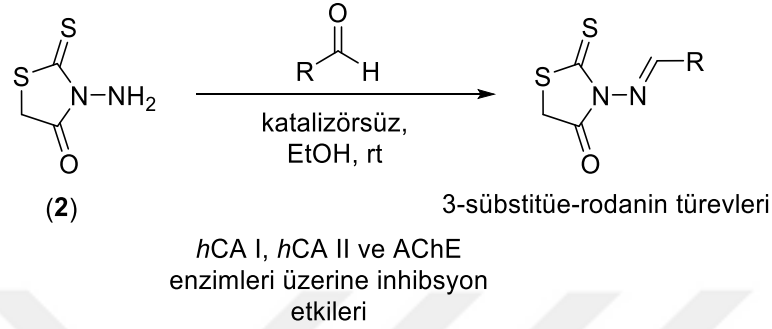
Rhodanin türevlerinin antimikrobiyal, antiviral, antifungal vb. aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Akunuri vd. geniş yelpazede 5-sübsitüe-rhodanin türevlerinin sentezini gerçekleştirerek *S. aureus* ve *A. baumannii* karşı antibakteriyel özelliklerini incelemiştir (Şema 9) (Akunuri et al., 2022).



Şema 9

Son zamanlarda, CA'ların aktivitesinin inhibisyonu; antitümör, antiglokom ilaçları, antiobezite, antikonvülzan faktörler ve teşhis araçları gibi çeşitli tıbbi uygulamalar için kayda değer amaçlara sahiptir. Öte yandan, 3-sübsitüe-rhodanin sentezinde asit katalizörlüğünde Knoevenagel reaksiyon mekanizması kullanılarak yapılan yöntemde verimliliğin düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kullanılan bu yöntemin daha az çevreci ve daha fazla maliyetli olduğu tespit edilmiştir. Katalizörün kullanılmadığı verimliliğin daha yüksek olduğu, maliyetin daha az ve daha çevreci bir yöntem olan Knoevenagel reaksiyon mekanizması yöntemiyle 3-sübsitüe-rhodanin türevi elde edilmiştir (Şema 10). Burada, 3-sübsitüe-rhodanin türevlerinin sentezi; 10 mL etanol içerisinde çözünmüş halde bulunan

aldehit türevlerinin üzerine yine saf etanol içerisinde çözülmüş halde bulunan 3-NH₂-Rh (2) bir damlatma hunisi yardımıyla eklenmesini takiben, elde edilen karışım oda sıcaklığında 4 ile 12 saat aralığında karıştırılmasını takiben kristalizasyon işlemi neticesinde gerçekleştirilmiştir (Bayındır vd., 2019c).



Şema 10

İnsan CA enzimi, başta solunum ve karboksilasyon tepkimeleri olmak üzere vücut sıvısının dengelenmesi, pH düzenleme, bikarbonat sentezi, kemik gelişimi, kireçlenme gibi fizyolojik süreçlerde önemli roller oynamaktadır (Gülçin et al., 2016). İnsan CA enzimi üzerinde yapılan birçok inhibisyon çalışmalarının kayda değer sonuç vermeleri neticesinde, enzimin potansiyel inhibitörlerinin sentezlenmesine de hız verilmiştir. Bu kapsamda sentezlenen inhibitör maddelerin başta glukom tedavisinde kullanılmak üzere antitümör, antiülser ve diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici olarak kullanılmaları söz konusudur. Bu nedenle CA enziminin inhibisyon mekanizmasının aydınlatılması ve organik yeni bileşiklerin sentezlenmesi daha popüler çalışma konusu haline gelmiştir (Supuran and Scozzafava, 2001; Göksu vd., 2014; Huyut vd., 2017). Birçok kimyasal madde ve ilaçlar tarafından CA enziminin aktivasyon ve inhibisyon etkileri bilim insanları tarafından araştırılmış ve rapor edilmiştir (Bayındır et al., 2019a; Turkan et al., 2019; Taslimi et al., 2018a; Gülçin et al., 2004). Bu çalışmalardan bazıları aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

Ekinci ve grubu (2013), yapmış oldukları bir çalışmada tiyazolidin temelli organik bileşiklerinin *hCA* enzimini inhibe etme özelliğini incelemişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışma neticesinde tiyazolidin-4-on türevlerin etkili birer *hCA* enzim inhibitörü olduklarını ortaya koymuştur. Benzer diğer bir çalışma ise, Akocak ve grubu (2018),

tarafından gerçekleştirilmiştir. Benzensülfanoik asit ve benzoik asit türevleri olan organik moleküllerin *hCA* enzimini inhibe edecek S ve N yan gruplara sahip olmalarının da inhibisyon üzerine oldukça fazla etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Vats ve arkadaşlarının yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise, hidroksimetil, karboksilikasit, karboksilikasit hidrozit, karboksiamit ile benzensülfonamit içeren 1,2,3-triazol karboksilat türevleri sentezlenerek, bu organik bileşiklerin CA I, CA II, CA IV ve CA IX 'a karşı inhibisyon etkileri incelemiştir (Vats et al., 2018).

Diğer bir çalışmada ise, Bulut et al., (2018) 4-amino-1,2,-triazol-3-tiyol moleküllerini sentezlemiş ve antioksidan özellikleriyle beraber CA ve asetilkolinesteraz (AChE) enzimleri üzerine inhibisyon etkilerini spektrofotometrik olarak incelemiştir. Sentezlenen bileşiklerin enzimlere karşı güçlü bir inhibisyon sergiledikleri belirlenmiştir.

Taslimi et al., (2018b) tarafından yapılan bir çalışmada N,N'-bis-siyanometilamin ve alkoksimetilamin türevleri sentezlenerek CA I, CA II, AChE ve bütirilkolin esteraz (BChE) enzim aktiviteleri üzerine bu maddelerin inhibisyon etkilerinin nM seviyede olduğunu rapor etmişler.

Yapılan bir çalışmada CA I, CA II, AChE ve α -glukozidaz enzim aktiviteleri üzerine bazı pirazol türevlerinin inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, insan CA I ve II izoenzimi için pozitif kontrol olarak kullanılan asetazolamid bileşiğine nispeten pirazol türevlerinin daha etkili inhibisyon profilleri sergilediği tespit edilmiştir (Türkan et al. 2018).

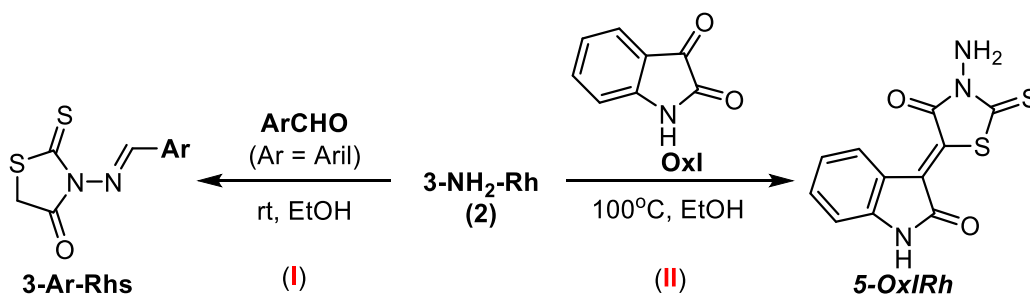
2.1. Çalışmanın Amacı

Rhodanin türevleri biyolojik aktiviteleri ve teknolojik uygulamaları nedeniyle büyük öneme sahiptir. Ek olarak, Knoevenagel kondenzasyon reaksiyonu, sentetik organik kimyada 5-ikameli rhodanin gibi çeşitli önemli tıbbi ürünlerin üretimine izin veren C-C bağı oluşumu için oldukça önemli prosedürlerden biridir. Bayındır ve grubu tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 3-NH₂-Rh (2) ve isatinin reaksiyonlarını farklı koşullar altında incelemiş ve reaksiyonlar sonucunda bir Knoevenagel kondenzasyon ürünü olan 5-

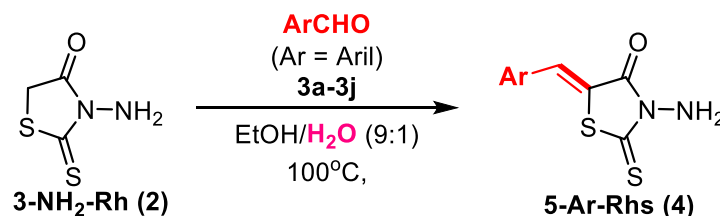
oksiindol-rhodanin (5-OxIRh) türevini elde etmişlerdir (Şekil 2.11). Bayindir ve grubu yine bu çalışma ışığında, 3-NH₂-Rh (2)'nin aldehytler ile farklı reaksiyon koşullarındaki reaksiyonlarını incelemişlerdir. Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda, 3-NH₂-Rh (2)'nin aldehytlerle oda sıcaklığında katalizörsüz veya CH₃CO₂H katalizör reaksiyonlarından N-ikameli-rhodaninlerin (3-Ar-Rhs) sentezini gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.11). Bu bağlamda, bu çalışmanın öncülleri arasında yer alan optimizasyon çalışmaları sonucunda 3-NH₂-Rh'nin katalizörsüz reaksiyonlarından rhodanin bazlı imin türevinin sentezlenebileceği yeni bir Çevreci yaklaşım yöntemi geliştirilmiştir.

Çevreci bir yaklaşımla 3-NH₂-Rh (2)'nin daha nükleofilik NH₂'si yerine C5 konumundan bölgesel seçici reaksiyonu önemli bir zorluğu temsil etmektedir. Bu bağlamda, çalışmanın bu kısmında, katalizör içermeyen koşullar altında 3-NH₂-Rh (2) ile çözücü destekli ve kontrollü bölgesel seçici süstitüsyon reaksiyonlarını inceledik. Ayrıca, yeni 5-Ar-Rhs'nin sitozolik karbonik anhidraz (hCA'lar) I ve II izoformlarına karşı enzim inhibisyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir.

(A) Önceki çalışmalar: **5-OxIRh**, **3-Ar-Rhs** türevlerinin sentezi ve enzim (hCA, AChE, G6PG ve 6PGD) inhibisyon çalışmaları



(B) Bu çalışma: 3-amino-rhodanin (2)'nin aldehytlerle su destekli Knoevenagel kondenzasyon reaksiyonları



Şekil 2. 1. N- ve 5-süstitüe-rhodanin türevlerinin sentez stratejileri

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Genel Yöntemler

^1H ve ^{13}C NMR spektrumları 400 MHz Varian Mercury, 400 MHz ve 600 MHz Bruker marka cihazlarda alınmış ve TMS standart alınarak δ ölçü biriminde verilmiştir. Katı maddelerin erime noktası Gallenkamp MPD 350 erime noktası tayin cihazı ile belirlenmiştir. IR spektrumları Perkin-Elmer FT-IR spektrofotometresinde KBr peletleri veya ATR ile kaydedilmiş ve dalga sayıları cm^{-1} biriminde verilmiştir. Saflaştırma işlemleri kolon kromatografisi [Merck Silika Jel 60 (70-230 mesh)] ve kromatotron (Harrison Research Chromatotron, Silikajel 60 PF254, 1, 2 ve 4 mm) ile gerçekleştirildi. TLC (İnce tabaka kromatografisi) analizleri silika jel kaplanmış alüminyum tabakalar (Merck, Silikajel 60 PF254, 20×20 cm) ile yapılmış ve 254 ve 356 nm UV lambası ile görüntülenmiştir. Kullanılan çözücüler standart metodlar ile saflaştırılmış ve düşük basınçta (20°C, 20 Torr) uzaklaştırılmıştır (Amarego, 1996). UV-vis spektrumları, bir Shimadzu UV-3101PL UV-vis-NIR spektrometresinde kaydedildi.

Ayrıca *hCA* I ve II enzimlerini saflaştırılması ve inhibisyon çalışmalarında pH metre (Hanna Instrument), Otomatik pipetler (Eppendorf), Çalkalayıcı (Nüve SL 350), Vorteks (Heidolph Reax Top Vortex), Distile su cihazı (GFL 2001/4) kullanılmıştır. Sentez ve biyokimyasal çalışmalarda kullanılan bütün kimyasallar (standart serum albümin, sodyum bikarbonat, sodyum hidroksit, Tris, sodyum perklorat, sodyum sülfat, sodyum asetat, brom timol mavisi, 2-merkaptoetanol, sülfirik asit, hidroklorik asit, fosforik asit, metanol, etanol, sodyum barbital, Coomassie brilliant blue G-250, N,N'-metilen bisakrilamit, akrilamit ve kullanılan diğer kimyasallar) Sigma-Aldrich ve Merk'ten temin edilmiştir. P-nitrofenil asetat ise Alfa Aesar'den satın alındı.

3.2. Deneyler

3.2.1. 5-Aril-Rhodaninlerin (5-Ar-Rhs) Sentezi için Genel Prosedür

3-Amino-rhodanin (3-NH₂-Rh, **2**) EtOH/H₂O (v/v : 9/1, 10 mL) çözeltisi içerisinde yaklaşık 30 dakika geri akıtıldı. Ardından, 3-NH₂-Rh çözeltisine etanol/su (h/h: 9/1, 10 mL) içindeki ilgili aldehit (**3a-3j**, 1.0 eşdeğer) çözeltisi damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı, bir gece boyunca katalizör olmadan 100°C'de karıştırıldı ve TLC ile izlendi. Daha sonra karışım ürünü EtOH'den yeniden kristalleştirildi. Kristalleştirmeden sonra 5-Ar-Rh türevleri (**4a-4j**) aşağıdaki gibi elde edildi. (*Not: Reaksiyonlarda 100 mg (0.68 mmol) 3-NH₂-Rh ve karşılık gelen aldehit eşdeğer miktarı kullanılmış ve reaksiyon verimleri buna göre hesaplanmıştır.*)

(Z)-3-amino-5-(4-metoksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4a): 5-Ar-Rh türevi **4a** %78 verimle açık sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 270-271°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.81 (s, =CH, 1H), 7.62 (m, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.12 (m, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 5.95 (s, NH₂, 2H), 3.84 (s, OCH₃, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 187.21, 163.75, 161.56, 133.58, 133.02, 125.52, 116.84, 115.14, 55.58

ESI-MS C₁₁H₁₀N₂O₂S₂ (m/z) [M+H]⁺ = 267.03

IR (ATR, cm⁻¹): 3048 cm⁻¹ (NH₂, uzama), 1722 cm⁻¹ (C=O), 1600 cm⁻¹ (NH₂, makas), 1573 cm⁻¹ (C=C), 1421, 1321 cm⁻¹ (C=S), 1259 cm⁻¹ (C-O), 806 cm⁻¹ (C-C, germe), 766 cm⁻¹ (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(4-metilbenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4b): 5-Ar-Rh türevi **4b** %73 verimle açık sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 201-202°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.82 (s, =CH, 1H), 7.56 (m, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.38 (m, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 5.94 (s, NH_2 , 2H), 2.37 (s, CH_3 , 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 187.84, 169.65, 143.56, 133.64, 129.76, 129.11, 128.89, 117.15, 21.28

ESI-MS $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}_2$ (m/z) $[\text{M}]^+ = 250.04$

IR (ATR, cm^{-1}): 3025 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 2972 cm^{-1} (CH_3 , sp^3), 1709 cm^{-1} (C=O), 1597 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1571 cm^{-1} (C=C), 1441 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} (C=S), 1260 cm^{-1} (C-O), 804 cm^{-1} (C-C , germe), 748 cm^{-1} (NH , sallanma)

((Z)-3-amino-5-(2-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4c): 5-Ar-Rh türevi **4c** %61 verimle beyaz bir katı olarak elde edildi. Mp. = 225-226°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.23 (d, $J = 7.7$ Hz, =CH, 1H), 8.09 (s, =CH, 1H), 7.90 (t, $J = 7.7$ Hz, =CH, 1H), 7.72-7.77 (m, =CH, 2H), 5.95 (s, NH_2 , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 188.36, 163.00, 147.84, 134.65, 131.40, 130.00, 129.58, 128.54, 125.58, 124.78

ESI-MS $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 282.31$

IR (KBr, cm^{-1}): 3085 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 1726 cm^{-1} (C=O), 1596 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1417 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} , 1321 cm^{-1} (C=S), 1257 cm^{-1} (C-O), 1237 cm^{-1} , 1217 cm^{-1} , 802 cm^{-1} (C-C , germe), 714 cm^{-1} (NH , sallanma)

(Z)-3-amino-5-(3-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4d): 5-Ar-Rh türevi **4d** %79 verimle sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 190-191°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.50 (s, =CH, 1H), 8.32 (d, J = 8.3 Hz, =CH, 1H), 8.05 (d, J = 8.3 Hz, =CH, 1H), 8.01 (s, =CH, 1H), 7.84 (t, J = 8.3 Hz, =CH, 1H), 5.96 (s, NH_2 , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 187.92, 164.05, 148.81, 136.35, 135.04, 131.56, 131.19, 125.56, 125.37, 123.02

ESI-MS $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}]^+ = 280.98$

IR (KBr, cm^{-1}): 3429 cm^{-1} , 3066 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 1709 cm^{-1} (C=O), 1614 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1581 cm^{-1} , 1438 cm^{-1} , 1316 cm^{-1} (C=S), 1280 cm^{-1} (C-O), 1235 cm^{-1} , 1210 cm^{-1} , 831 cm^{-1} (C-H, sallanma), 719 cm^{-1} (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(4-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4e): 5-Ar-Rh türevi **4e** %81 verimle sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 222-223°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.36 (m, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.97 (s, =CH, 1H), 7.92 (m, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 5.96 (s, NH_2 , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 187.51, 163.55, 147.63, 139.03, 131.52, 130.26, 124.66, 124.35

ESI-MS $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 282.01$

IR (KBr, cm^{-1}): 3087 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 1712 cm^{-1} (C=O), 1598 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1571 cm^{-1} , 1418 cm^{-1} , 1351 cm^{-1} (C=S), 1282 cm^{-1} (C-O), 1217 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 803 cm^{-1} (C-C, germe), 712 cm^{-1} (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(4-hidroksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4f): 5-Ar-Rh türevi **4f** %76 verimle açık sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 212-213°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.52 (s, OH, 1H), 7.76 (s, =CH, 1H), 7.53 (m, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 6.94 (m, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 5.92 (bs, NH₂, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 187.64, 164.30, 161.15, 134.65, 133.94, 124.54, 117.12, 116.05

ESI-MS $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}+2\text{H}]^+ = 254.32$

IR (KBr, cm^{-1}): 3300 cm^{-1} (O-H), 3107 cm^{-1} (NH₂, uzama), 1693 cm^{-1} (C=O), 1600 cm^{-1} (NH₂, makas), 1574 cm^{-1} , 1471 cm^{-1} , 1409 cm^{-1} (C=S), 1285 cm^{-1} (C-O), 1240 cm^{-1} , 1214 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 820 cm^{-1} (C-C, germe), 725 cm^{-1} (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-on (4g): 5-Ar-Rh türevi **4g** %54 verimle açık kırmızı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 263-264°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.59 (s, OH, 1H), 7.87 (s, =CH, 1H), 7.41 (s, =CH, 1H), 7.28 (d, $J = 8.2$ Hz, =CH, 1H), 7.07 (d, $J = 8.2$ Hz, =CH, 1H), 5.94 (s, NH₂, 2H), 3.86 (s, OCH₃, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 186.34, 169.75, 152.26, 146.96, 133.20, 124.40, 123.51, 118.21, 113.00, 111.75, 55.66

ESI-MS $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}+2\text{H}]^+ = 284.03$

IR (KBr, cm^{-1}): 3315 cm^{-1} (O-H), 3054 cm^{-1} (NH₂, uzama), 2917 cm^{-1} (CH, sp^3), 1727 cm^{-1} (C=O), 1597 cm^{-1} (NH₂, makas), 1585 cm^{-1} , 1471 cm^{-1} , 1419 cm^{-1} (C=S), 1284 cm^{-1} (C-O), 1225 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} , 814 cm^{-1} (C-C, germe), 732 cm^{-1} (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(tiofen-2-ilmetilen)-2-tioksotiazolidin-4-on (4h): 5-Ar-Rh türevi **4h** %82 verimle sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 201-202°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.14 (s, =CH, 1H), 8.12 (d, J = 5.0 Hz, =CH, 1H), 7.78 (d, J = 3.4 Hz, =CH, 1H), 7.32 (t, J = 4.4 Hz, =CH, 1H), 5.93 (s, NH_2 , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 186.54, 163.45, 137.25, 136.04, 134.94, 129.33, 126.51, 117.50

ESI-MS $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{OS}_3$ (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 243.34$

IR (KBr, cm^{-1}): 3331 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 3023 cm^{-1} , 1698 cm^{-1} (C=O), 1586 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1585 cm^{-1} , 1408 cm^{-1} (C=S), 1221 cm^{-1} , 1041 cm^{-1} , 800 cm^{-1} (C-C, germe), 706 cm^{-1} (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(furan-2-ilmetilen)-2-tioksotiazolidin-4-on (4i): 5-Ar-Rh türevi **4i** %78 verimle açık sarı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 182-183°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.14 (s, =CH, 1H), 7.70 (m, =CH, 1H), 7.23 (m, =CH, 1H), 6.79 (m, =CH, 1H), 5.91 (s, NH_2 , 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 186.64, 163.57, 137.40, 136.14, 135.04, 129.44, 126.60, 117.61

ESI-MS $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 227.28$

IR (KBr, cm^{-1}): 3310 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 3312 cm^{-1} , 3024 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} (C=O), 1586 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1408 cm^{-1} (C=S), 1326 cm^{-1} (C-O), 1204 cm^{-1} , 1041 cm^{-1} , 801 cm^{-1} (C-C, germe), 706 cm^{-1} (NH, sallanma)

(Z)-3-amino-5-(piridin-4-ilmetilen)-2-tioksotiazolidin-4-on (4j): 5-Ar-Rh türevi **4j** %81 verimle açık kırmızı bir katı olarak elde edildi. Mp. = 195-196°C.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.73 (m, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.81 (s, =CH, 1H), 7.57 (m, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 5.96 (bs, NH_2 , 2H)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 187.59, 163.51, 150.72, 139.79, 129.93, 125.37, 123.71

ESI-MS $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}_2$ (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 238.31$

IR (KBr, cm^{-1}): 3196 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 1705 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1594 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1415 cm^{-1} ($\text{C}=\text{S}$), 1320 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$), 1251 cm^{-1} , 1218 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 802 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}$, germe), 714 cm^{-1} (NH , sallanma)

3-Amino-5-(hidroksi(piridin-4-il)metil)-2-tioksotiazolidin-4-on (6j): 3- NH_2 -Rh (**2**, 100 mg, 0.68 mmol)'nin EtOH/ H_2O (v/v : 9/1, 10 mL) içerisindeki çözeltisine izonikotinaldehit (**3j**, 72 mg, 0.68 mmol) solüsyonundan damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı, gece boyunca katalizör olmadan oda sıcaklığında (rt) karıştırıldı ve TLC ile izlendi. Ham karışım, CH_2Cl_2 /heksan (4:6) kullanılarak silis jel kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Alkol ürünü **6j** (101 mg, %58 verim, mp: 183-184 °C), beyaz bir katı olarak birinci fraksiyondan elde edilirken, ikinci fraksiyondan ise 5-Ar-Rh **4j** (41 mg, %25 verim) elde edildi.

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.58 (m, AB sisteminin A kısmı, =CH, 2H), 7.45 (m, AB sisteminin B kısmı, =CH, 2H), 6.52 (d, $J = 4.0$ Hz, CH, 1H), 5.81 (s, NH_2 , 2H), 5.48 (m, OH, 1H), 5.12 (d, $J = 4.0$ Hz, CH, 1H)

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 196.67, 170.82, 150.22, 149.63, 120.96, 69.09, 55.62

ESI-MS $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ (m/z) $[\text{M}+2\text{H}]^+ = 257.34$

IR (KBr, cm^{-1}): 3299 cm^{-1} (O-H), 3117 cm^{-1} (NH_2 , uzama), 3266 cm^{-1} , 1722 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1607 cm^{-1} (NH_2 , makas), 1573 cm^{-1} , 1416 cm^{-1} ($\text{C}=\text{S}$), 1318 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$), 1238 cm^{-1} , 1186 cm^{-1} , 1062 cm^{-1} , 809 cm^{-1} ($\text{C}-\text{C}$, germe), 715 cm^{-1} (NH , sallanma)

(E)-3-((4-metoksibenziliden)amino)-2-tioksotiazolidin-4-on (5a): 3- NH_2 -Rh (100 mg, 0.68 mmol, **2**)'nin EtOH/ H_2O (v/v: 9/1, 10 mL) içerisindeki çözeltisine 4-metoksibenzaldehit (**3a**, 92 mg, 0.68 mmol) çözeltisi damla damla ilave edildi. Reaksiyon

karişımı, bir gece boyunca katalizör olmadan oda sıcaklığında (rt) kariştirıldı ve TLC ile izlendi. Daha sonra karişım ürünü EtOH üzerinden kristalleştirildi ve 3-Ar-Rh türevi **5a** sarı renkli katı olarak elde edildi. Mp. 166-167°C.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.60 (s, N=CH, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.7 Hz, =CH, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, =CH, 2H), 4.36 (s, CH₂, 2H), 3.86 (s, OCH₃, 3H)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 196.8, 170.3, 169.7, 163.1, 130.9, 124.3, 114.7, 55.6, 34.6.

3.2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılacak olan 0,2 M NaHCO₃ (pH = 8,8) tampon çözeltisi literatür ışığında; *“16,8 g NaHCO₃, 950 mL destile suda çözülerek, 1N NaOH ile pH:8,8’e titre edildikten sonra, toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.”*

CO₂-hidrataz aktivitesi ölçümünde kullanılacak olan Na₂CO₃/ NaHCO₃ (pH = 10) tampon çözeltisi literatür ışığında; *“15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4 g (0,1 mol) NaHCO₃’ın 1 litre saf suda çözülmesiyle hazırlandı.”*

Afinite jelinin dengelenmesi ve hemolîsatin tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılacak olan Tris-HCl/Na₂SO₄ (pH = 8,7) tampon çözeltisi literatür ışığında; *“3,03 g Tris ve 14,2 g Na₂SO₄’ün 950 mL destile suda içerisindeki çözeltisi 1 N HCl ile pH = 8,7’ye getirildikten sonra destile su ile 1 litreye tamamlanması sonucunda hazırlandı.”*

Kolona tutulmuş hCA I izoenziminin elüsyonunda kullanılacak olan Na₂HPO₄/NaCl (pH = 6,3) tampon çözeltisi literatür ışığında; *“2,2 g Na₂HPO₄ ve 14,63 g NaCl alınıp, pH = 6,3 olacak şekilde titre edildikten sonra toplam hacim 250 mL’ye destile su ile tamamlanarak hazırlandı.”*

Kolona tutulmuş hCA II izoenziminin elüsyonunda kullanılacak olan CH₃CO₂Na/NaClO₄ (pH = 5,6) tampon çözeltisi literatüre göre; *“9,2 g NaClO₄ ve 2,04 g CH₃CO₂Na × 3 H₂O*

120 mL destile su içerisinde çözülerek, 1 N HCl ile pH'sı 5,6 ya kadar titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı."

Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılacak olan Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi literatür ışığında; *"100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü, bu çözeltiye %95'lik fosforik asit ilave edilmesini takiben çözeltinin hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı."*

Veronal (0,025 M) tamponu literatür ışığında; *"5,17 gram sodyum barbitalin 950 mL suda çözülmesini takiben 0,1 M HCl ile titre edilerek pH = 8,2'ye ayarlanmasını takiben destile su ile 1 L'ye tamamlandı."*

CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılacak olan CO₂ çözeltisi literatür ışığında; *"0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı."*

CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılacak olan indiktor çözeltisi literatür ışığında; *"0,0125 g fenol kırmızısı ve 0,22 g NaHCO₃ ün 1 L saf suda çözünmesiyle hazırlandı."*

Brom Timol Mavisi Çözeltisi (%0,04) literatür ışığında; *"0,1 g indikatörün 16 mL 0,01 N NaOH içinde çözüldükten sonra hacminin saf su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı."*

SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu literatür ışığında; *"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 merkaptetoetanol ilave edildi."*

SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu literatür ışığında; *"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 tamamlanarak hazırlandı."*

Akrilamit-Bisakrilamit çözeltisi literatür ışığında; “30 g akrilamit ve 0,8 g bisakrilamit karışımı 100 mL suda çözülerek hazırlandı.”

Elektroforez jelinin boyanması için kullanılacak olan boyama çözeltisi literatür ışığında; “0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.”

SDS çözeltisi (%10) literatür ışığında; “10 g SDS 90 g saf suda çözülerek hazırlandı.”

Tris-HCl (3 M, pH = 8,8) çözeltisi literatürde belirtildiği gibi; “36,3 g Tris numunesinin 1 M’lık HCl (48 mL) çözeltisi ile hazırlanan karışımın 100 mL’ye tamamlanması sonucu hazırlanmıştır.”

Jel fiksasyon çözeltisi literatür ışığında; “%50 izopropil alkol, %10 TCA ve %40 su içeren bir karışım olarak hazırlandı.”

Jel yıkama çözeltisi literatür ışığında; “%50 metanol, %10 asetik asit ve %40 su içeren bir karışımı olarak hazırlandı.”

3.2.3. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Çalışmada kullanılan insan kanı Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kan Merkezi’nden temin edildi ve deney sürecinde 4°C’de muhafaza edildi.

Enzimin saflaştırılması ve aktivite ölçümlerinde kullanılan çözeltiler literatür verileri ışığında aşağıdaki gibi hazırlanmıştır. Alınan kanlar önce santrifüj tüplerine eşit hacimlerde dolduruldu daha sonra 2500xg’de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.

Santrifüj işleminden sonra üst kısımda bulunan plazma ve lökosit tabakası dikkatli bir şekilde bertaraf edildi, tüplerin altında kalan eritrosit peleti ise 0,154 M NaCl çözeltisi (izotonik) ile üç defa yıkandı. Her yıkama işleminde 15 dakika 2500xg’de santrifüj edildi. Sonrasında eritrositler hacimlerinin yaklaşık 5 katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. Hemolizatta bulunan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için 4°C’de 30 dakika boyunca 10.000xg’de santrifüj işlemi gerçekleştirildi.

Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırma basamakları: Santrifüj işleminden sonra elde edilen hemolizat katı Tris ile pH 8,7'ye ayarlandıktan sonra kolona yüklendi. Kolondan, ilk olarak 1 M NaCl/25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,3) tamponu geçirilerek hCA I enzimi, sonra da 0,1 M NaCH₃COO/0,5 mM NaClO₄ (pH 5,6) çözeltisi geçirilerek hCA II enzimi elde edildi. Saflaştırılan enzimler 3'er mL olacak şekilde tüplere toplanmış ve 280 nm'deki absorban değerleri ölçüldü.

3.2.4. 5-Ar-Rh Türevlerinin hCA I ve II Enzimleri Üzerine Aktivasyon Çalışmaları

3.2.4.1. hCA Enzim Aktivitesi Tayini

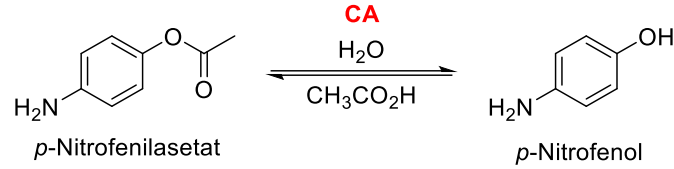
Hidrataz aktivitesi: Bu kısımda aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı (1964). Bu yöntemin esası CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesidir. Enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c 'ye bölünmesi ile enzim birimi belirlenir.

$$EU = \frac{t_0 - t_c}{t_c} \quad (1)$$

Deney esnasında kör olarak kullanılan reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu (0,025 M, pH = 8,2), brom timol mavisi (0,1 mL %0,04'lük), su (0,6 mL) ve CO₂ (2,5 mL) çözeltileri konuldu. Sonrasında bir kronometre cihazı ile CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi renginin sarı-Çevrecie dönüşmesi (pH = 6,3) için geçen süre tespit edildi (t₀).

Numune tüpünde ise suyun miktarı 0,05 mL azaltılarak yerine kolondan saflaştırılmış hCA enzim çözeltisi ilave edildi ve indikatörün mavi renkten sarı-Çevreci renge dönüşmesi (pH = 6,3) için geçen süre bir kronometre ile heaplandı (t_c). Bu yöntemde hCA aktivitesi için 1 EU enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidratasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Maren, 1960).

Esteraz aktivitesi: Bu yöntemde substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetat *hCA* enzimi tarafından 348 nm’de absorpsiyon veren *p*-nitrofenol bileşiğine hidroliz edilmektedir. Reaksiyon mekanizması aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *p*-Nitrofenilasetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması

Yapılan deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat substrat çözeltisi, günlük taze hazırlandı; 13,6 mg *p*-nitrofenilasetat, 1 mL aseton içinde çözülerek manyetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılan 24 mL saf suya yavaş yavaş ilave edildi (Tablo 3.1). Esterin sınırlı çözünürlüğü dolayısıyla bu çözelti 3 mM’lık olacak şekilde hazırlandı. Bu çözelti ışıktan çabuk etkilendiği için beher bir alüminyum folyo tarafından kaplandı (Verpoorte et al., 1967).

Tablo 3.1. Esteraz aktivitesi için 1 mL’lik kuvars küvetlere kullanılan çözeltiler

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (μL)	Numune Tipi (mL)
0,05 M Tris-SO ₄ , pH:7,4	467	467
<i>p</i> -Nitrofenol asetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim çözeltisi	-	33
Toplam hacim	1000	1000

3.2.4.2. Protein Tayini

Kalitatif Protein Tayini: Bu yöntem proteinlerin yapısında bulunan fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi aromatik aminoasitlerin 280 nm’de maksimum absorbans göstermesi prensibine dayanmaktadır (Segel, 1968). Bu yöntemde eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı okundu.

Kantitatif Protein Tayini: Hem hemolizattaki hem de saflaştırılan enzim çözeltisindeki protein miktarları bu yöntem ile araştırıldı. Coomassie Brilliant Blue G-250’nin proteine

bağlanması bu yöntemin esasını oluşturmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbens gösterir. Bu yöntemde hassasiyet 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976). Protein tayin prosedürü kısaca; 1 mg/mL protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10-100 µL alındı. Tüm tüplerin hacmi saf su ile 0,1 mL’ye tamamlandı ve daha sonra 5 mL renklendirme reaktifi tüplere ilave edilerek vorteks ile karıştırıldı. 10 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbens değerleri kaydedildi. 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.

3.2.4.3. İnhibisyon Çalışmaları

5-Ar-Rh türevlerinin, saflaştırılan *hCA* I ve II izoenzimleri üzerindeki etkileri incelendi. Ölçümler esterase aktivite tayin yöntemlerine göre belirlendi. Elde edilen sonuçlardan IC_{50} ve K_i değerleri bulunarak inhibisyon türleri belirlendi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. 5-Sübstitüe-Rhodanin Türevlerinin Eldesi

Birçok doğal ürünün ve önemli organik maddelerin yapısında yaygın olarak bulunan rhodanin türevleri üzerine yeni ve etkili sentez yöntemlerinin geliştirilmesi ve daha çevre dostu bir şekilde optimizasyonu önemlidir. Bu çalışmasının temelini Bayindir ve grubunun 3-NH₂-Rh (2) ve isatin (OxI) reaksiyonları farklı koşullar altında incelemesi ve reaksiyonlar sonucunda bir Knoevenagel Kondenzasyon ürünü olan 5-OxIRh bileşiğini tek ürün olarak elde etmeleri oluşturmaktadır. Bu çalışmalar ışığında aldehytlerin 3-NH₂-Rh (2) ile reaksiyonlarının belirli koşullar altında ne tür reaksiyon davranışlarının olabileceğini araştırdık. 3-Amino-rhodanin (3-NH₂-Rh, 2)'nin aksine rhodanin (Rh) iskeleti bazik şartlar altında aldehytlerle reaksiyonlarını C-5 pozisyonundan vermektedir. 3-NH₂-Rh (2)'nin yapısında bulunan nükleofilik serbest NH₂ grubu reaksiyonların bu şartlarda C-5 pozisyonundan vermesi önündeki en büyük dezavantajdır. Bu çalışmasının temel amacını serbest NH₂ grubunun bloke edilerek NH₂ grubu yerine bölge seçici olarak C-5 pozisyonundan yeni 5-sübstitüe-rhodanine (5-Ar-Rhs) türevlerinin elde edilebilmesidir. Bu amaçla, 3-NH₂-Rh (2) ve 4-metoksibenzaldehit (3a) model reaksiyonlar için çıkış molekülleri olarak belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları öncesinde Rh üzerinden 5-sübstitüe-rhodanin türevlerinin sentez şartlarında 3-NH₂-Rh (2)'nin reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve reaksiyonlar neticesinde hedef 5-Ar-Rh 4a'nın sırasıyla %44 ve %32 verimle elde edilmiştir. Her ne kadar hedef ürün klasik baz katalizörlüğünde elde edilebilmiş olsa da verimler kabul edilebilir bir seviyede değildir (Tablo 4.1, deney 4 ve 5). Bu klasik yaklaşımı takiben bu defa, 3-NH₂-Rh (2)'nin 3a ile etanol içinde geri akış sıcaklığında katalizörsüz reaksiyonu yapılmış ve reaksiyon sonucunda ise hedef terminal rhodanin 4a (%51) ve imin türevi 5a (%32) elde edildi (Tablo 4.1, deney 7). Bu test reaksiyonlarını takiben, önemli aromatik gruplar içeren yeni 5-Ar-Rhs 4a-4j'nin 3-NH₂-Rh (2) ve aldehytlerden başlayan çevreci bir yaklaşımla sentezini hedefledik. Bu amaçla, başlangıçta, uygun reaksiyon koşullarını belirlemek için katalizörler, çözücüler, sıcaklık ve reaktiflerin eklenme sırası gibi parametreler değiştirilerek reaksiyonlar optimize edildi. Optimizasyon çalışmaları, 3-NH₂-Rh (2) ve aldehytlerin farklı çevresel koşullar ve

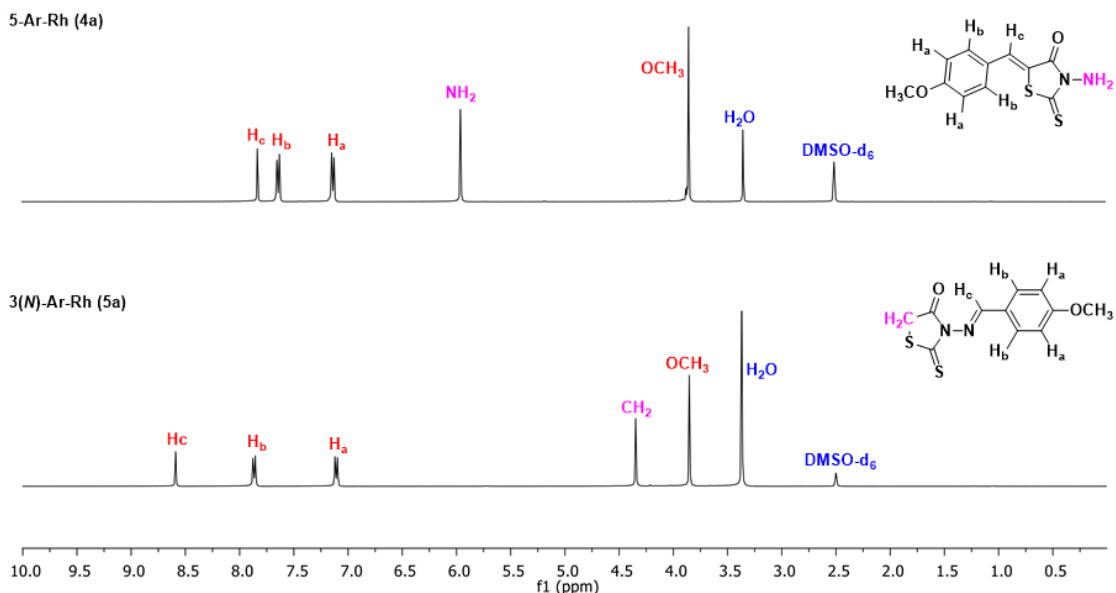
katalizörler altındaki reaksiyon davranışları hakkında önemli bilgiler vermektedir. Optimizasyon çalışmaları için daha önce de vurgulandığı gibi model olarak daha önce test edilen 3-NH₂-Rh (**2**) ve 4-metoksibenzaldehit (**3a**) reaksiyonu seçilmiş ve Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Reaksiyonlar öncelikli olarak EtOH veya EtOH/H₂O (v/v:9/1) içerisinde katalizörsüz veya asit (CH₃CO₂H) katalizörlüğünde oda sıcaklığında (rt) gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda hedef 5-Ar-Rh **4a** ürünü oluşmazken reaksiyonların tamamında 3-Ar-Rh türevi **5a**'nın oluştuğu gözlemlendi (Tablo 4.1, deney 1-4). Daha sonra, aynı solvent sistemleri altında, ancak 100°C'de reaksiyon, herhangi bir katalizör olmadan veya çeşitli solvent sistemlerinde CH₃CO₂H katalizörü ile gerçekleştirildi. Bu reaksiyonlar sonucunda, EtOH veya EtOH/H₂O çözeltilerinde CH₃CO₂H katalizörü için hedef ürün **4a**'nın %4 ve %16 gibi düşük verimlerle oluşumu gözlemlendi (Tablo 4.1, deney 9, 10). Bu umut verici sonuctan sonra, reaksiyon 100°C'de EtOH/H₂O (v/v: 9/1) ve katalizörsüz olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda hedef ürün **4a**, %78'lik yüksek bir verimle elde edildi (Tablo 4.1, deney 8). Optimizasyon çalışmaları reaksiyonların en yüksek verim, en az yan ürün elde etmek ve en ekonomik şartlarda gerçekleştirilecek reaksiyon şartlarının oluşturulması için yapılar ve organik sentez yaklaşımlarının vazgeçilmezidir. Bir diğer optimizasyon yaklaşımı ise, reaktiflerin reaksiyon ortamlarında kullanılan çözücü ve/veya katalizör sistemleri ile olumlu veya olumsuz yönde olası etkileşimlerinin kontrol edilmesidir. Bunun için, 3-NH₂-Rh (**2**) ilk olarak EtOH/H₂O (v/v: 9/1) içerisine eklenerek yaklaşık 30 dakika kaynatılmış ve etanol içerisindeki 4-metoksibenzaldehit (**3a**) bir damlatma hunisi yardımıyla bir saat içerisinde reaksiyon ortamına ilave edilerek gün aşırı 100°C'de kaynatılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1. Reaksiyon koşullarının optimizasyonu

3-NH ₂ -Rh (2)		3a		5-Ar-Rhs (4a) + 3(N)-Ar-Rhs (5a)	
		katalizör, çözücü, sıcaklık			
Deney	Katalizör	Çözücü	Sıcaklık (°C)	Verim (%) [b] (4a / 5a)	
1	-	EtOH	rt	0/81	
2	-	EtOH/H ₂ O	rt	0/48	
3	CH ₃ CO ₂ H	EtOH	rt	0/83	
4	CH ₃ CO ₂ H	EtOH/H ₂ O	rt	0/68	
5	NH ₄ OH/NH ₄ Cl	EtOH	rt	44/5	
6	NH ₄ OH/NH ₄ Cl	EtOH/H ₂ O	rt	32/2	
7*	-	EtOH	Reflüks	51/31	
8*	-	EtOH/H ₂ O	100°C	78/eser	
9	CH ₃ CO ₂ H	EtOH	Reflüks	eser /76	
10	CH ₃ CO ₂ H	EtOH/H ₂ O	100°C	16/72	

Genel koşullar (aksi belirtilmedikçe): 3-NH₂-Rh (1, 1 eşdeğer), 4-metoksibenzaldehit (3a, 1 eşdeğer, damla damla*), katalizör (0.01 eşdeğer), solvent (10 mL) ve gün aşırı. [b] İzole verimler.

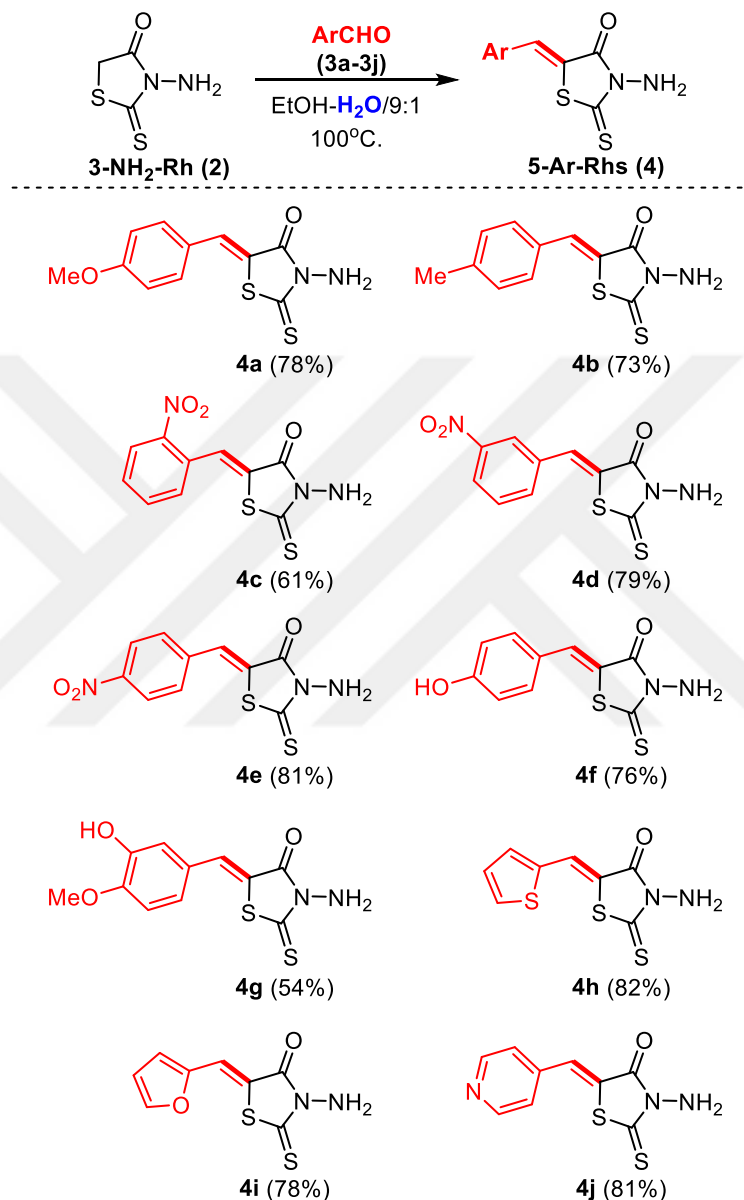
Elde edilen hedef ürün 5-Ar-Rh **4a**'nın ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR spektrumları hedef ürün **4a**'nın yapısıyla uyumludur. Hedef 5-Ar-Rh türevi **4a**'nın ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde, NH_2 (rhodanin çekirdeği) proton tepe noktasının 5.95 ppm'de rezonans olduğu görülmektedir. Öte yandan, 3-Ar-Rh türevi **5a**'nın yapısındaki CH_2 protonlarının (rhodanin çekirdeğinin C5 konumu) ise 4.36 ppm'de rezonans sinyali verdiği görülmektedir. 3-Ar-Rh **5a** için 4,36 (s, CH_2 , 2H) ppm ve 5-Ar-Rh **4a** için 5,95 (s, NH_2 , 2H) ppm rezonans sinyalleri, 3-Ar-Rh **5a**'nın bir imin türevi ve 5-Ar-Rh **4a**'nın ise bir 5-süstitüe-rhodanin türevi olduğunun en belirleyici göstergesidir (Şekil 4.1). Öte yandan, ayrıntılı prosedürler ve karakterizasyon deneysel bölümde tartışılmıştır.



Şekil 4.1. 5-Ar-Rh **4a** ve 3-Ar-Rh **5a**'nın ^1H -NMR spektrumlarının karşılaştırılması

Optimizasyon çalışmaları ışığında, reaksiyonlar için en uygun reaksiyon koşullarının EtOH/ H_2O (v/v: 9/1) içerisinde reaktiflerin sıralı eklenmesiyle 100°C 'de gün aşırı kaynatılması sonucunda su destekli reaksiyon şartlarının olduğu belirlendi. Reaksiyon verimini artırmak ve tek bir ürün elde etmek için dikkat edilmesi gereken bir diğer detay ise NH_2 grubunun deaktivasyonudur. Bunun için 3- NH_2 -Rh (**2**)'nin EtOH/ H_2O (v/v: 9/1) içinde yaklaşık 30 dakika geri akıtılmasından sonra ilgili aldehytlerin eklenmesi gerekir. Bu şekilde aktif NH_2 grubunun protonlanması ile hem aktif NH_2 grubu deaktive olur hem de 3- NH_2 -Rh (**2**)'nin C5 pozisyonundaki asidik protonu uzaklaştırmak için bir konjuge baz (HO^-) elde edilir (Şekil 4.2). Bunun üzerine, diğer hedef 5-Ar-Rh türevleri **4a-4j**'nin sentezi

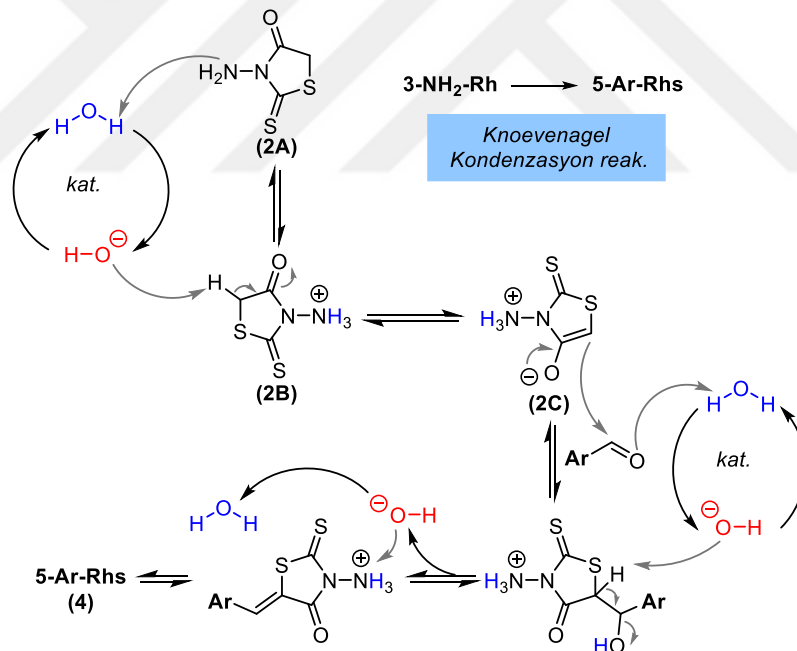
bu koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Mevcut aldehitlerle reaksiyonların bir sonucu olarak, 5-Ar-Rh türevleri **4a-4j**, %54 ile %82 arasında değişen iyi verimlerle elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. 5-Ar-Rh türevleri **4a-4j**'nin sentezi

Bir eşdeğer 3-NH₂-Rh (**2**)'nin bir eşdeğer aldehit ile reaksiyonu için makul bir mekanizma Şekil 4.3'te gösterilmektedir. Bu mekanizmada, güncellenmiş çalışmalar benzen ve heteroaromatik yan gruplar içeren aldehit türevlerinin 3-NH₂-Rh (**2**) yüksek sıcaklık ve su katalizi altında gerçekleştirilen reaksiyonlardan 3-NH₂-Rh (**2**)'nin serbest NH₂ grubu

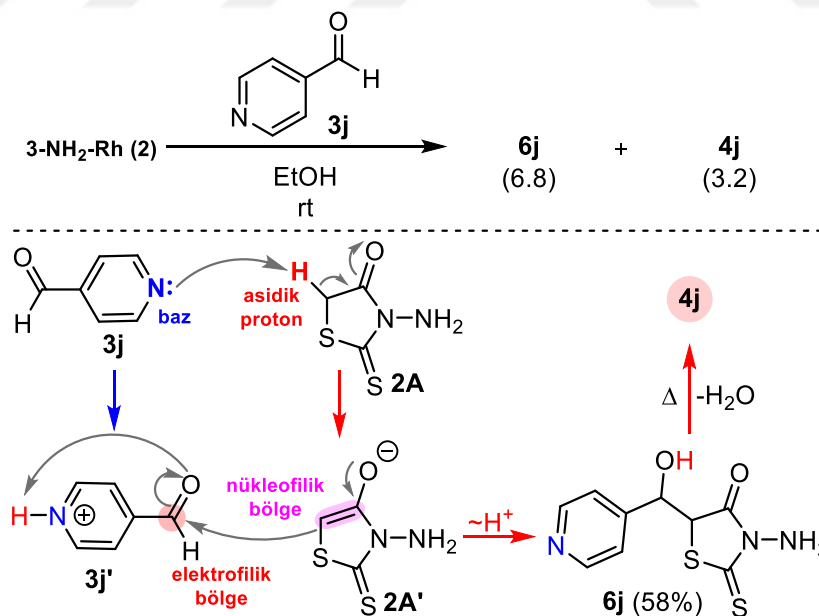
yerine C-5 pozisyonu üzerinden reaksiyona girdiğini göstermiştir. Aminlerin hidrojen bağlama yeteneği oldukça yüksektir ve bu nedenle su çözeltilerinde aminlerin reaktivitesi oldukça düşüktür. Bu bağlamda, Şekil 4.3'te önerilen reaksiyon mekanizmasının temeli, esas olarak, amin grubunun hidrojen bağları ile reaktivitesinin azaltılmasına dayanmaktadır. Bu ön bilgiler spesifik olarak detaylandırıldığında, 3-NH₂-Rh (2A)'nın yapısında bulunan NH₂ grubunun Lewis asidi olarak H₂O ile protonlanması sonucu oluşan ve aynı zamanda bir hidrasyon ürünü olan 1B ile dengede olduğu literatür tarafından desteklenmektedir. Ayrıca 3-NH₂-Rh (2A) yapısındaki NH₂ grubunun H₂O ile protonlanmasından hidroksit (OH⁻) iyonlarının oluştuğu da düşünülmektedir. Ardından, protonlanmış rhodanin 2B'nin C-5 konumunda bulunan asidik protonu alan hidroksit iyonlarının bir enolat ürünü olan 2C'yi oluşturduğu düşünülebilir. Bunun üzerine 3-NH₂-Rh (2)'nin C-5 konumu üzerinde 2C'nin aldehitlerle Knoevenagel kondenzasyon reaksiyonu sonucunda hedef 5-Ar-Rh türevleri 4a-4j elde edildiği söylenebilir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 5-Ar-Rh türevleri 4a-4j için önerilen oluşum mekanizması

Bütün bu çalışmalar, 3-NH₂-Rh (2)'nin aldehitlerle reaksiyonunun 3-NH₂-Rh (2)'nin amino grubu yerine C-5 konumundan gerçekleşmesini sağlayan belirleyici faktörün, ortamda bir baz olması gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada, reaksiyon ortamına katalitik miktarlarda eklenen suyun amin grubunu deaktive etmesinin yanı sıra C-5 pozisyonunu

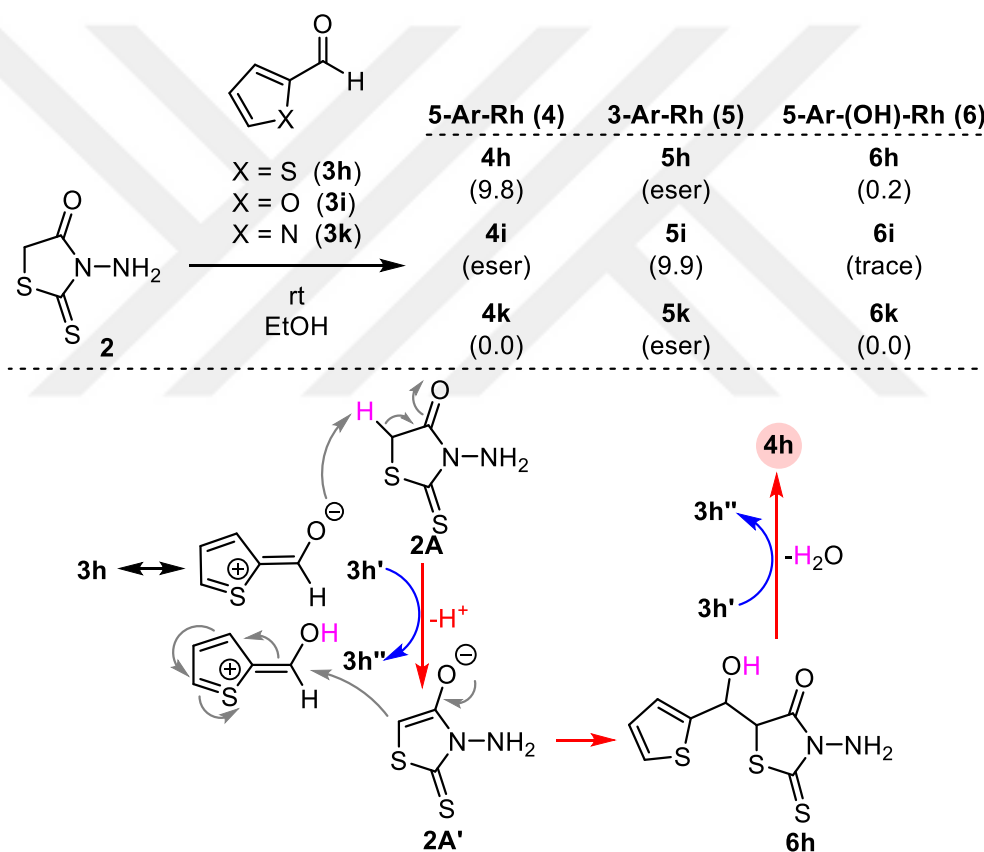
aktif hale getirmek için gerekli olan baz görevini de gördüğü anlaşılmaktadır. Bu öneriyi test etmek için, 3-NH₂-Rh (2)'nin bazik gruplar içeren aldehytlerle reaksiyonları, bir katalizör olmadan oda sıcaklığında gerçekleştirildi. 4-piridinkarboksaldehit (3j) ve 3-NH₂-Rh (2)'nin katalizör olmadan oda sıcaklığındaki reaksiyonlarından, bu çalışmada önerilen tezimizi destekleyen 5-Ar-Rh 4j ve ayrıca bir alkol türevi olan 5-Ar-(OH)-Rh 6j elde edilmiştir. Ayrıca 4-piridinkarboksaldehit (3j) ile 3-NH₂-Rh'nin etanolün geri akış sıcaklığındaki reaksiyonundan da ana ürün olarak 5-Ar-Rh 4j'nin elde edildiği görüldü (Şekil 4.4). Bir alkol türevi olan 5-Ar-(OH)-Rh 6j'nin ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde 5-Ar-(OH)-Rh 6j'nin yapısındaki, S-CH-C=O (rhodanin çekirdeğinin alifatik protonu), OH-CH (alkol proton), NH₂ ve OH-CH (alifatik proton) gruplarına ait proton sinyallerinin sırasıyla; 5.12 (d, J = 2,5 Hz, S-CH-C=O, 1H), 5.48 (m, OH, 1H), 5.81 (s, NH₂, 2H) ve 6.52 (d, J = 5.2 Hz, HC-OH, 1H) ppm değerlerinde rezonans oldukları görülmektedir. Öte yandan, 6j yapısındaki S-CH-C=O ve OH-CH alifatik karbonların ise sırasıyla 55.62 ve 69.09 ppm'de rezonans sinyalleri verdiği görülmektedir (Şekil 4.4). Bu iki karbon sinyali, 5-Ar-(OH)-Rh 6j'nin bir 5-Ar-Rhs alkol türevi olduğu diğer önemli belirleyici tepe noktalarıdır. Ayrıntılı prosedürler ve karakterizasyon deneysel bölümde bulunabilir.



Şekil 4.4. 5-Ar-Rh türevleri 4j ve 6j için önerilen oluşum mekanizması

Heteroaromatik aldehyt türevi 4-piridinkarboksaldehit (3j) ile yapılan çalışmaların ardından, heteroaromatik gruplar içeren diğer aldehytlerin de 3-NH₂-Rh (2) ile oda

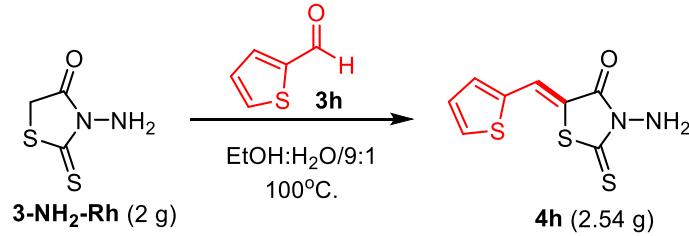
sıcaklığındaki reaksiyonları incelenmiştir. Bu koşullar altında incelenen reaksiyonlarından, furan-2-karbaldehitin (**3i**) reaksiyonundan imin türevi 3-Ar-Rh **5i** oluşurken, 1*H*-pirol-2-karbaldehitin (**3k**)'nın ise reaksiyona girmediği gözlemlendi. Tiyofen-2-karbaldehit (**3h**) ile 3-NH₂-Rh (**2**)'nin reaksiyondan ise eser miktarda 5-Ar-Rh alkol türevi **6h**'ın oluştuğu görülürken, 5-Ar-Rh **4h**'nin %68 verimle oluştuğu gözlemlendi. 5-Ar-Rh **4h** oluşumu için önerilen mekanizma Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Buna göre, reaksiyon ortamında bir rezonans yapısı ile oluştuğu düşünülen tiyofen-2-karbaldehitin (**3h'**) bir baz gibi davrandığı ve piridine benzer bir mekanizma ile hedeflenen 5-Ar-Rh **4h** ürününü verdiği ileri sürülebilir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. 5-Ar-Rh **4h** için önerilen oluşum mekanizması

Bir reaksiyon önerisinin etkili ve kullanılabilir olması için bir diğer gereklilik, reaksiyonun gram ölçeğinde benzer etkili sonuçlar vermesidir. Bu amaçla, bir gram ölçeğinde 5-Ar-Rh türevi **4h**'ın sentezi gerçekleştirilmiş ve 2 g 3-NH₂-Rh (**2**) ile ekivalent miktarına karşılık gelen tiyofen-2-karbaldehit (**3h**)'ın reaksiyonundan hedef 5-Ar-Rh **4h** (2,54 g) kabul

edilebilir bir verimle elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu sonuç, geliştirilen çevreci ve etkili reaksiyon yaklaşımının pratik uygulanabilirliğini de açıkça göstermektedir.



Şekil 4.6. 5-Ar-Rh türevi **4h**'ın gram ölçek sentezi

4.1.1. *hCA* I ve II İzoenzimlerinin Saflaştırılması

Hem saflaştırılan enzimlerden hem de kolona yüklemeye önce hemolizattan 1'er mL numune alınarak hidrataz aktivitesi ve Bradford yöntemiyle protein tayini yapılmıştır. Bulunan değerlere göre hemolizattan Sepharose-4B-L-Tirozin-sülfanilamid afinite kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

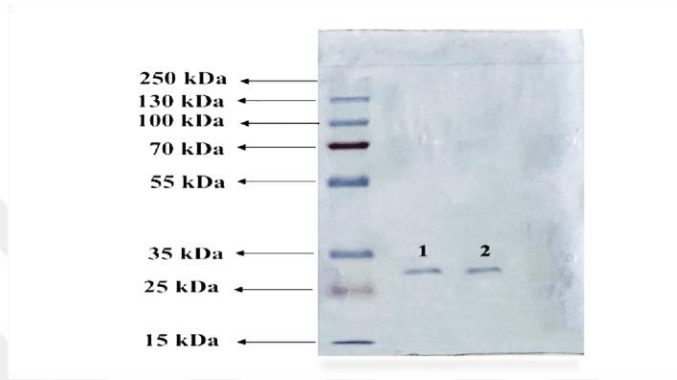
Tablo 4.2. Saflaştırma prosesi

Saflaştırma Basamakları		Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam aktivite (EU)	Spesifik aktivite (EU/mg)	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat		18	133	18,76	337,68	23,94	0,071	1
Sepharoz-4B-L tirozin-sülfanilamid afinite jel kromatografisi	<i>hCA</i> I	9	0,86	0,18	1,62	7,74	4,78	67,32
	<i>hCA</i> II	5	1,63	0,08	0,40	8,15	20,38	287,04

4.1.2. SDS-Page Elektroforez Sonuçları

Afinite kromatografisi metodu kullanılarak, insan kanından elde edilen hemolizattan saflaştırılan *hCA* I ve *hCA* II izoenzimlerinin saflığını ve molekül ağırlığını tespit etmek için SDS-PAGE yapılmıştır (Laemmli 1970). Numuneler jelle yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptoetanol ile muamele edildi ve sonrasında 5 dakika kaynar su

banyosunda bekletildi. Numunenin elektroforezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edildi (Çoban, Beydemir, Gülçin, & Ekinci, 2008). Standart ürün olarak molekül ağırlığı bilinen standart protein markırları kullanılmıştır. SDS-PAGE’de saflaştırılan izoenzimler denatüre edilerek eklenmiştir. Birkaç basamaktan sonra protein bantları belirginleşmiş ve fotoğrafı çekilmiştir. Sonuçlar molekül ağırlıkları bilinen standart protein markırları ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan *hCA* izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı

4.1.3. İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi

Son zamanlarda, CA'ların aktivitesinin inhibisyonu; antitümör, antiglokom ilaçları, antiobezite, antikonvülzan faktörler ve teşhis araçları gibi çeşitli tıbbi uygulamalar için kayda değer amaçlara sahiptir. Bu bağlamda, yeni 5-Ar-Rh türevlerinin sentezine ek olarak *hCA* I ve *hCA* II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri de *in vitro* koşullar altında araştırılmıştır. Klinik çalışmalar, *hCA* I izoenziminin serebral ve retina ödeminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, bu izoenzimin inhibisyonu, bu olumsuz yan etkileri azaltmak için değerli bir faktör olabilir. İlk olarak, *hCA* I izoenzimi ile 5-Ar-Rh türevlerinin inhibisyon çalışmaları gerçekleştirildi ve çalışmalar neticesinde *hCA* I enzimlerinin 239.88 ± 79.31 ve 610.24 ± 111.43 nM arasında değişen K_i değerlerinde güçlü bir şekilde inhibe edildiği belirlendi (Tablo 4.3). İnhibisyon çalışmaları özelleştirildiğinde, 5-Ar-Rh **4j**'nin yarışmalı inhibisyon olarak 239.88 ± 79.31 nM K_i değeri ile en etkili *hCA* I izoenzim inhibisyon aktivitesi gösterdiğini söyleyebiliriz (Tablo 4.4, deney 5). Kontrol ve klinik olarak kullanılan ilaç asetazolamid (**AZA**) molekülünün 186.21 ± 11.54 nM K_i değeri gösterdiği göz önüne alındığında, 5-Ar-Rh'lerin de etkili inhibisyon aktivitesine sahip

oldukları ve bu bağlamda ilaç adayı olmaları açısından kabul edilebilir sonuçlar verdiği söylenebilir. Benzer şekilde, fizyolojik olarak baskın izoform *hCA* II, çoğunlukla epilepsi, glokom ve renal tübüler asidoz gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, *hCA* II'nin inhibisyonu, bu tür hastalıklarla mücadele için *hCA* I'in inhibisyonu kadar önemlidir. Bu tez çalışmaları kapsamında inhibisyon etkileri araştırılan 5-Ar-Rh türevleri, $262,69 \pm 13,20$ ila $638,10 \pm 127,73$ nM arasında değişen K_i değerleri ile *hCA* II izoenzimi üzerinde etkili bir inhibisyon etkisi göstermiştir. Çalışmalar neticesinde, 5-Ar-Rh türevlerinin *hCA* II izoenzimi üzerine inhibisyon değerleri de klinik olarak kullanılan ilaç AZA'ya ($104,29 \pm 27,07$ nM K_i) yakındır ve spesifikleştirildiğinde 5-Ar-Rh **4i**'nin *hCA* II izoenzimi üzerinde en etkili inhibitör özelliği gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.4). Ayrıca, bazı tau agregasyonu ilacının temelini de oluşturan 5-Ar-Rh **4i**'nin her iki *hCA* (I ve II) enzimi için etkili ve yakın inhibisyon etkileri olduğu belirlendi. Genel olarak ele alındığında, C5 pozisyonunda heteroaromatik (piridinil, furanil veya tiyofenil) gruplar içeren 5-Ar-Rh (**4h-4j**) türevlerinin, benzen halkası içeren 5-Ar-Rh (**4a-4g**) türevlerinden daha iyi inhibisyon etkisi göstermiştir. Her iki *hCA* (I ve II) enzimi için etkili ve yakın inhibisyon değerleri gösteren 5-Ar-Rh **4i**'nin yarışmalı bir inhibisyon tipi gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 4.3. 5-Ar-Rh türevlerinin *hCA*s I ve II enzimleri üzerine IC_{50} değerleri

5-Ar-Rh türevleri	IC_{50} (nM)			
	<i>hCA</i> I	r^2	<i>hCA</i> II	r^2
4a	569.62	0.9703	539.72	0.9708
4b	606.30	0.9755	611.11	0.9821
4c	541.83	0.9717	511.82	0.9765
4d	594.85	0.9743	512.20	0.9929
4e	693.69	0.9763	504.36	0.9795
4f	750.81	0.9827	561.11	0.9870
4g	617.65	0.9688	603.13	0.9910
4h	743.56	0.9916	480.58	0.9807
4i	690.93	0.9807	276.65	0.9825
4j	608.99	0.9840	603.13	0.9619
6j	577.98	0.9927	587.98	0.9814
AZA*	415.47	0.9879	388.45	0.9884

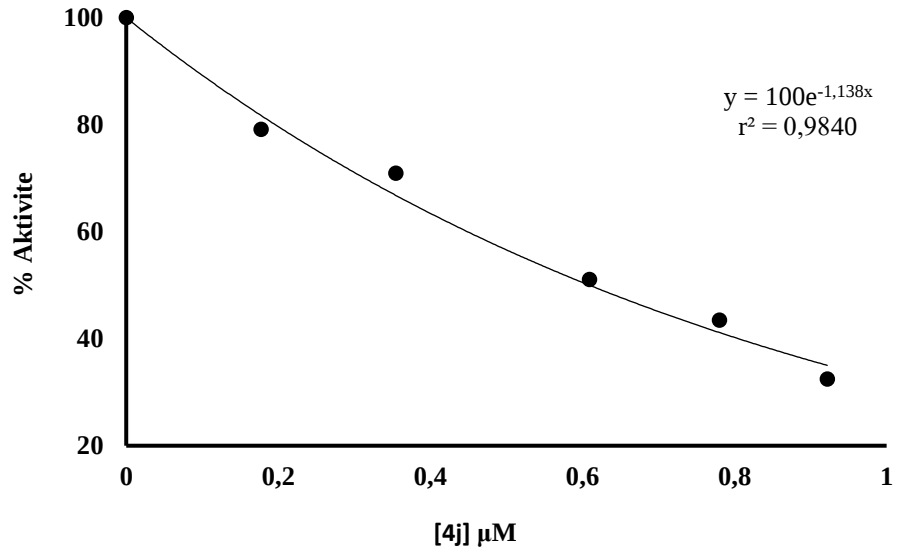
*AZA (asetazolamid) *hCA* I ve II için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.4. 5-Ar-Rh türevlerinin *h*CA I ve II enzimlerine üzerine K_i değerleri

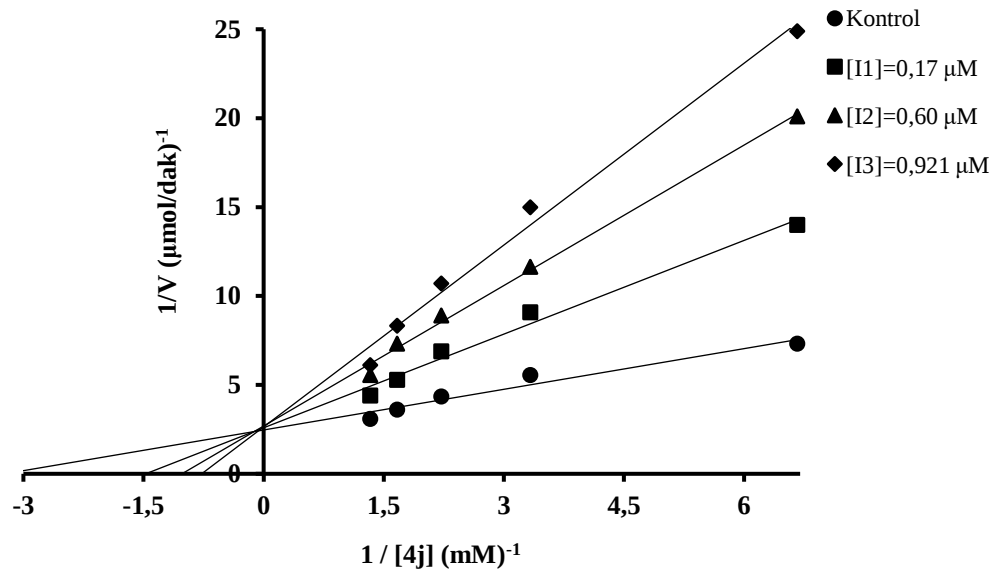
5-Ar-Rh türevleri	K_i (nM)			
	<i>h</i> CA I	İnhibisyon tipi	<i>h</i> CA II	İnhibisyon tipi
4a	597.07±60.00	Yarışmasız	577.22±53.10	Yarışmalı
4b	560.94±54.96	Yarışmasız	562.90±81.21	Yarışmalı
4c	455.56±70.62	Yarışmalı	638.10±127.73	Yarışmasız
4d	334.14±52.30	Yarışmalı	474.55±36.63	Yarışmasız
4e	375.06±182.92	Yarışmalı	553.30±53.09	Yarışmasız
4f	329.72±113.60	Yarışmalı	405.30±61.79	Yarışmalı
4g	610.24±111.43	Yarışmasız	431.73±46.83	Yarışmalı
4h	503.70±170.04	Yarışmasız	265.40±42.66	Yarışmasız
4i	301.91±69.90	Yarışmalı	262.69±13.20	Yarışmalı
4j	239.88±79.31	Yarışmalı	373.47±35.79	Yarışmasız
6j	417.46±94.89	Yarışmalı	517.47±91.00	Yarışmasız
AZA*	186.21±11.54	Yarışmalı	104.29±27.07	Yarışmalı

*AZA (asetazolamid) *h*CA I ve II için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

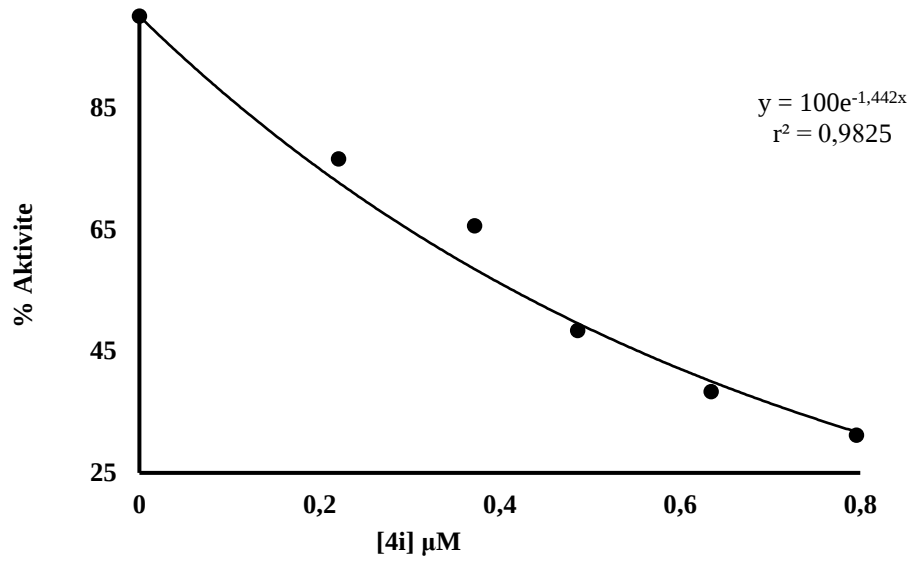
Bu tez çalışmaları kapsamında sentezi gerçekleştirilen 5-Ar-Rh türevlerinin *h*CA I ve II enzimleri üzerine gösterdikleri inhibisyon etkilerini belirlenmesi için her bir 5-Ar-Rh türevine ait Aktivite (%) ve K_i grafikleri çizildi (Ekler 14-37). Çalışmalar neticesinde *h*CA I izoenzimi için 5-Ar-Rh türevi **4j** en iyi inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenirken (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9), *h*CA II izoenzimi için ise 5-Ar-Rh türevi **4i** molekülünün en iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Aktivite (%) grafiklerini çizmek için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda ölçüm yapıldı. K_i için ise ayrıca üç ayrı inhibitör konsantrasyonu seçilerek beş ayrı substrat volümünde (50, 100, 150, 200 ve 250 μ L) çalışıldı. Çizilen grafiklerden IC_{50} ve K_i değerleri hesaplandı. Aynı işlemler CA'nın standart inhibitörü olan asetazolamid için de tekrarlanarak sonuçlar karşılaştırıldı.



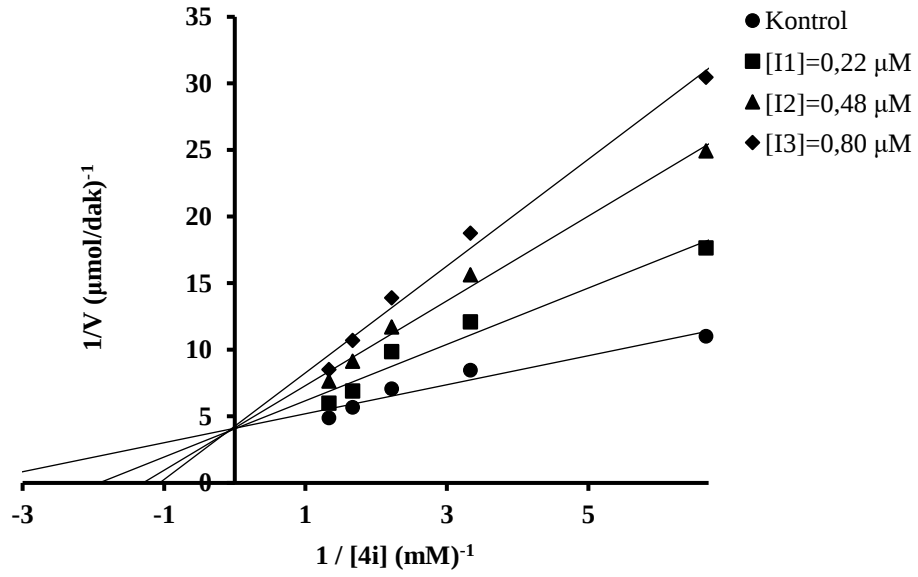
Şekil 4.8. 5-Ar-Rh türevi **4j** için hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan Aktivite (%)-[4j] grafiği



Şekil 4.9. 5-Ar-Rh türevi **4j** için hCA I izoenziminin esteraz aktivitesi ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği



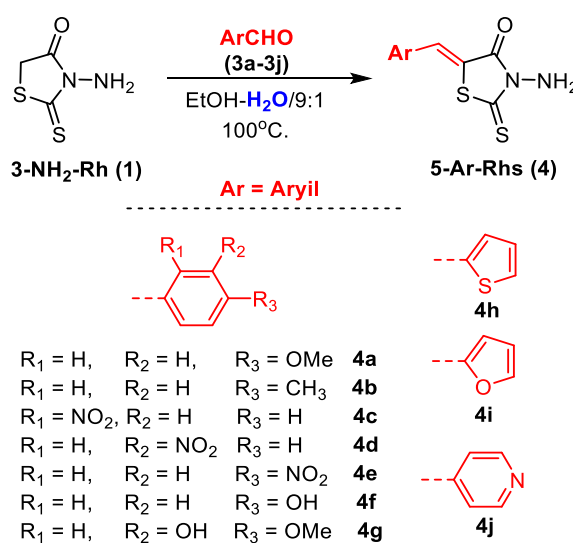
Şekil 4.10. 5-Ar-Rh türevi **4i** için hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi metodu ile çalışılan Aktivite (%)-[4i] grafiği



Şekil 4.11. 5-Ar-Rh türevi **4i** için hCA II izoenziminin esteraz aktivitesi ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği

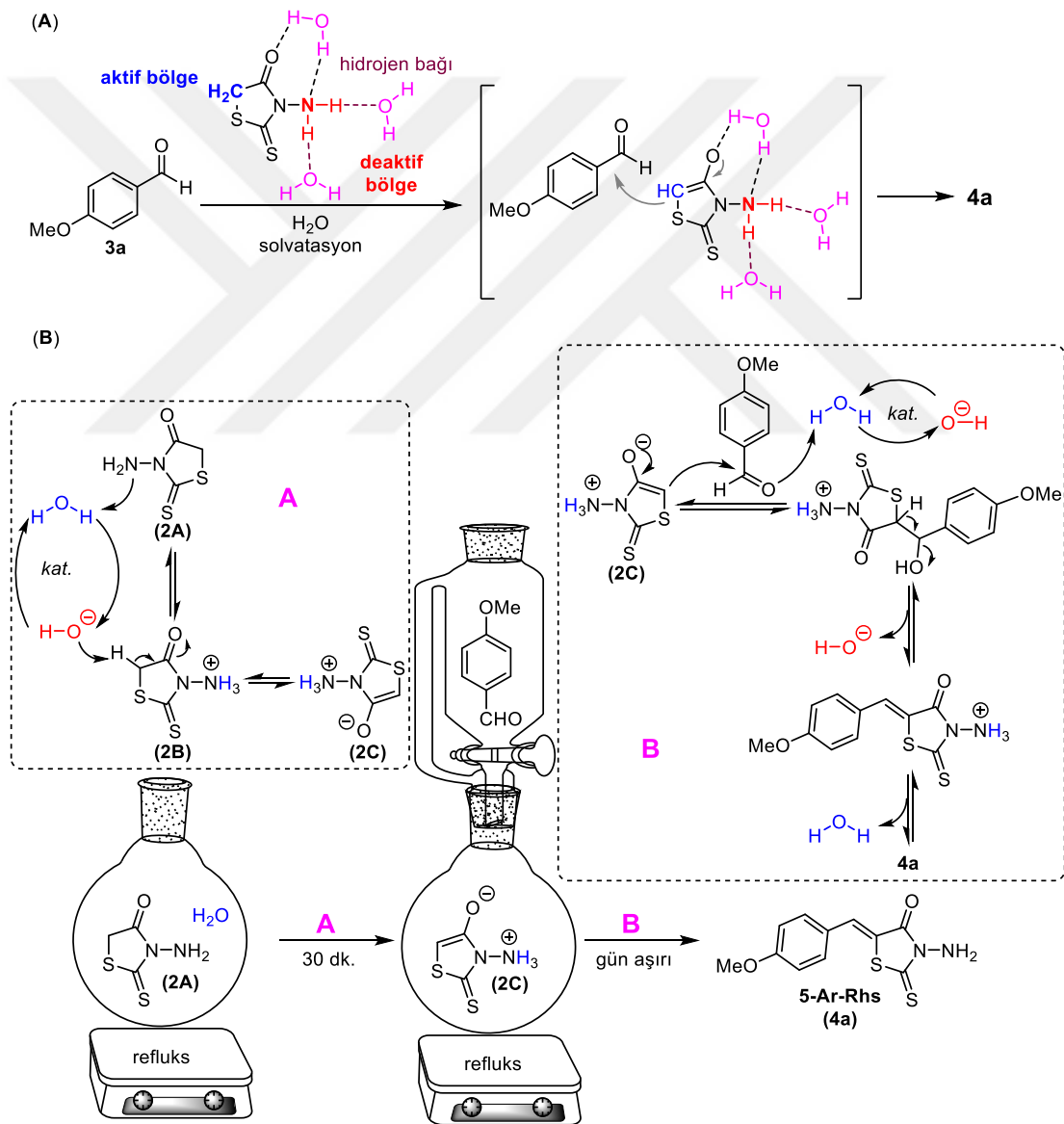
5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çok sayıda ilaç olarak kullanılan organiklerin ana iskeletini oluşturan rhodanin çekirdeğinin herhangi bir katalizör kullanılmadan daha çevreci yaklaşımlarla elde edilmesi oldukça ilgi çekicidir. Bu ilginin bir sonucu olarak, rhodanin bazlı bileşiklerin birçok farklı biyolojik aktivitelerini tanımlayan bilimsel yayınların ve faydalı patentlerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Knoevenagel kondenzasyon reaksiyonu, sentetik organik kimyada 5-süstitüe-rhodaninler gibi çeşitli önemli tıbbi ürünlerin üretimine izin veren C-C bağı oluşumu için en önemli prosedürlerden biridir. Özetle, çevreci bir yaklaşımla 3-NH₂-Rh (2)'nin serbest NH₂'si yerine C-5 konumundan bölgesel seçici işlevselleştirilmesi önemli bir zorluğu temsil etmektedir. Bu çalışmada ilk olarak, 5-Ar-Rh türevleri, ilk kez 3-NH₂-Rh'nin (2) su destekli katalizörsüz Knoevenagel yoğunlaşması yoluyla elde edilmiştir. Bu şekilde, aril-aldehitleri elektrofilik bir ortak olarak kullanarak 3-NH₂-Rh (2) bağlanmasını başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek, su destekli katalizör içermeyen Knoevenagel yoğunlaşmasıyla 5-Ar-Rh türevleri elde edilmiştir. Böylelikle, geliştirilen bu metodoloji, 5-Ar-Rh türevlerinin yüksek verimlerde (%54'ten %82'ye kadar) ve geniş bir substrat kapsamıyla bölgesel seçici sentezine izin verdi. Ayrıca yapılan gram ölçeği çalışmaları, geliştirilen metodolojinin pratik uygulanabilirliğini de gösterdi.



Şekil 5.1. 5-Aril-rhodanin (5-Ar-Rh) türevlerinin sentezi

Burada 5-Ar-Rh türevlerinin sentezi için geliştirilen metodolojinin mevcut yöntemlerden olumlu bir şekilde ayrılmasını sağlayan temel avantajı; çevre dostu bir yaklaşımla su destekli olarak 3-NH₂-Rh (2)'nin nükleofilik NH₂ grubunun bloklanmasıyla 3-NH₂-Rh (2)'nin C-5 pozisyonunun aktif hale gelmesinin sağlanmasıdır. Bu yöntemle göre, su (H₂O) molekülleri ile 3-NH₂-Rh (2)'nin amino grubu arasındaki H-bağ kümeleri nedeniyle 3-NH₂-Rh (2) reaksiyonun NH₂ yerine C-5 pozisyonundan seçici olarak reaksiyona girerken (Şekil 5.2), diğer taraftan katalitik miktarlar CH₃CO₂H katalizörü saf etanol içinde bulunması durumunda ise NH₂-nükleofil olarak işlev görmektedir.



Sentezin ardından, yeni 5-Ar-Rh türevlerinin *hCA* I ve *hCA* II enzim inhibisyon özellikleri de araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, 5-Ar-Rh türevleri, *hCAs* (I ve II) enzimlerine karşı nanomolar seviyelerde inhibisyon etkisi gösterdikleri belirlenmiştir. 5-Ar-Rh türevleri **4j** ve **4i**, sırasıyla *hCA*'lar (I ve II) için en iyi inhibisyon etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, 5-Ar-Rh **4i**'nin her iki *hCA* (I ve II) enzimi için etkili ve yakın inhibisyon etkileri olduğu belirlendi. Bu bağlamda çevreci ve kolay sentetik bir yaklaşımla sentezlenen bu moleküller, bazı hastalıklar için potansiyel inhibitör olarak aday ilaç olma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, uygulamalarının önerilebilmesi için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç duyulacağı düşünülmektedir. Son olarak, Knoevenagel yoğunlaşması için bu çevreci yaklaşımlı sentetik protokolün organik kimyada ve tıbbi kimyada da faydalı olma potansiyeline sahip olduğuna inanıyoruz.

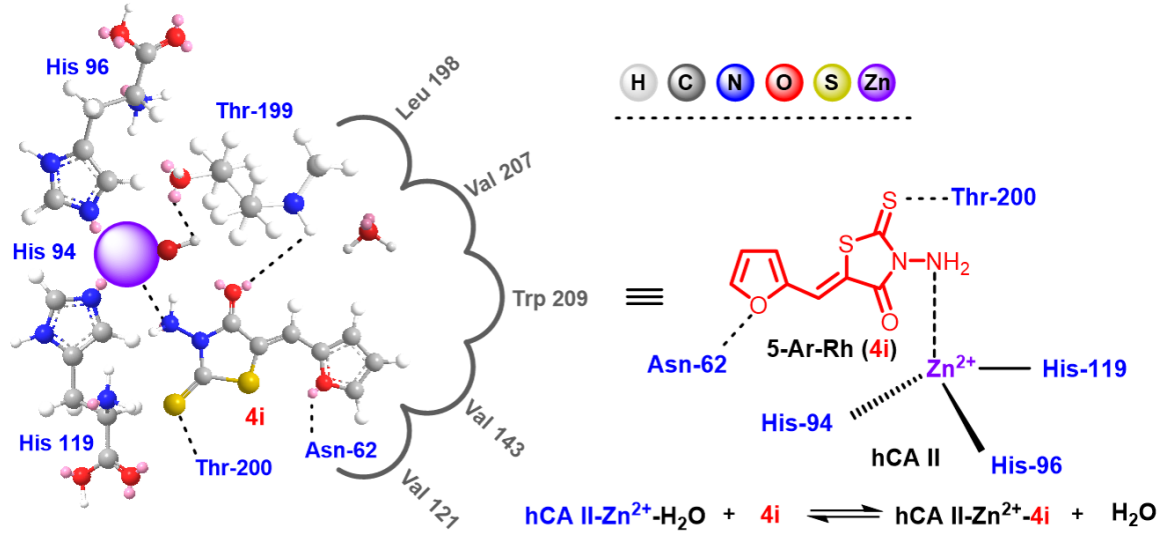
Tablo 5.1. 5-Ar-Rh türevlerinin *hCAs* I ve II enzimlerine karşı inhibisyon değerleri

5-Ar-Rh türevleri	IC ₅₀ (nM)				K _i (nM)	
	<i>hCA</i> I	r ²	<i>hCA</i> II	r ²	<i>hCA</i> I	<i>hCA</i> II
4a	569.62	0.9703	539.72	0.9708	597.07±60.00	577.22±53.10
4b	606.30	0.9755	611.11	0.9821	560.94±54.96	562.90±81.21
4c	541.83	0.9717	511.82	0.9765	455.56±70.62	638.10±127.73
4d	594.85	0.9743	512.20	0.9929	334.14±52.30	474.55±36.63
4e	693.69	0.9763	504.36	0.9795	375.06±182.92	553.30±53.09
4f	750.81	0.9827	561.11	0.9870	329.72±113.60	405.30±61.79
4g	617.65	0.9688	603.13	0.9910	610.24±111.43	431.73±46.83
4h	743.56	0.9916	480.58	0.9807	503.70±170.04	265.40±42.66
4i	690.93	0.9807	276.65	0.9825	301.91±69.90	262.69±13.20
4j	608.99	0.9840	603.13	0.9619	239.88±79.31	373.47±35.79
6j	577.98	0.9927	587.98	0.9814	417.46±94.89	517.47±91.00
AZA*	415.47	0.9879	388.45	0.9884	186.21±11.54	104.29±27.07

*AZA (asetazolamid) *hCA* I ve II için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sentezi gerçekleştirilen 5-Ar-Rh türevleri tarafından *hCA*'ların inhibisyon mekanizmasını daha iyi anlamak için, *hCA*'ların aktif alanının, karbon dioksitin tersinir hidrasyon reaksiyonu için; bir substrat H₂O molekülüne bağlanan ve onu katalize olması için aktif hale getiren güçlü ve aynı zamanda bir Lewis asidi olan aktif bir çinko (Zn⁺²) iyon bölgesi içerdiği bilinmelidir. İnhibitörlerin X-ışını kristalografik yapıları temelinde desteklenen araştırmalara göre, protonu giderilmiş inhibitörün enzimin Zn⁺² iyonuna koordine olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda AZA ile benzer gruplar içeren ve ayrıca yapısında çok sayıda heteroatom içeren yeni 5-Ar-Rh türevleri de etkili inhibisyon etkileri göstermiştir. Tüm bu çalışmaların ışığında 5-Ar-Rh **4i** ve *hCA* II izoenzimi arasındaki etkileşimin mekanizması

Şekil 5.3'teki gibi önerilmiştir. Buna göre, 5-Ar-Rh **4i**'nin amin kısmı aktif Zn^{2+} ya katılır ve bunun sonucunda enzim inhibe olur.



Şekil 5.3. 5-Ar-Rh **4i** için önerilen hCA II inhibisyon mekanizması

KAYNAKLAR

Akocak, S., Lolak, N., Bua, S. and Supuran, C. T. (2018). Discovery of novel 1,3-dioryltriazene sulfonamides as carbonic anhydrase I, II, VII and IX inhibitors. *J Enzym inhib. Med. Chem*, (33): 1575-1580.

Akunuri, R., Unnissa, T., Kaul, G., Akhir, A., Saxena, D., Wajidali, M., . . . and Nanduri, S. (2022). Synthesis and Antibacterial Evaluation of Rhodanine and Its Related Heterocyclic Compounds against *S. aureus* and *A. baumannii*. *Chemistry and Biodiversity*, <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200213>.

Arsovska, E., Trontelj, J., Zidar, N., Tomasic, T., Masic, L. P., Kikelj, D., . . . and Zega, A. (2014). Evaluation of Michael-type Acceptor Reactivity of 5-Benzylidenearbiturates, 5-benzylideneRhodanines, and Related Heterocycles Using NMR. *Acta Chim. Slov*, (61): 637–644.

Atmaca, U., Alp, C., Akıncıoğlu, H., Karaman, H., Gülçin, İ. and Çelik, M. (2021). Novel hypervalent iodine catalyzed synthesis of α -sulfonyl ketones: Biological activity and molecular docking studies. *Journal of Molecular Structure*, (1239): 1-10.

Azizmohammadi, M., Khoobi, M., Ramazani, A., S. Emami., A. Zarrin., O. Firuzi., . . . and A. Şafıib (2013). Potansiyel antikanser ajanları olarak tiazolidin-2,4-dione, Rhodanine veya hydantoin moieties taşıyan 2H-krom türevleri. *Eur. J. Med. Chem.*, (59): 15-22.

Barakat, A., Al-Majid, A. M., AL-Najjar, H. J., Mabkhot, Y. N., Ghabbour, H. A. and Fun, H. K. (2013). An efficient and green procedure for synthesis of Rhodanine derivatives by aldol-thia-Michael protocol using aqueous diethylamine medium. *RSC Adv*, (4): 4909.

Bayındır, S. (2019a). A simple Rhodanine-based fluorescent sensor for mercury and copper: The recognition of Hg^{+2} in aqueous solution and $Hg^{+2} - Cu^{+2}$ in organic solvent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 372, 235-244.

Bayındır, S. and Yazarlı, K. (2019b). The easy synthesis of new *N*-substituted 5-oxindoline-Rhodanines and their sensing ability: The recognition of acetate ions in aqueous solution. *New Journal of Chemistry*, 43(21): 8168-8178.

Bayındır, S., Çağlayan, C., Karaman, M. and Gülçin, İ. (2019c). The green synthesis and molecular docking of novel *N*-substituted Rhodanines as effective inhibitors for carbonic anhydrase and acetylcholinesterase enzymes. *Bioorganic Chemistry*, (90): 103096.

Bhuiyan, M. D., Teshome, A., Gainsford, G. J., Ashraf, M., Clays, K., Asselberghs, I. and Kay, A. J. (2010). Synthesis characterization linear and non-linear optical (NLO) properties of some schiff's bases. *Optical Materials*, (32): 669-672.

Bhuyan, P. J. and Deb, M. L. (2005). Uncatalysed Knoevenagel Condensation in Aqueous Medium at Room Temperature. *Tetrahedron Letters*, (46): 6453-6456.

Bigi, F. and Qmarontelli, C. (2012). The Knoevenagel condensation in water. *Organic Synthesis*, (9): 31-39.

Bouregghda, C., Boulcina, R., Dorcet, V., Berrée, F. and Carboni, B. (2020). Facile synthesis of 5-arylidene rhodanine derivatives using Na₂SO₃ as an eco-friendly catalyst. Access to 2-mercapto-3-aryl-acrylic acids and a. *Tetrahedron Letters*, (62): 152690.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, (72): 248.

Brown, F. C. (1961). 4 Thiazolidinones. *Chemical Reviews*, (61): 463-521.

Bulic, B., Pickhardt, M., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (2010). Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology*, (59): 276–289.

Bulic, B., Ness, J. and Hahn, S. (2011). Chemical Biology, Molecular Mechanism and Clinical Perspective of γ -Secretase Modulators in Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology*, 9(4): 598-622.

Bulic, B., Pickhardt, M., Schmidt, B., Mandelkow, E. M., Waldmann, H., and Mandelkow, H. (2009). Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed*, (48): 1740-1752.

Bulut, N., Koçyiğit, U. M., Gecibesler, I. H., Dastan, T., Karci, H., Taslimi, P., . . . and Cetin, A. (2018). Synthesis of some novel pyridine compounds containing bis-1, 2, 4-triazole/thiosemicarbazide moiety and acetylcholinesterase enzymes inhibition profiles. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32 (1): 1-10.

Çağlayan, C. (2019). Morin'in karbonik anhidraz, asetilkolinesteraz ve α – glikozidaz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkileri. Iğdır Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3): 1443-1451.

Çoban, T. A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. and Ekinci, D. (2008). The inhibitory effect of ethanol on carbonic anhydrase isoenzymes: in vivo and in vitro studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, (23): 266-270.

Davoodnia, A. (2012). An efficient method for Knoevenagel condensation catalyzed by tetrabutylammonium hexatungstate $[TBA]_2[W_6O_{19}]$ as novel and reusable heterogeneous catalyst. *Synthesis and reactivity in inorganic metal-organic and nano-metal chemistry*. (9): 31-39.

Devi, N. S. and Devi, N. (2018). Catalyst-free aldol reaction of N-substituted rhodanines on aqueous media. *J. Chem. Sci*, (130): 18.

Dökmeci, İ. (1992). Farmakoloji. İstanbul. Saray Kitabevleri.

Ekinci, D., Supuran, C. T., Fidan, İ., Durdağı, S. and Kaban, Ş. (2013). Kinetic and in silico analysis of thiazolid-based inhibitors of α -carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 28(2): 370-374.

El- Kabbani, O., Carbone, V., Darmanin, C., Oka, M., Mitschler, A., Podjarny, A., . . . and Chung, R. T. (2005). Structure of Aldehyde Reductase Holoenzyme in Complex with the Potent Aldose Reductase Inhibitor Fidarestat: Implications for Inhibitor Binding and Selectivity. *J. Med. Chem*, 48(17): 5536-5542.

Gandini, A., Bartolini, M., Tedesco, D., Gonzalez, L. M., Roca, C., Campillo, N. E., . . . and Bolognesi, M. L. (2018). Au-Centric Multitarget Approach for Alzheimer's Disease: Development of First-in-Class Dual Glycogen Synthase Kinase β and Tau-Aggregation Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(17): 7640-7656.

Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Göksu, S. and Gülçin, İ. (2016). Carbonic anhydrase inhibitory properties of phenolic sulfonamides derived from dopamine related compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3): 398-402.

Gökçe, B. (2009). Tiyadiazol türevleri bileşikleri karbonik anhidraz inhibitörü olarak karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi.

Göksu, S., Naderi, A., Akbaba, Y., Kalın, P., Akıncıoğlu, A., Gülçin, İ., . . . and Salmas, R. E. (2014). Moleküler modelleme ve deneysel çalışmalar kullanılarak yeni benzilsülfamidlerin karbonik anhidraz inhibitör özellikleri. *Biyoorganik Kimya*, (56): 75-82.

Guiheneuf, S., Paquin, L., Carreaux, F., Duricu, E., Roisnel, T., Meijer, L. and Bazurea, J. P. (2014). New 5-yliden Rhodanine derivatives based on the dispacamide a model. *Full Length Paper Received*, (18): 375-388.

Gülçin, İ., Şat, İ. G., Beydemir, Ş. and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2004). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of extracts of broccoli (*Brassica oleracea* L.9. *Italian Journal of Food Science*, (16): 17-30.

Gülçin, İ. and Baydemir, S. (2013). Phenolic compounds as antioxidants: Carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(3): 408-430.

Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C., Köksal, Z., Türkan, F., Çetinkaya, S., . . . and Alwasel, S. H. (2016). Rosmarinik asit , glutatyon S- transferaz, laktoperoksidaz, asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz ve karbonik anhidraz izoenzimleri dahil olmak üzere bazı metabolik enzimleri inhibe eder. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6): 1698-1702.

Heng, S., Tieu, W., Hautmann, S., Kuan, K., Pedersen, D. S., Pietsch, M., . . . and Abell, A. D. (2011). New cholesterol esterase inhibitors based on rhodanine and thiazolidinedione scaffolds. *BioorgMed Chem* , (19): 7453–7463.

Hotta, N., Akanuma, Y., Kawamori, R., Matsuoka, K., Oka, Y., Shichiri, M., . . . and Shigeta, Y. (2006). Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on diabetic peripheral neuropathy: the 3-year, multicenter, comparative Aldose Reductase Inhibitor-Diabetes Complications Trial. *Diabetes Care*, (29): 1538–1544.

Huyut, Z., Beydemir, Ş. and Gülçin, İ. (2017). Seçilmiş Flavonoidler ve Fenolik Bileşiklerin Antioksidan ve Antiradikal Özellikleri. *Uluslararası Biyokimya Araştırmaları*, <https://doi.org/10.1155/2017/7616791>.

Jayarom, R. V. and Gawende, M. B. (2006). A novel catalyst for the Knoevenagel condensation of aldehydes with malononitrile and ethyl cyanoacetate under solvent free conditions, *Catalysis communications*, 931-935.

Kalbasi, R. J., Kolahdoozan, M. and Vanani, S. M. (2011). Preparation, characterization and catalyst application of ternary interpenetrating networks of poly 4-methyl vinyl pyridinium hydroxide-SiO₂-Al₂O₃. *Journal of Solid State Chemistry*, 184(8): 2009–2016.

Karaman, M., Temel, Y. and Bayındır, S. (2020). Inhibition effect of rhodanines containing benzene moieties on pentose phosphate pathway enzymes and molecular docking. *Journal of Molecular Structure*, (1220): 128700, 1-10.

Keha, E. E. and Küfrevioğlu, Ö. İ. (2020). *Biyokimya*. Erzurum: Aktif Yayınevi.

Keilin, D. and Mann, T. (1944). Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, (153): 107-108.

Khaldun, K., Safer, A., Boukabcha, N., Dege, N., Ruchaud, S., Souab, M., . . . and Besbes, S. S. (2019). Synthesis and evaluation of new isatin-aminoRhodanine hybrids as PIM1 and CLK1 kinase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, (1192): 82-90.

Kirpi, E. (2007). Heterohalkalı makromoleküler bileşik sentezi. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi.

Kumar, G. S., Jayaveera, K. N., Ashok Kumar, C. K., Sanjay, U. M., Swamy, B. W., and Kumar, D. K. (2007). Antimicrobial effects of Indian medicinal plants . *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6(2): 717-723.

Kumar, V., Mahajan, A. and Chibale, K. (2009). Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(6): 2236-2275.

Laemmli, D. K. (1970). Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, (227):680-685.

Lesky, R. B. and Zimenkovsky, B. S. (2004). 4-Thiazolidinonas: Centenarian history, current status and perspectives for modern organic and medicinal chemistry. *Current Organic Chemistry*, (8): 1547-1577.

Liu, K. C., Chen, H. H., Lee, L. C. and Chern, J. W. (1979). Synthese and anorektische wirkungeiniger kondonsierter perimidin-derivate. *Arch. Pharm*, 312(9): 776-780.

Liu, Q. and Ai, H. (2012). Sodium Benzoate as a Green, Efficient, and Recyclable Catalyst for Knoevenagel Condensation, Synthetic. *Communications: An International Journal For Rapid Communucation Of Synthetic Organic Chemistry*, 42(20): 3004-3010.

Maren, T. H. (1960). A simplifield micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 126-130.

Moemeni, M. H., Amrollahi, M. A. and Tamaddon, F. (2015). A facile catalyst-free Knoevenagel condensation of pyridinecarbaldehydes and active methylene compounds. *Bulgarian Chemical Communications*, 47(1): 7-12.

Murugan, R., Anbazhagan, S. and Narayanan, S. S. (2009). Synthesis and in vivo antidiabetic activity of new dispiropyrrolidines via [3 + 2] cycloaddition reactions with thiazolidinedione and Rhodanin derivatives. *Eur. J. Med. Chem*, (44): 3272-3279.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1993). 3D structure of Proteins. New York. 2th Edition. Principles of Biochemistry Worth Publishers Inc.

Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry. New York, USA: Chapter 6. W. H. Freeman, Fourth Edition.

Nişancı, B. (2019). Katalizörsüz Ortamda Benzaldehit Türevlerinin Malononitril Eşliğinde Knoevenagel Kondenzasyonu: Disiyano Bileşiklerinin Sentezi İçin Çevreci Kimya Yasalarına Uygun Etkin Bir Yöntem. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(1): 500-511.

Ono, M., Hayashi, S., Matsumura, K., Kimura, H., Okamoto, Y., Ihara, M., . . . and Saji, H. (2011). Rhodanine and Thiohydantoin Derivatives for Detecting Tau Pathology in Alzheimer's Brains. *ACS Chem. Neurosci*, (2): 269–275.

Ottana, R., Maccari, R., Ciurleo, R., Paoli, P., Jacomelli, M., Manao, G., . . . and Langer, T. (2009). 5-Arylidene-2-phenylimino-4-thiazolidinones as inhibitors of PTP1B and LMW-PTP. *Bioorganik ve Medicinal Chem*, 17(5): 1928-1937.

Powers, J. P., Piper, D. E., Veronica, Y. L., Anzola, M. J., Chen, J. M., Jaen, J. C., . . . and Tonn, G. R. (2006). SAR and Mode of Action of Novel Non-Nucleoside Inhibitors of Hepatitis C NS5b RNA Polymerase. *J.Med. Chem*, 49(3): 1034-1046.

Rahnema, M., Bigdeli, M. R., Kazemizadeh, A. R. and Ramazani, A. (2007). Synthesis and biological activity of alkyl (Z) 2-[3-methyl-2-(methyylimino)-4-oxo-1,3-thiazolan-5-yliden] acetates. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 182(8):1683-1688.

Rajamaki, S., Innitzer, A., Falciani, C., Tintori, C., Christ, F., Witvrouw, M., . . . and Botta, M. (2009). Exploration of novel thiobarbituric acid-, Rhodanine- and thiohydantoin-based HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(13): 3615.

Russell, A., Westwood, I., Crawford, M., Robinson J., Kawamura, A., Redfield, C., . . . and Sim, E. (2009). Selective small molecule inhibitors of the potential breast cancer marker, human arylamine N-acetyltransferase 1, and its murine homologue, mouse arylamine N-acetyltransferase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(2): 905-918.

Sağlamtaş, R. (2021). Gingerol'un Antioksidan Aktivitesi ve Bazı Metabolik Enzimler. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi.

Sandhu, J. (2013). Ultrasound-assisted synthesis of 2, 4-thiazolidinedione and rhodanine derivatives catalyzed by task-specific ionic liquid:[TMG][Lac]. *Organic and medicinal chemistry letters*, 3(1): 1-6.

Sarıgüney, A. B. (2018). Bazı indol-triazol bileşiklerin sentezi ve karbonikanhidraz enzim üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi.

Segel, I. H. (1986). Biochemical Calculations: Enzim kinetics. John Wiley and Sons. New York.

Shirini, F. and Daneshvar, N. (2016). Introduction of taurine (2-aminoethanesulfonic acid) as a green bioorganic catalyst for the promotion of organic reactions under green conditions. *RSC Advances*, 6 (111): 190-205.

Smith, M. B. and March, J. (2001). March's advanced organic chemistry reactions mechanisms and structure. New York. 5th ed. John Wiley & Sons.

Solmaz, R., Kardaş, G., Erbil, M. and Yazıcı, B. (2005). Inhibition effect of Rhodanine for corrosion of mild steel in hydrochloric acid solution. *Protection of Metals*, (41): 581-585.

Soltero - Higgin, M. (2004). Identification of Inhibitors for UDP-Galactopyranose Mutase. *J. Am. Chem. Soc.*, (126): 10532–10533.

Song, M. X., Zheng, C. J., Deng, X. Q., Wang, Q., Hou, S. P., Liu, T. T., . . . and Piao, H. R. (2012). Synthesis and bioactivity evaluation of rhodanine derivatives as potential. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (54): 403-412.

Sortino, M., Delgado, P., Juárez, S., Quiroga, J., Abonía, R., Ikna, B., . . . and Zacchino, S. A. (2007). (Z)- 5-arylidene Rhodanines synthesis and antifungal activity. *Bioorganic ve Medicinal Chem*, 1(15): 484-494.

Strittmatter, T., Bareth, B., Immel, T. A., Huhn, T., Mayer, T. U. and Marx, A. (2011). Small Molecule Inhibitors of Human DNA Polymerase λ . *ACS Chem Bio*, 6(4): 314-319.

Subhedar, D. D., Shaikh, M. H., Nawale, L., Yeware, A., Sarkar, D., Khan, F. K., . . . and Shingate, B. B. (2016). Novel tetrazoloquinoline–Rhodanine conjugates: Highly efficient synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (26): 2278–2283.

Sudo, K., Matsumoto, Y., Matsushima, M. and Fujiwa, M. (1997). Novel hepatitis C virus protease inhibitors: Thiazolidine derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 238(2): 643-647.

Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2): 168-181.

Supuran, C. T. (2010a). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, (20): 3467-3474.

Supuran, C. T. (2010b). Carbonic anhydrase inhibitors with natural products: Novel chemotypes and inhibition mechanisms. *Molecular Diversity*, (15): 305-316.

Supuran, C. T. and Scozzafava, A. (2001). Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, (1): 61-97.

Taslimi, P., Aslan, H. E., Demir, Y., Öztaşkın, N., Maraş, A., Gülçin, İ., . . . and Göksu, S. (2018a). Diarylmethanon, bromophenol and diarylmethane compounds: Discovery of potent aldose reductase, α -amylase and α -glycosidase inhibitors as new therapeutic approach in diabetes and functional hyperglycemia. *International Journal of Biological*, (119): 857-863.

Taslimi, P., Çağlayan, C., Farzaliyev, V., Nabiyev, O., Sujayev, A., Turkan, F., . . . and Gülçin, İ. (2018b). Synthesis and discovery of potent carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and α -glycosidase enzymes inhibitors: The novel N,N'-bis-cyanomethylamine and alkoxymethylamine derivatives. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, <https://doi.org/10.1002/jbt.22042>.

Tejchman, W., Glowinski, I. K., Malm, A., Zlewski, M. and Suder, P. (2017). Antibacterial properties of 5-substituted derivatives of Rhodanine-3-carboxyalkyl acids. *Medicinal Chemistry Research*, (26): 1316-1324.

Tomasic, T. and Masic, L. P. (2009). Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 16(13): 1596-1629.

Tomasic, T. and Masic, L. P. (2012). Rhodanine as a scaffold in drug discovery: Biological activities and mechanisms of target modulation. *University of Ljubljana*, 7(7): 549-560.

Tomasic, T., Zidar, N., Premru, M. M., Kikelj, D. and Masic, L. P. (2010). Synthesis and antibacterial activity of 5-ylidenethiazolidin-4-ones and 5-benzylidene-4,6-pyrimidinidiones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(4): 1667-1672.

Turkan, F., Çetin A, Taslimi, P. and Gülçin, İ. (2019). Some Pyrazoles Derivatives: Potent Carbonic Anhydrase, α -glycosidase, and Cholinesterase Enzymes Inhibitors. *Arch. Pharm. Chem. Life. Science*, 351(10): <https://doi.org/10.1002/ardp.201800200>.

Vachani, D. D., Sharma, A. and Eychen, V. (2012). Pd/Cu-catalyzed C-H arylation of 1,3,4-thiadiazoles with (hetero) aryl iodides, Bromides and Triflates. *J.Org. Chem*, (77): 8768.

Vats, L., Sharma, V., Angeli, A., Kumar, R., Supuran, C. T. and Sharma, P. K. (2018). Synthesis of novel 4-functionalized, 5-diaryl-1,2,3-triazoles containing benzenesulfonamide moiety as carbonic anhydrase, I, II, IV and IX inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, (150): 678-686.

Verpoorte, J. A., Mehta, S. and Edsall, J. T. (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases. B and C. *Journal of Biological Chemistry*, (242): 4221-4229.

Wan, Z., Jia, C., Wang, Y. and Yao, X. (2017). A Strategy To Boost the Efficiency of Rhodanine Electron Acceptor for Organic Dye: From Nonconjugation to Conjugation. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, (9): 25225–25231.

Wang, C. Y., Liu, P. Y. and Liao, J. K. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends in molecular medicine*, 14(1): 37-44.

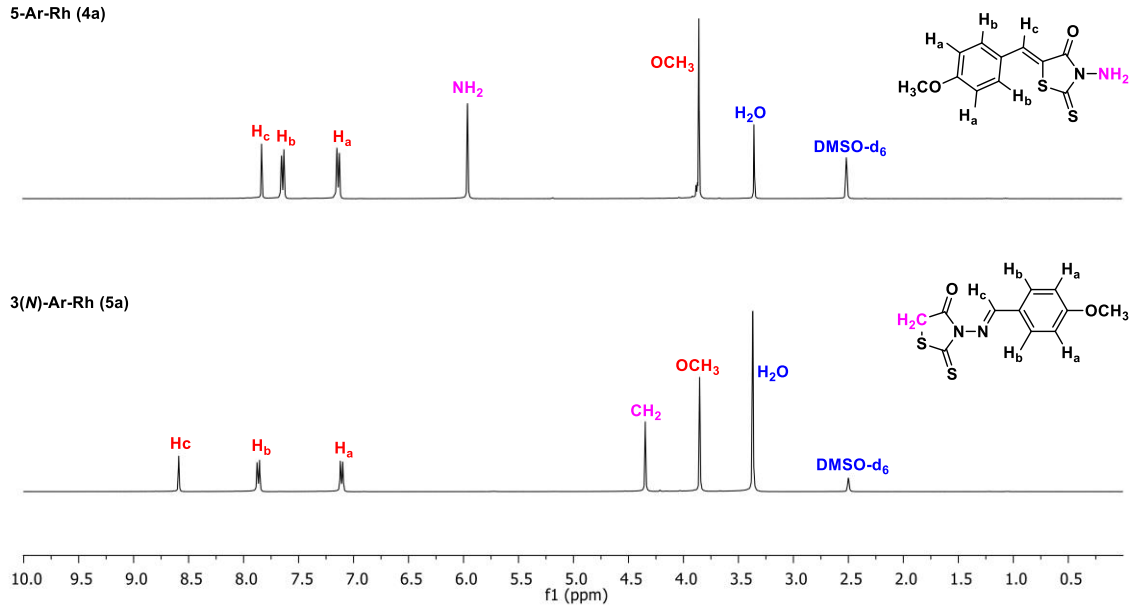
Wilbur, K. M. and Anderson, N. G. (1948). Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, (176): 147-154.

Yılmaz, E. M. and Doğan, İ. (2008). Axially chiral N-(o-aryl)-2-thioxo-oxazolidine-4-one and Rhodanine derivatives: Enantiomeric separation and determination of racemization barriers. *Tetrahedron: Asymmetry*, 19(18): 2184-2191.

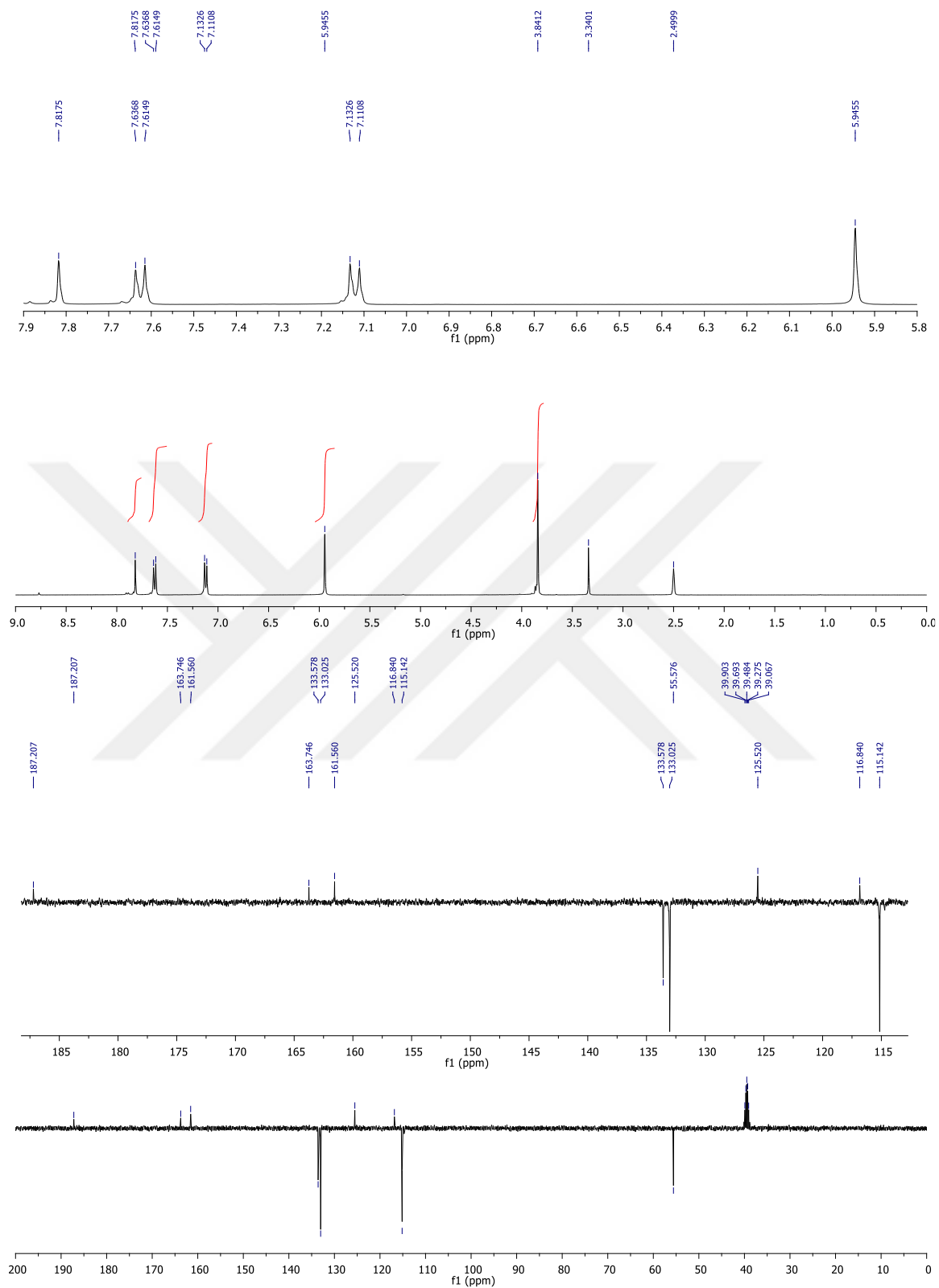


EKLER

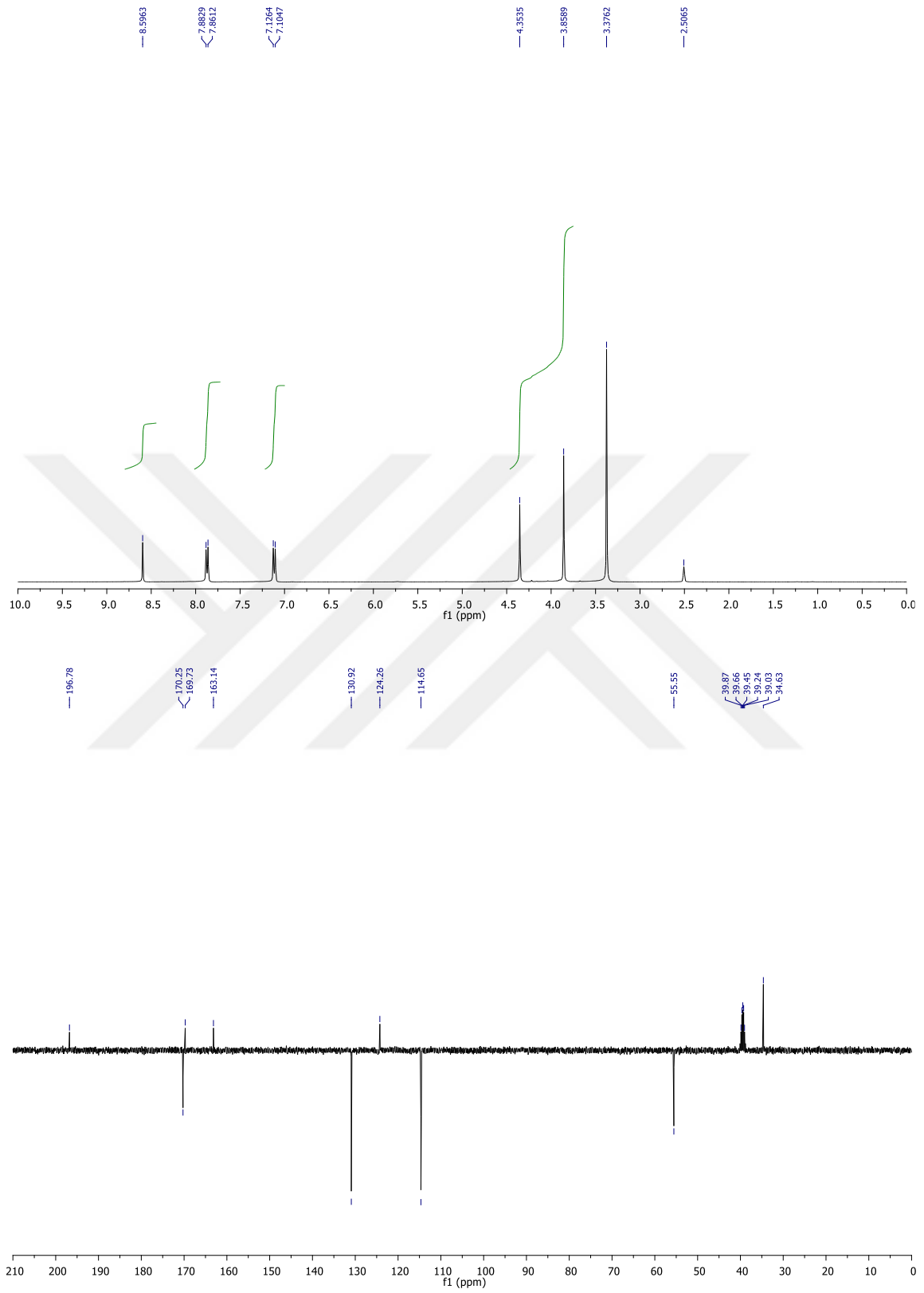
Ek A. NMR spektrumları



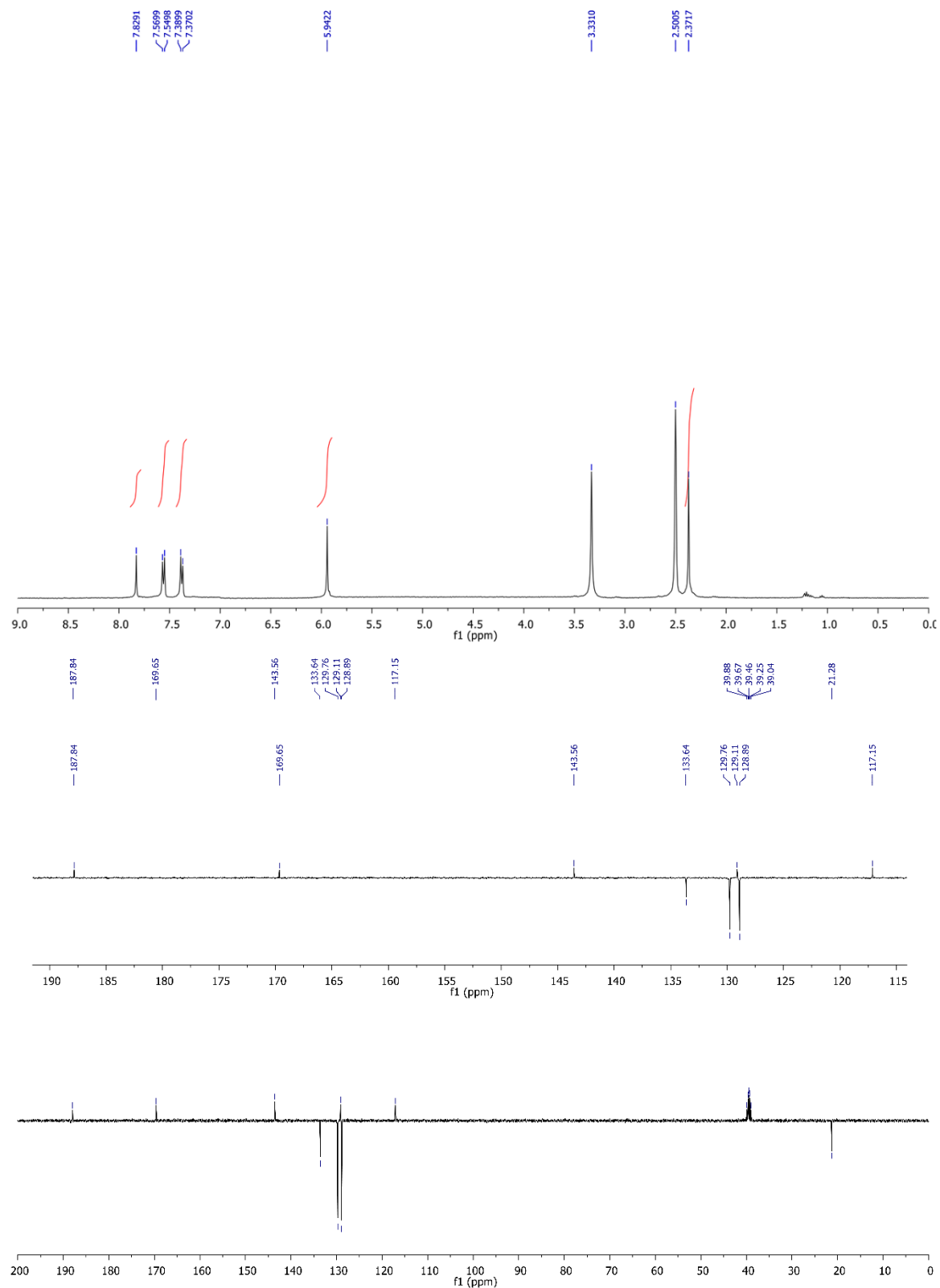
EK A1. Rh türevleri 4a ve 5a' nın ¹H-NMR spektrumlarının karşılaştırılması



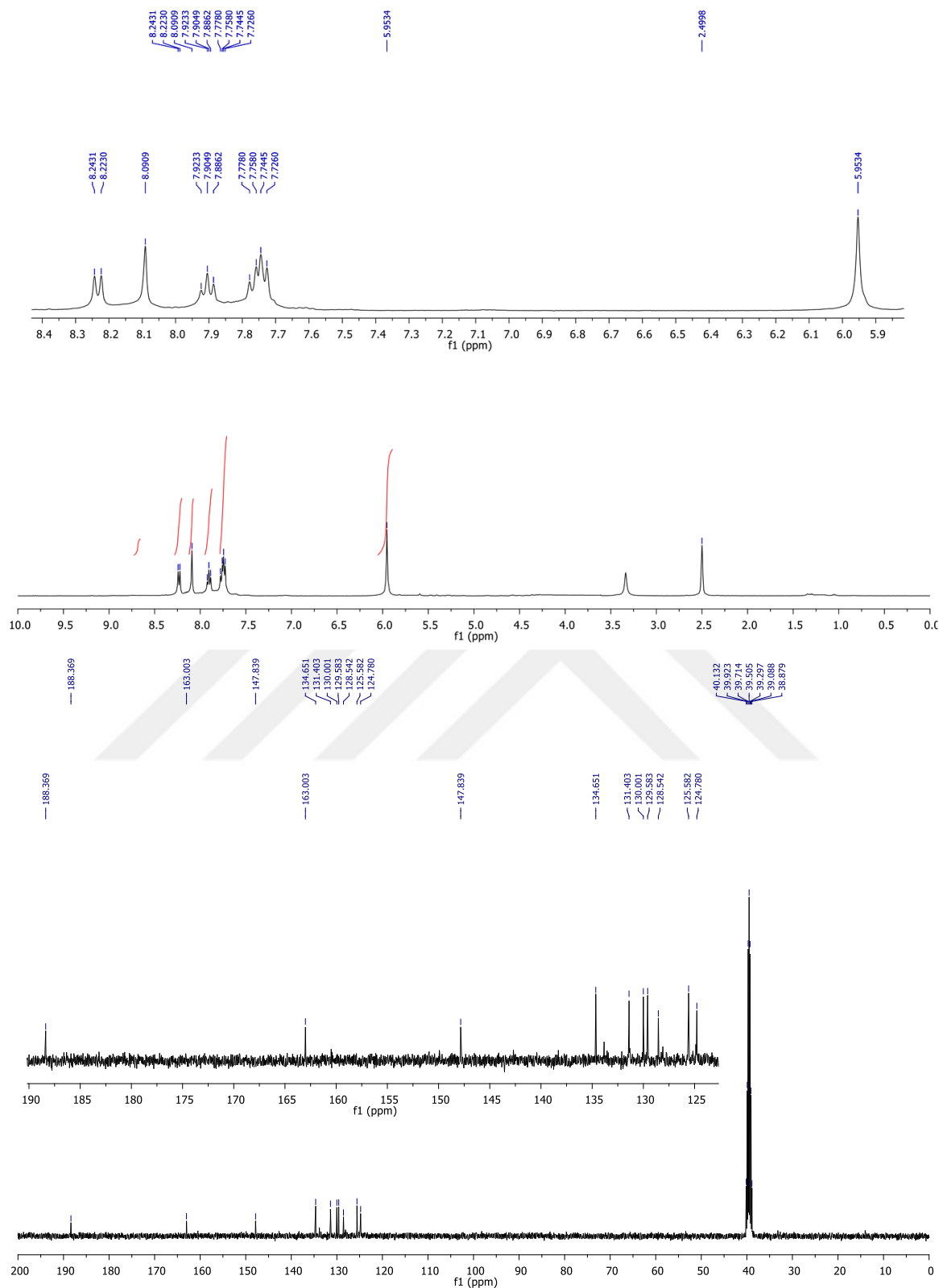
EK A2. 5-Ar-Rh 4a'nın ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



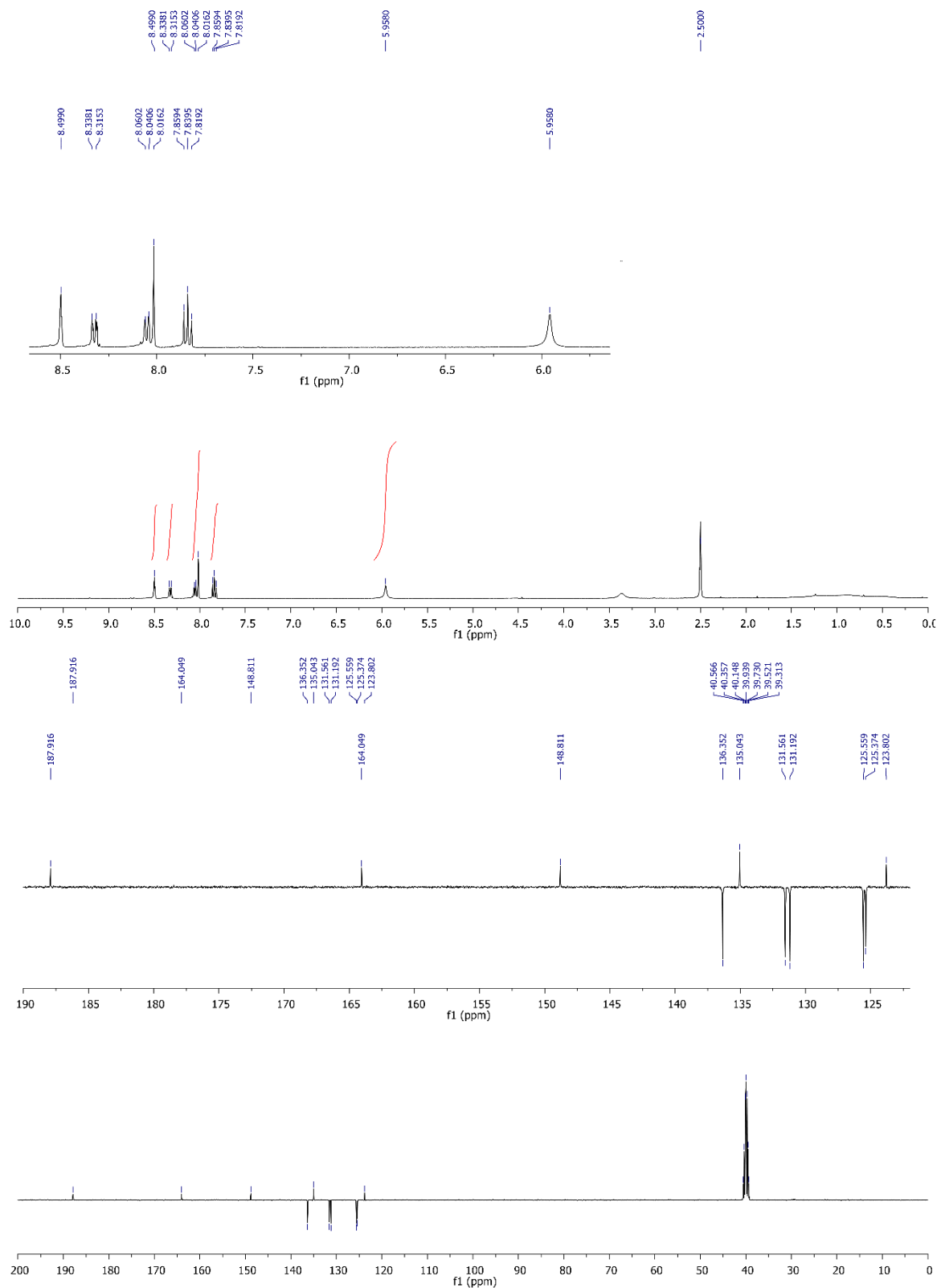
EK A3. 5-Ar-Rh 5a'nın ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



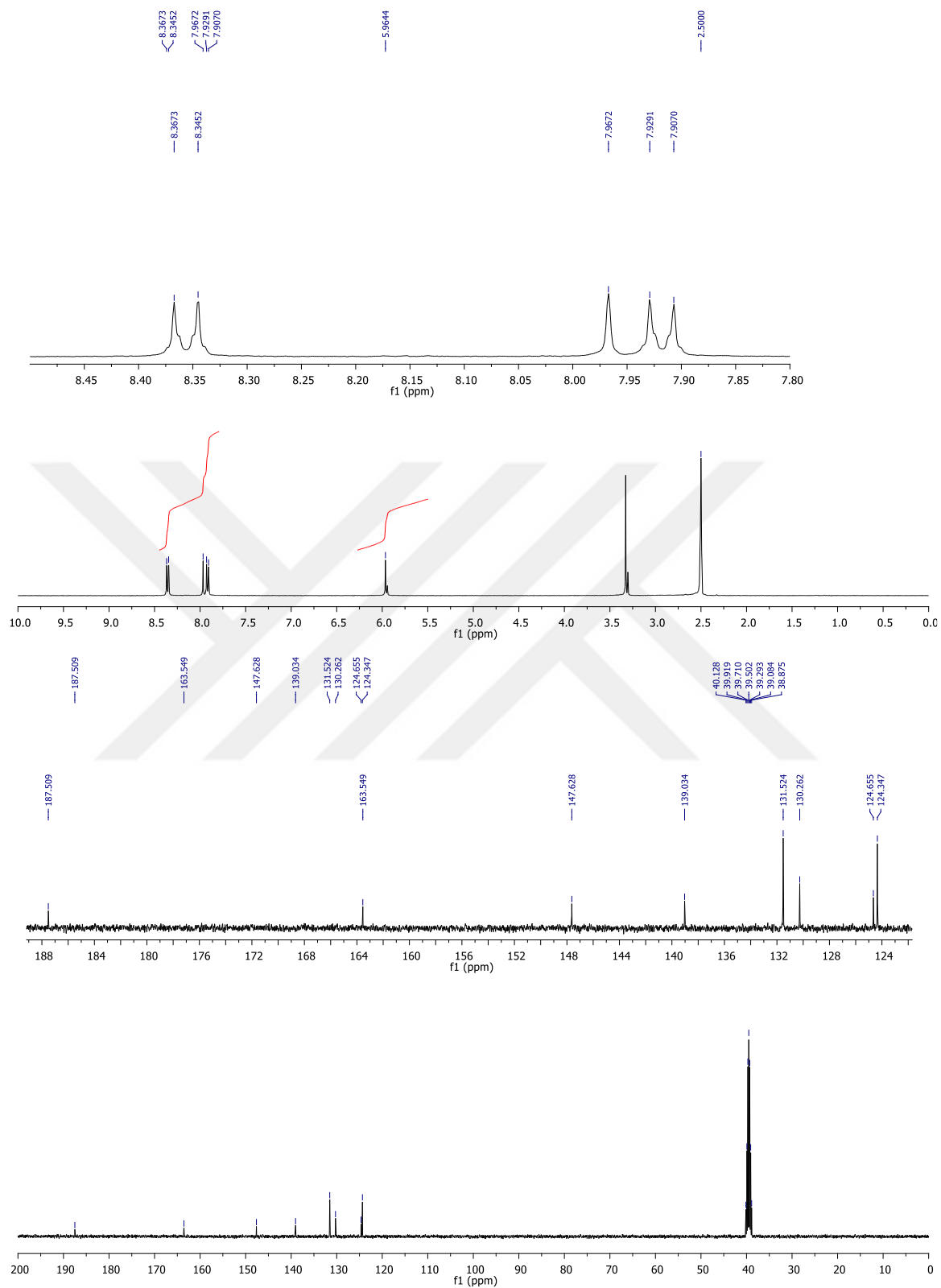
EK A4. 5-Ar-Rh 4b'nin ^1H -NMR (400 MHz) ve APT ^{13}C -NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO- d_6).



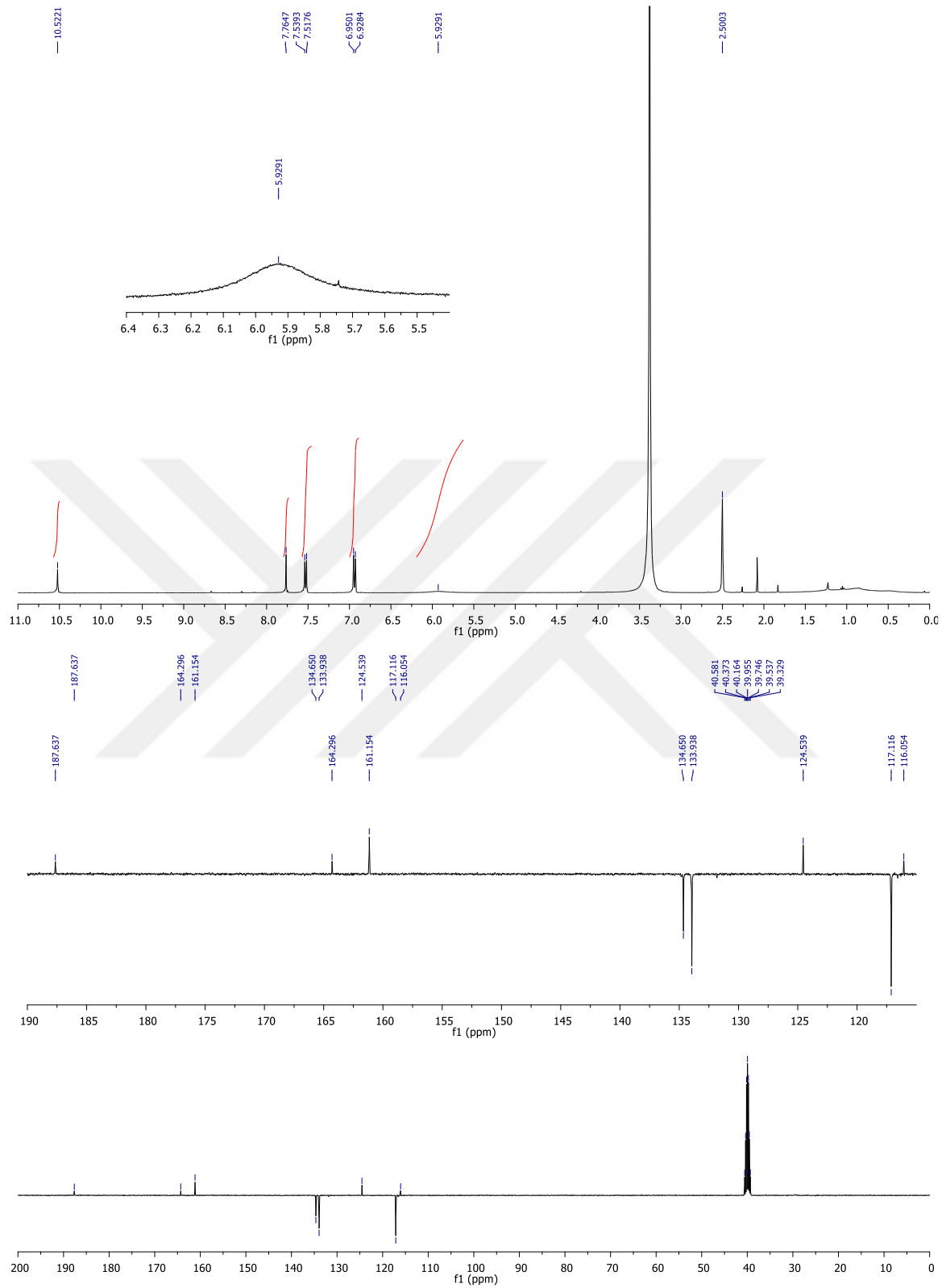
EK A5. 5-Ar-Rh 4c'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



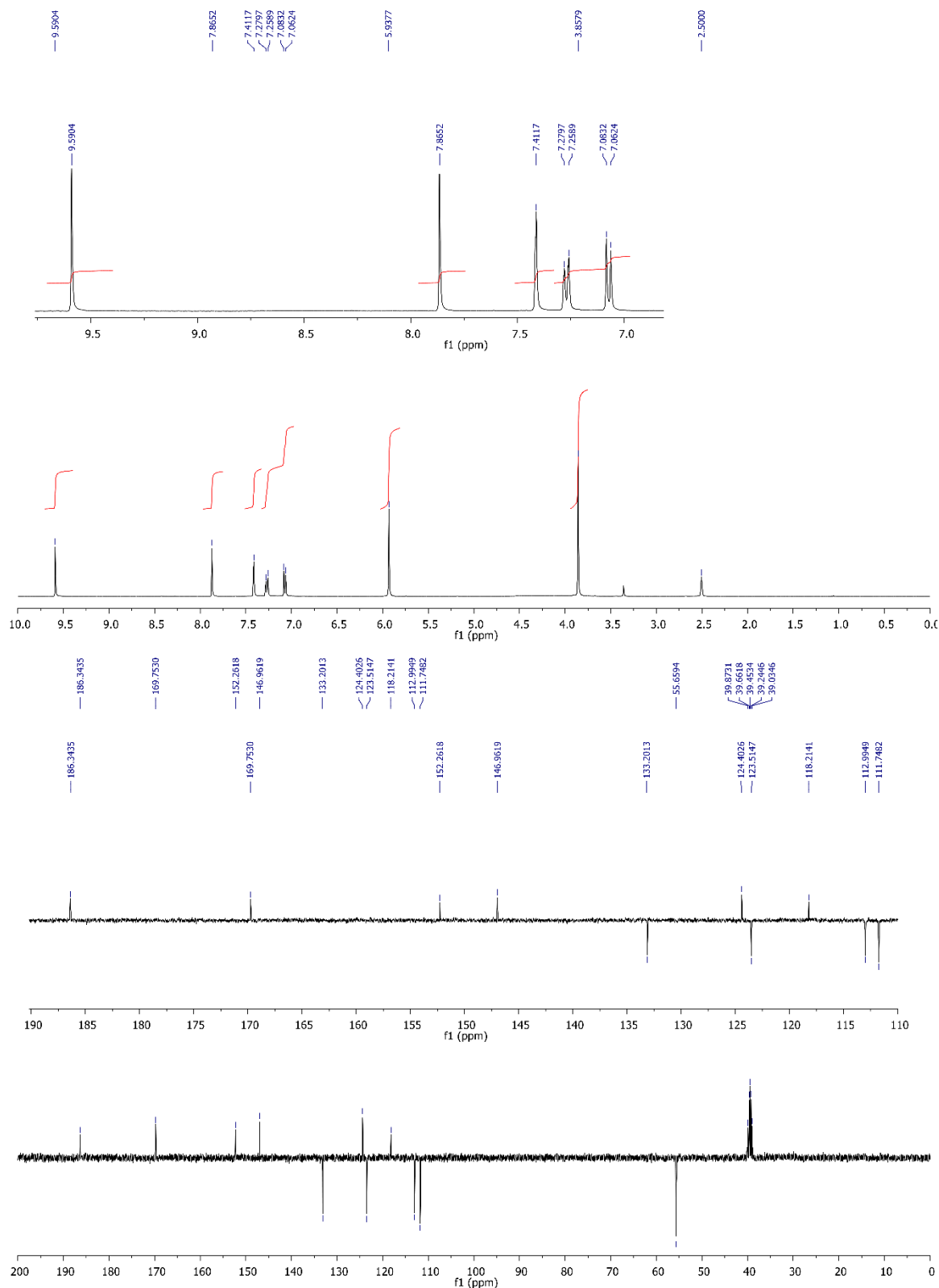
EK A6. 5-Ar-Rh 4d'nin ^1H -NMR (400 MHz) ve APT ^{13}C -NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO- d_6).



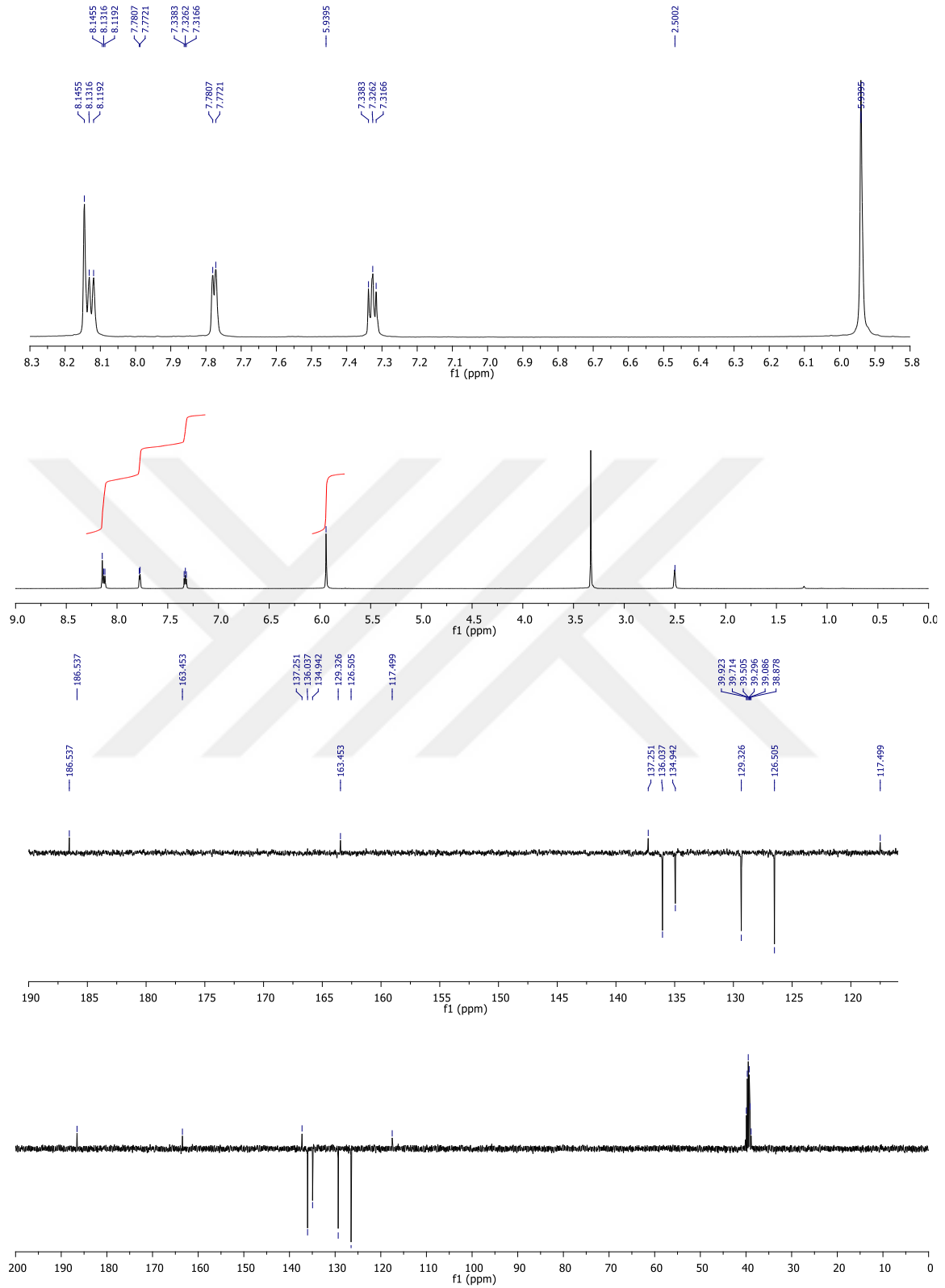
EK A7. 5-Ar-Rh 4e' nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



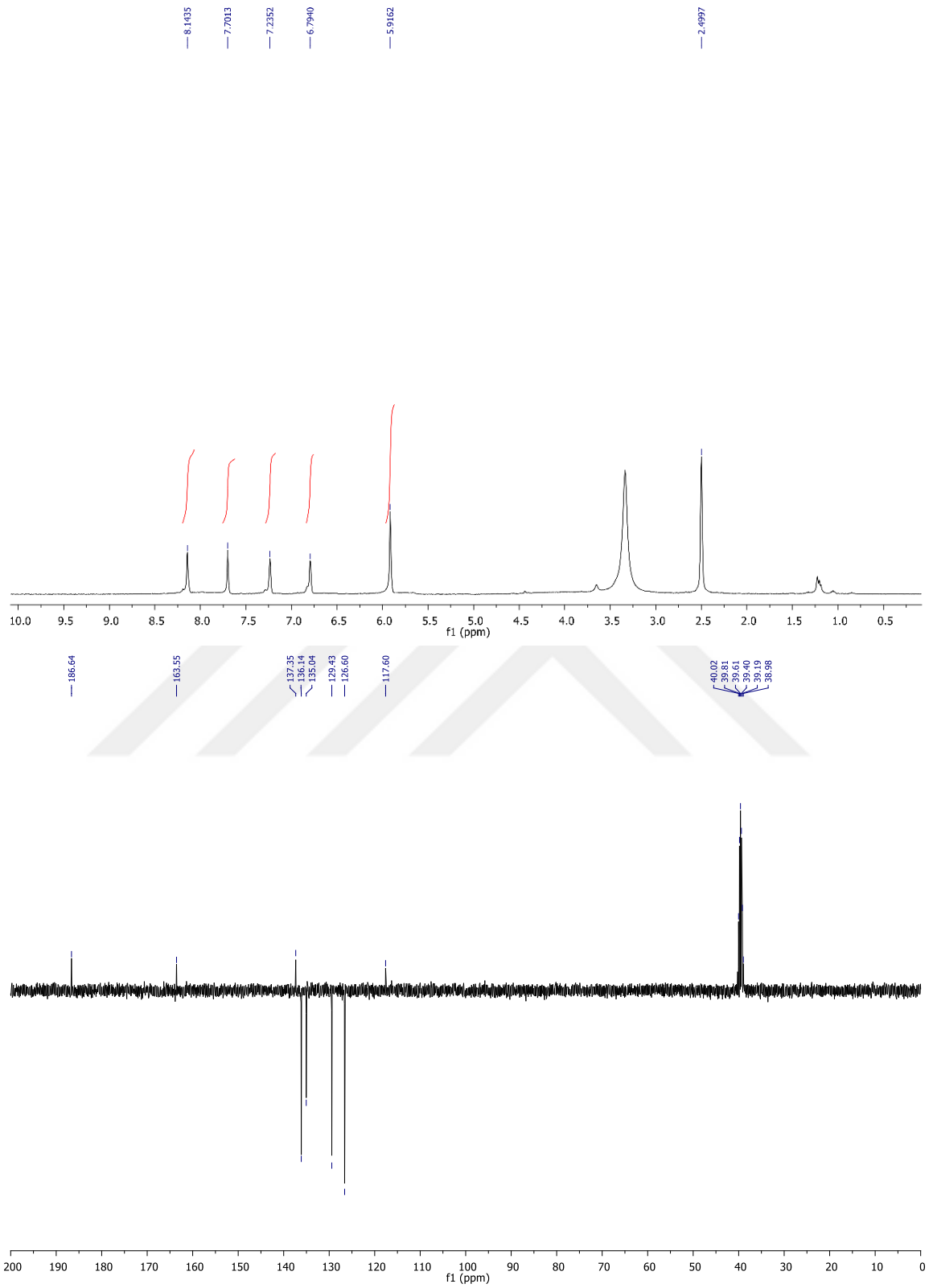
EK A8. 5-Ar-Rh 4f'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



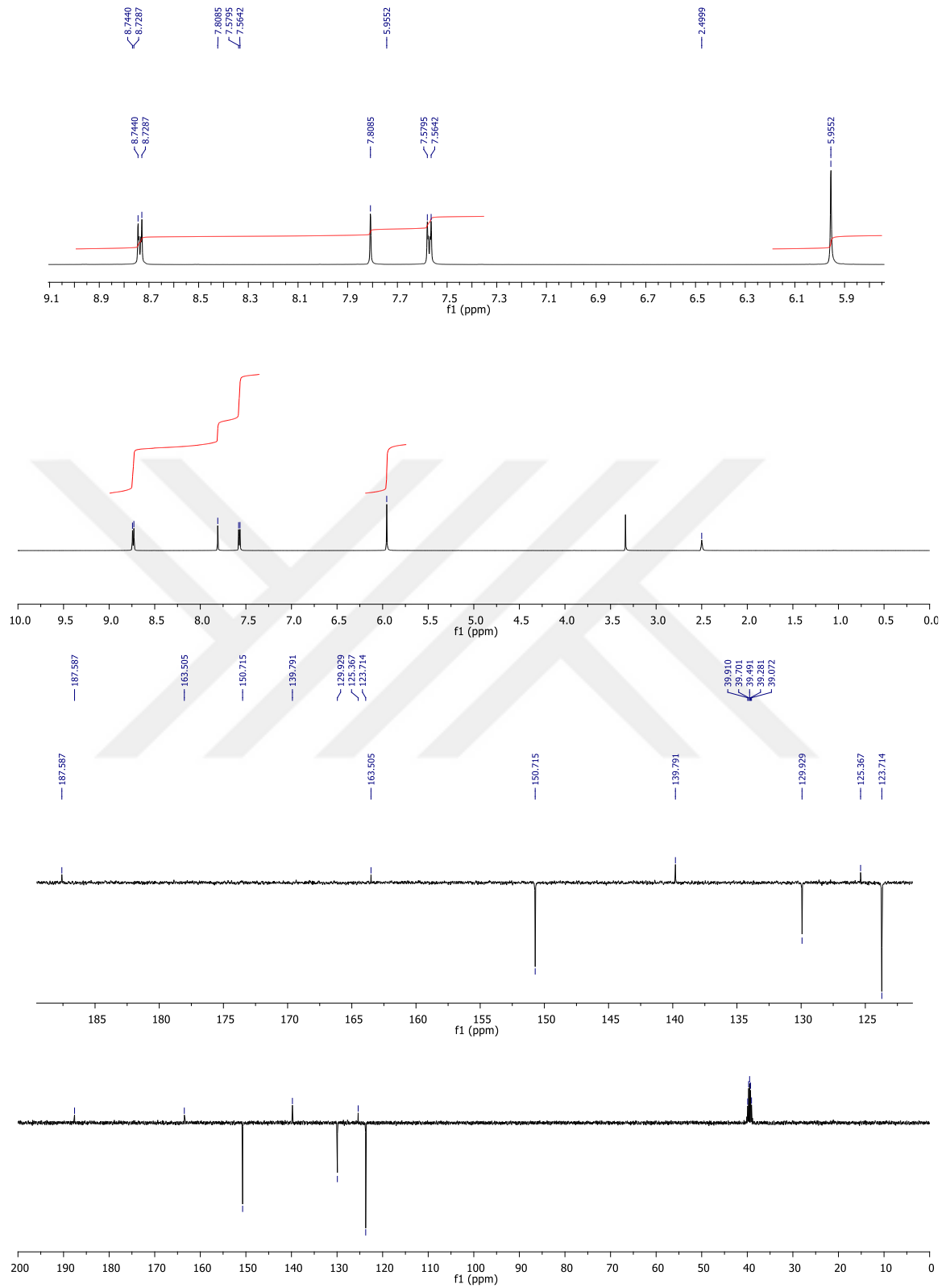
EK A9. 5-Ar-Rh 4g'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



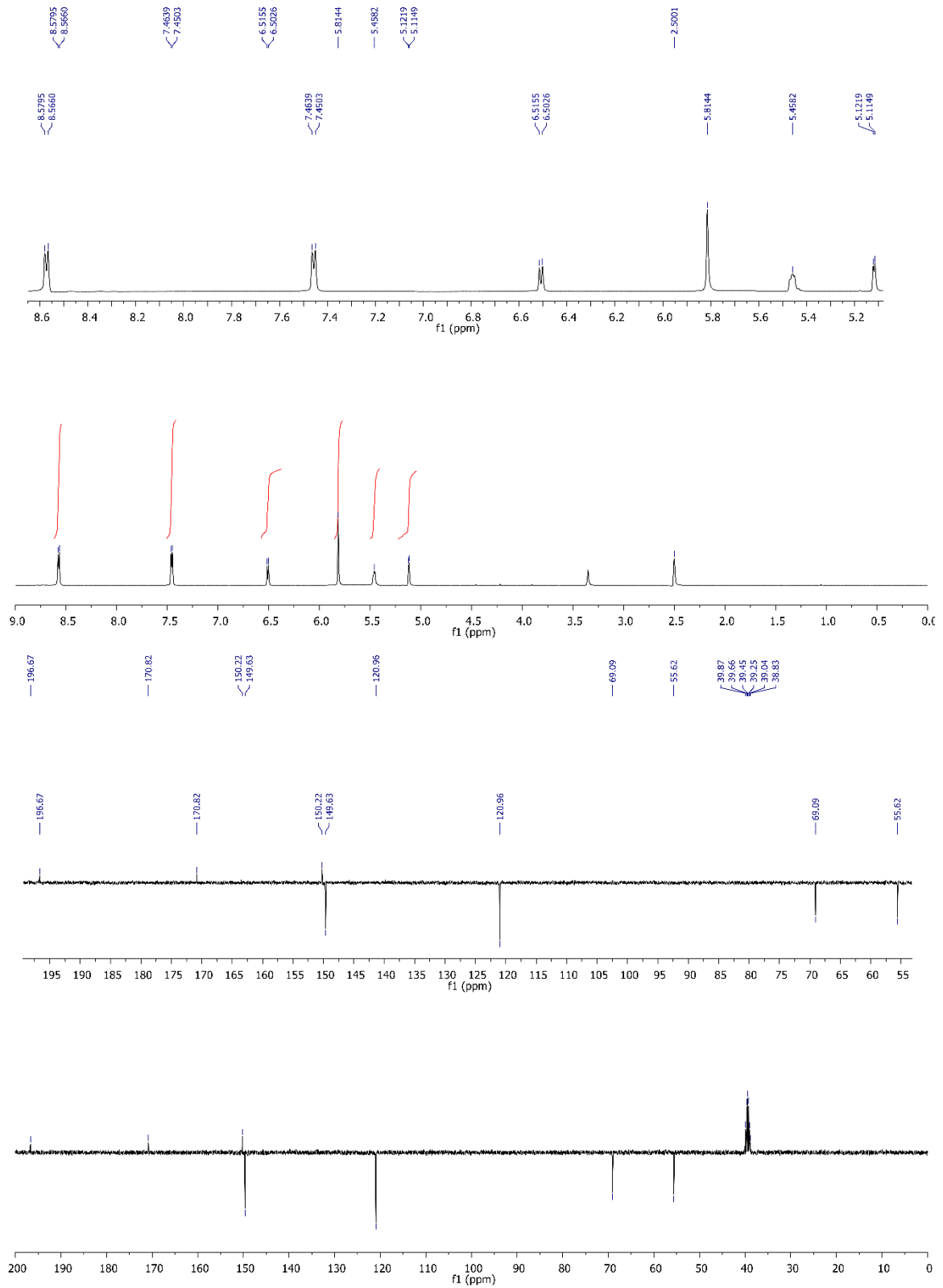
EK A10. 5-Ar-Rh 4h'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).



EK A11. 5-Ar-Rh 4i'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).

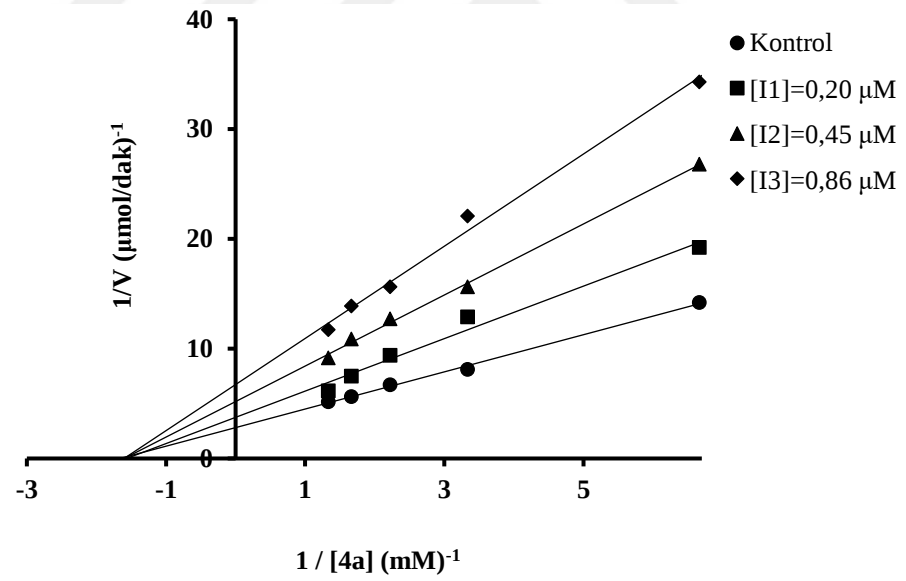
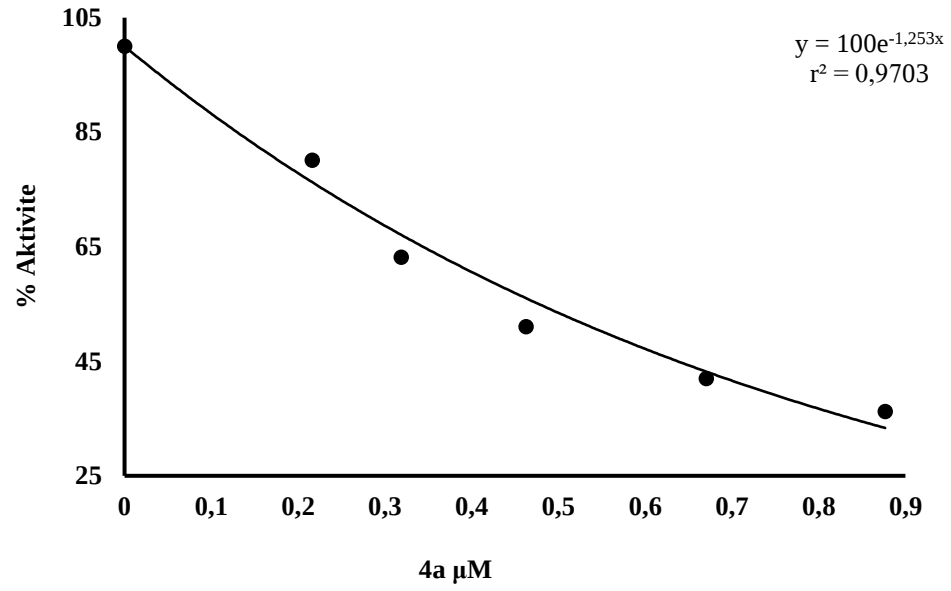


EK A12. 5-Ar-Rh 4j'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).

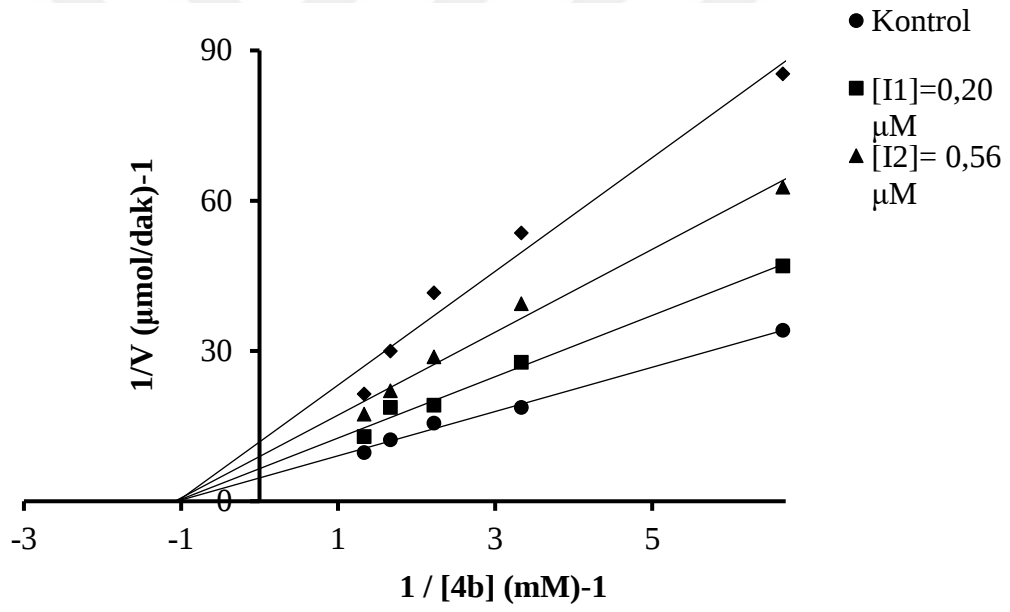
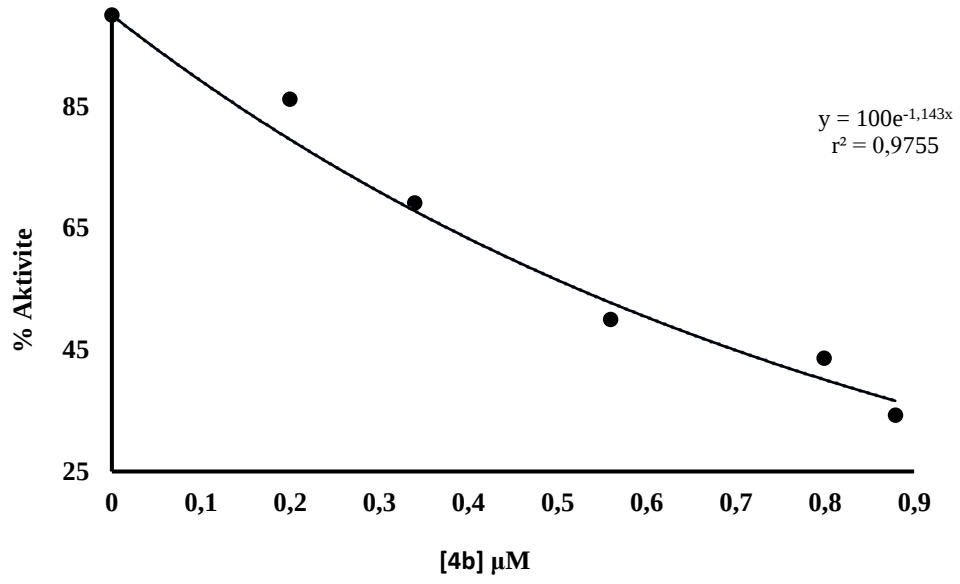


EK A13. 5-Ar-Rh 6j'nin ¹H-NMR (400 MHz) ve APT ¹³C-NMR (100 MHz) spektrumları (DMSO-d₆).

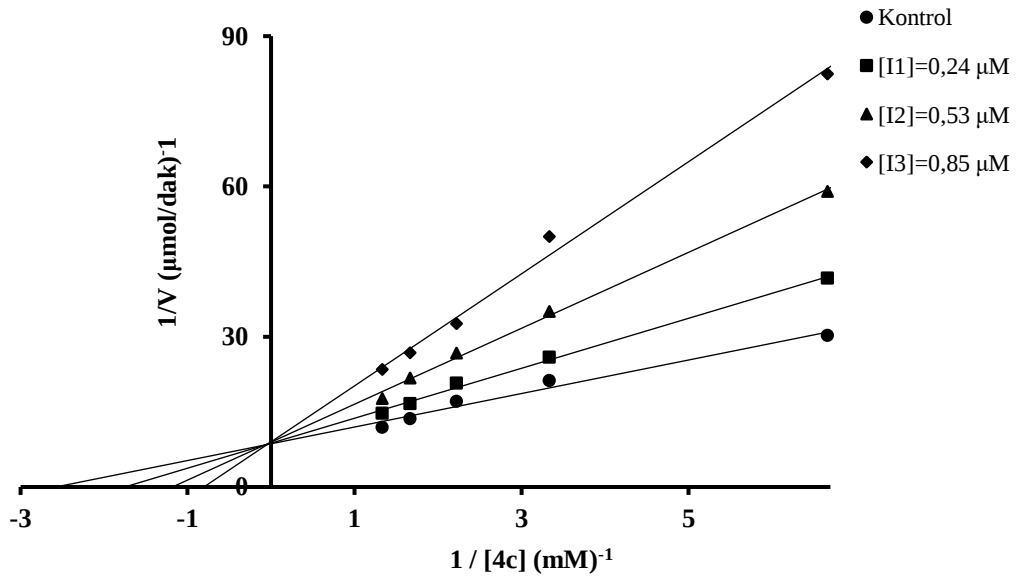
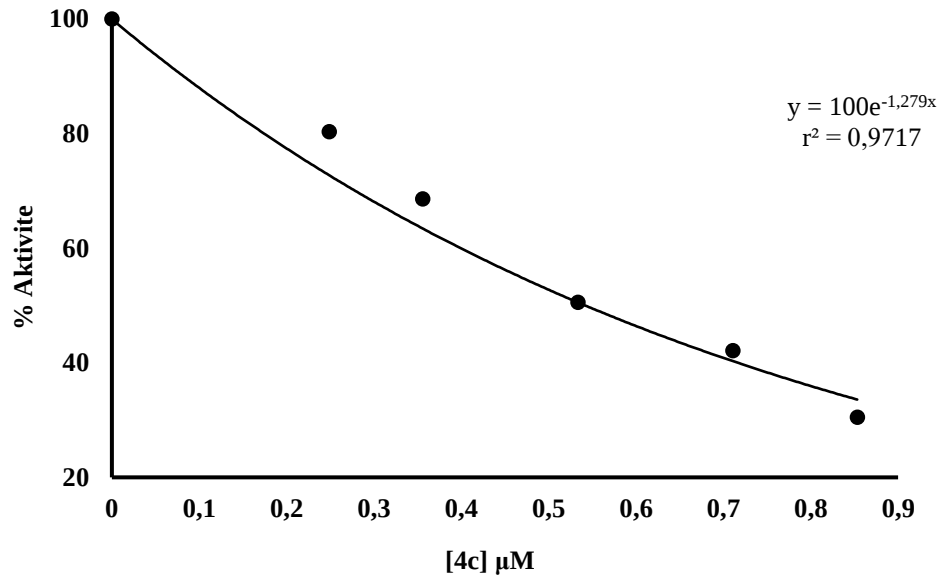
EK B. IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri



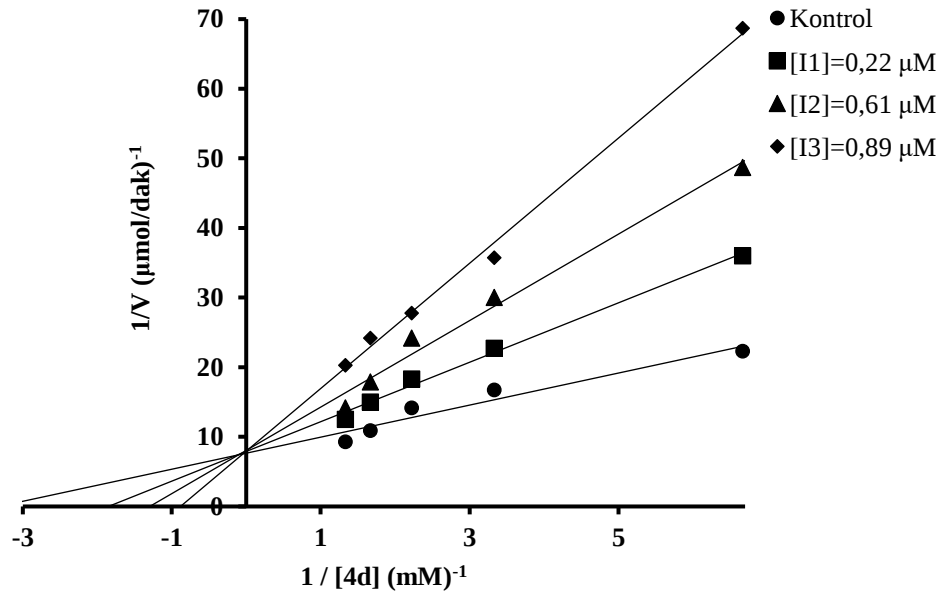
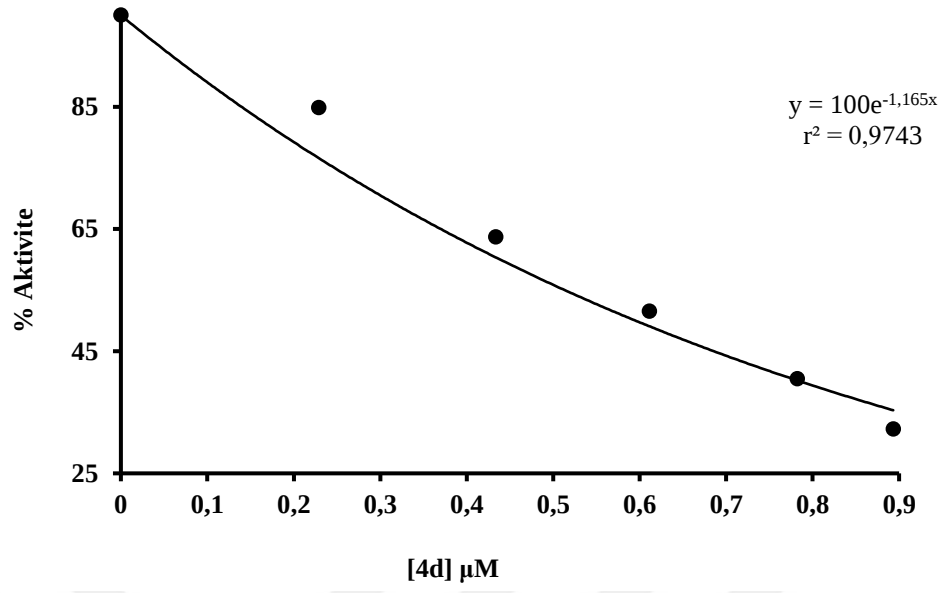
EK B1. Ar-Rh 4a'nın *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA I*)



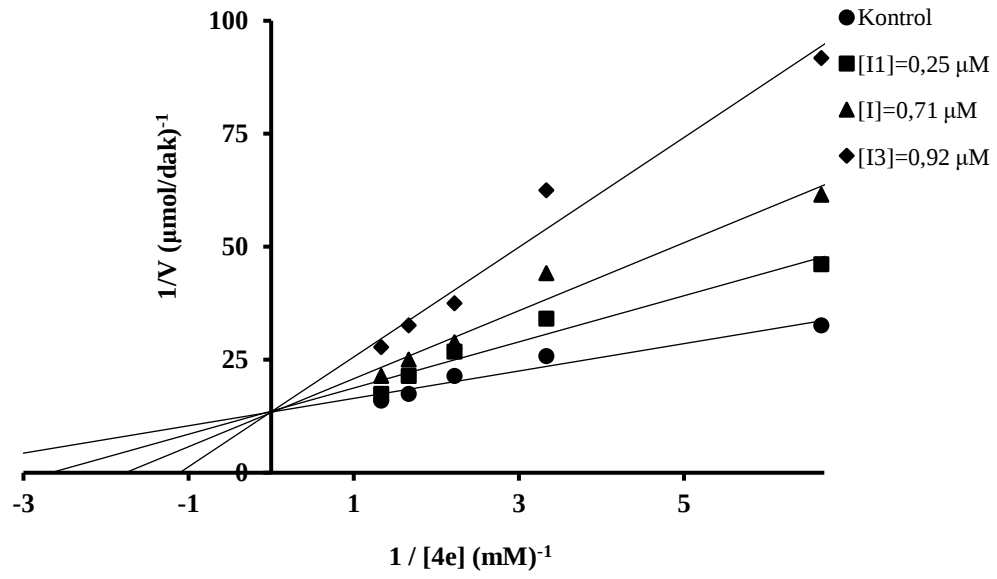
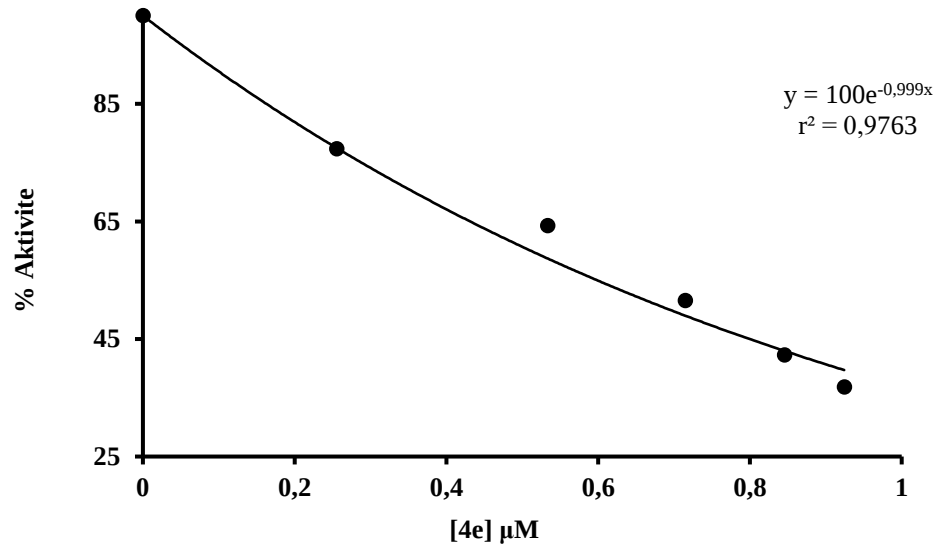
EK B2. Ar-Rh 4b'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (hCA I)



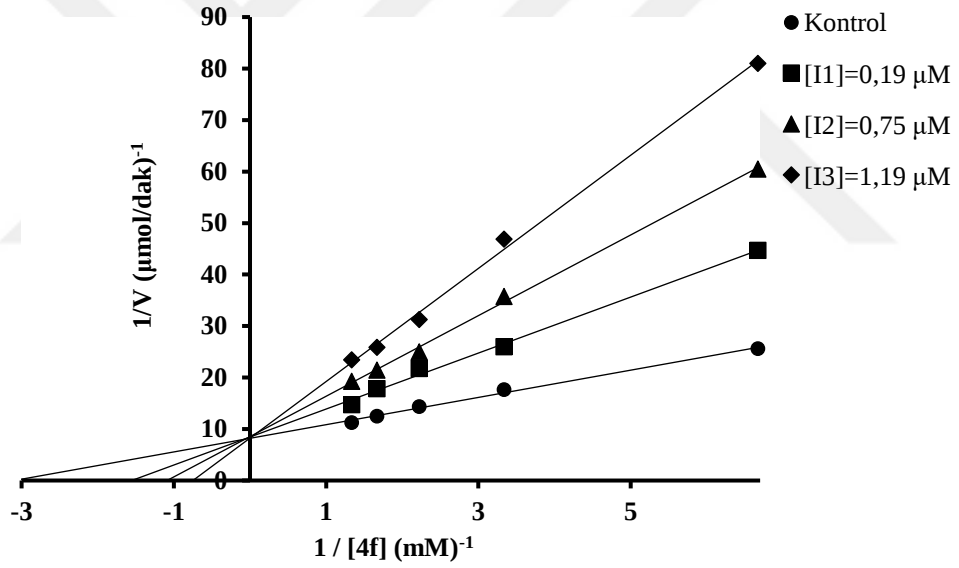
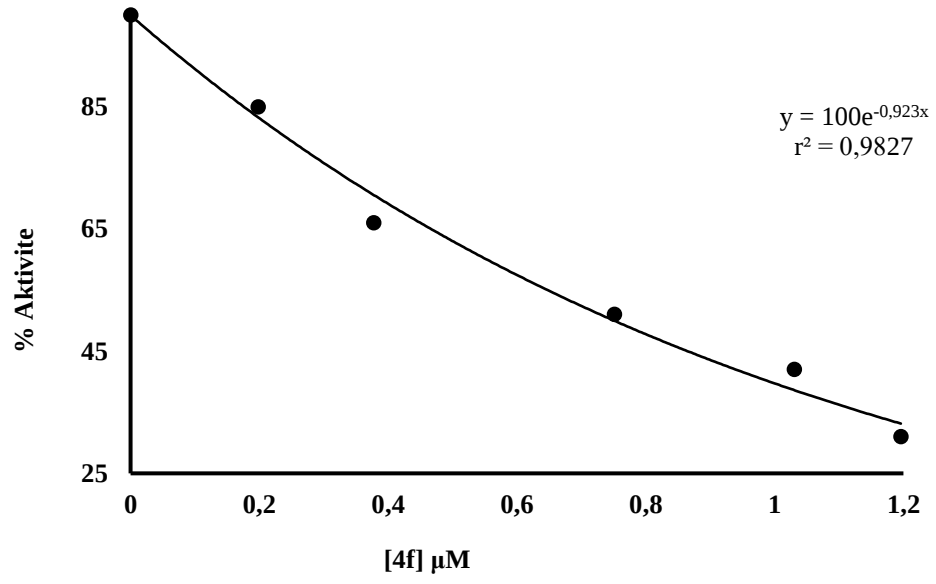
EK B3. Ar-Rh 4c'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (hCA I)



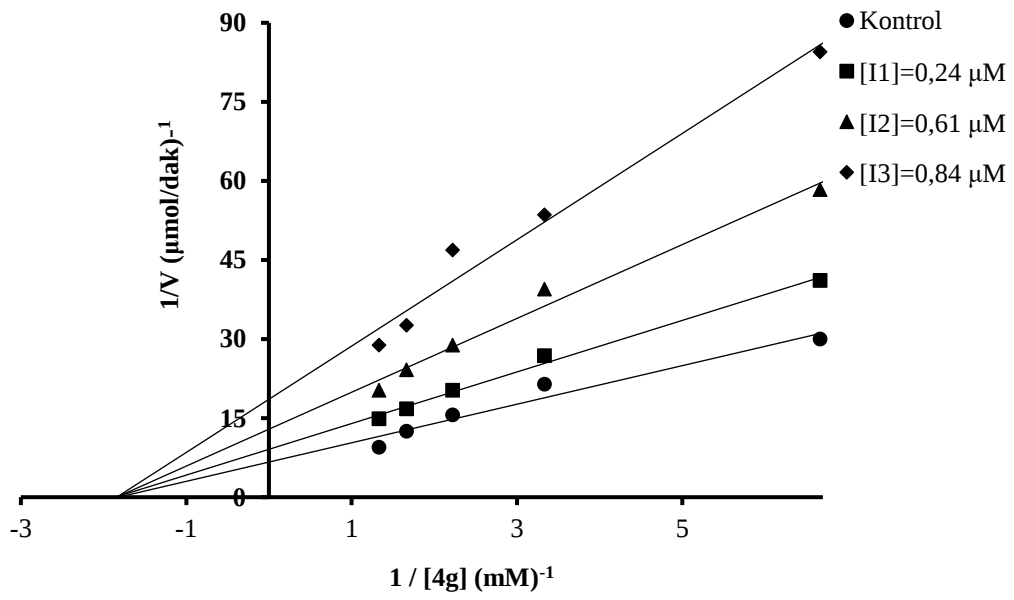
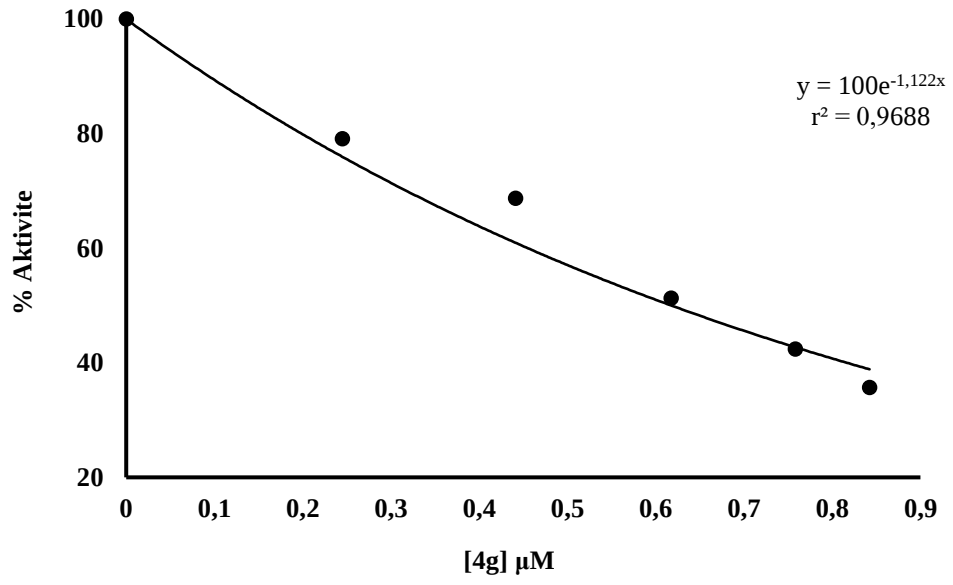
EK B4. Ar-Rh 4d'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA I*)



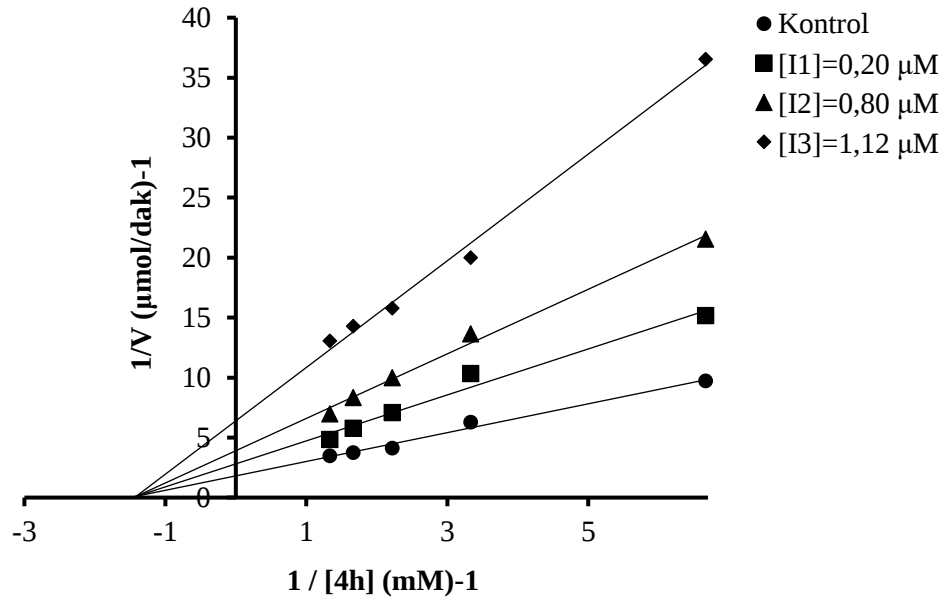
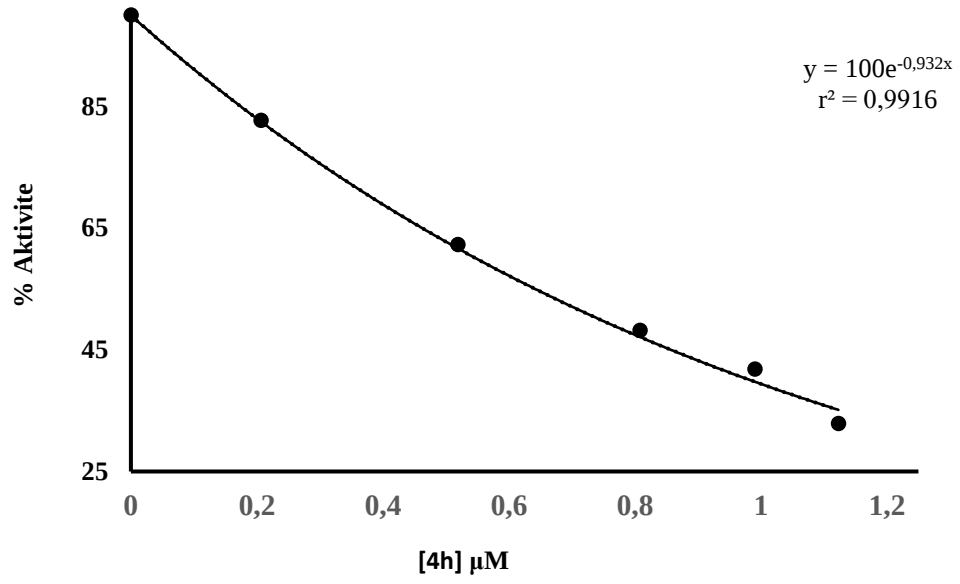
EK B5. Ar-Rh 4e'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (hCA I)



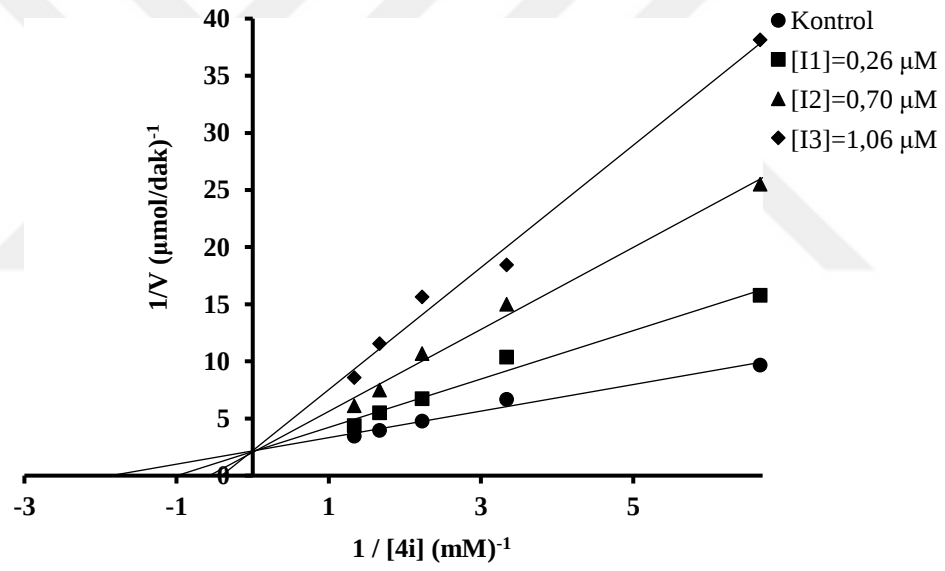
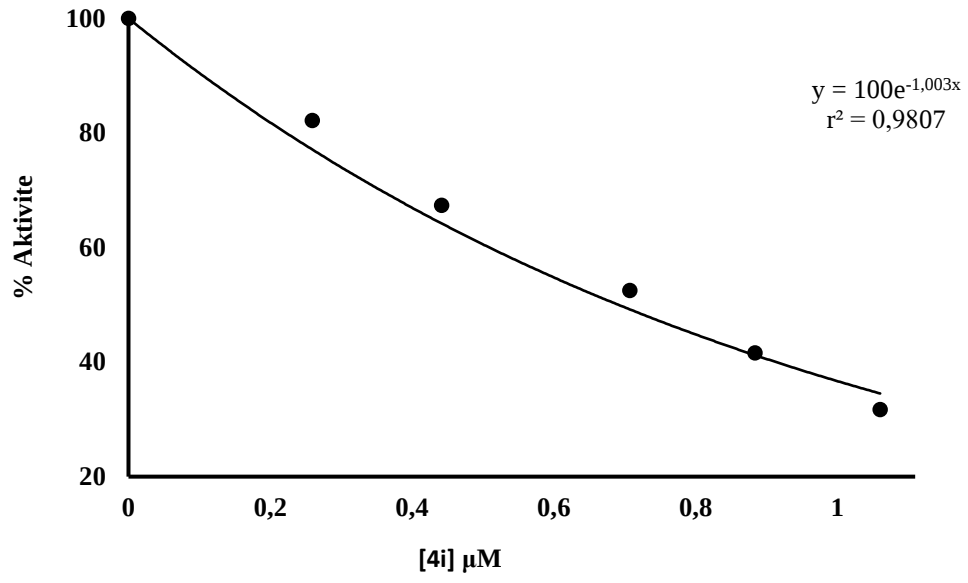
EK B6. Ar-Rh 4f'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA I*)



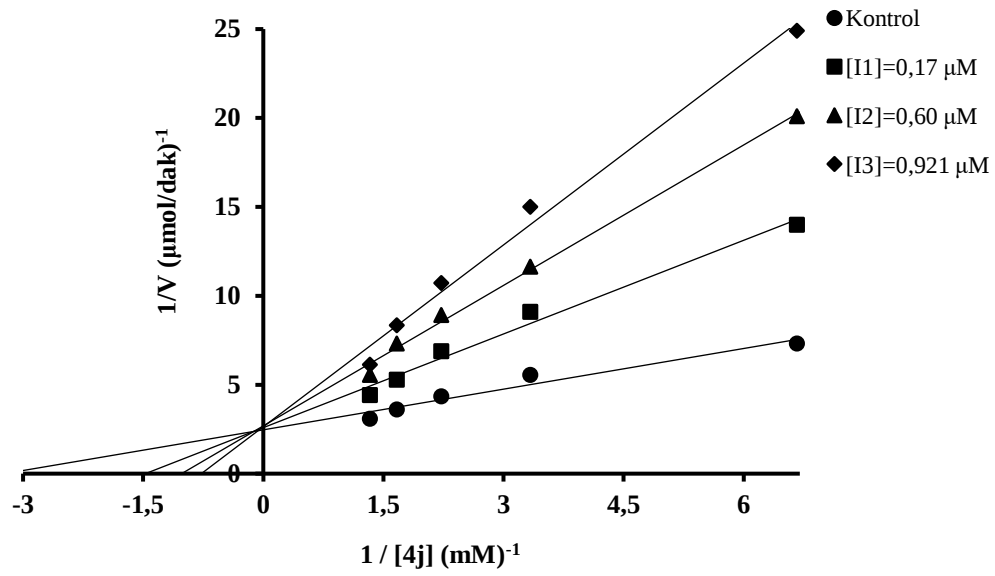
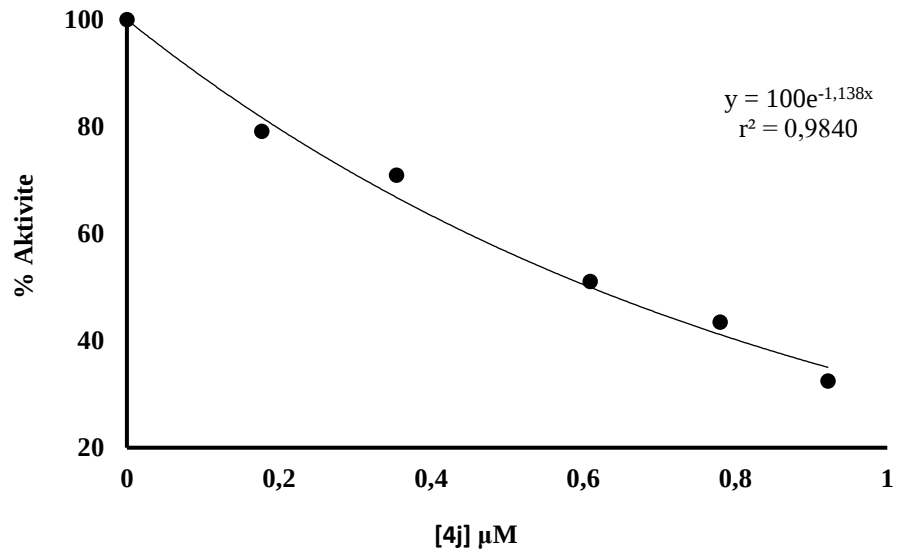
EK B7. Ar-Rh 4g'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (hCA I)



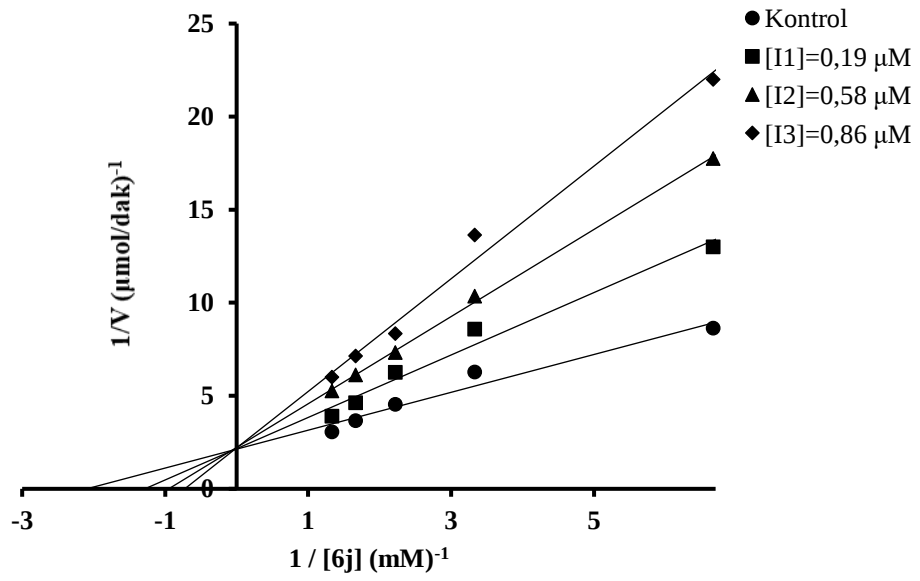
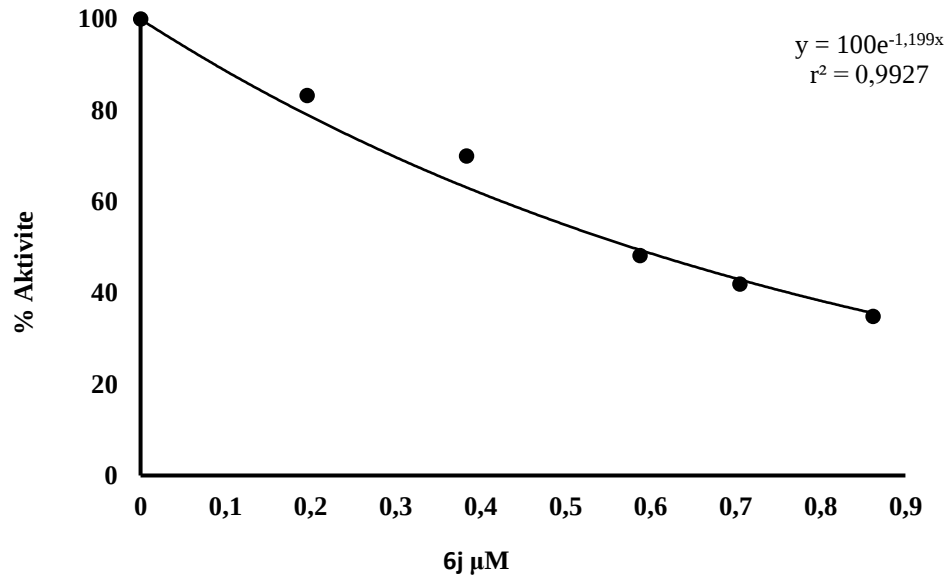
EK B8. Ar-Rh 4h'nin *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver–Burk grafikleri (hCA I)



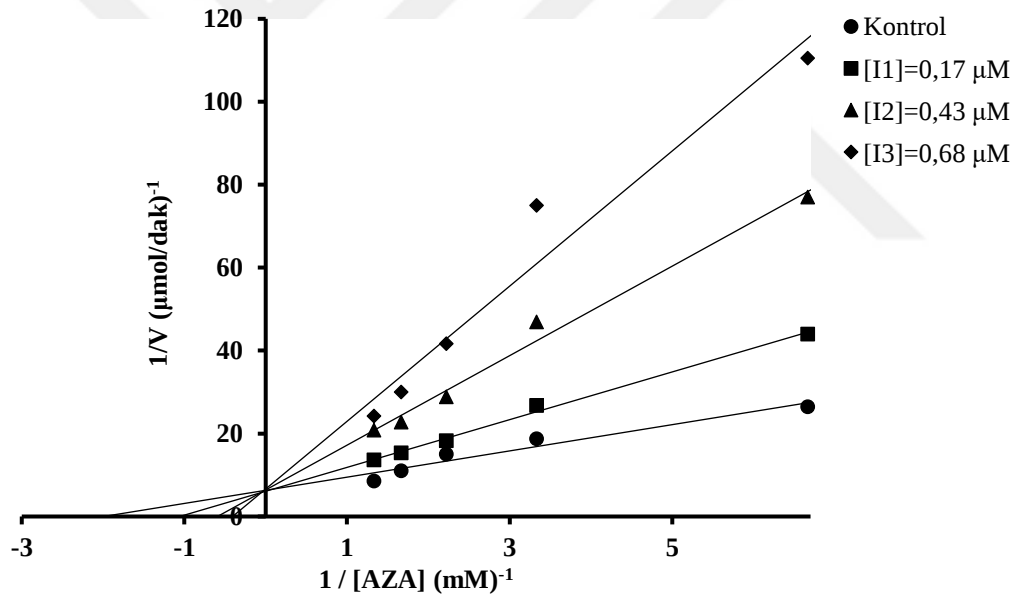
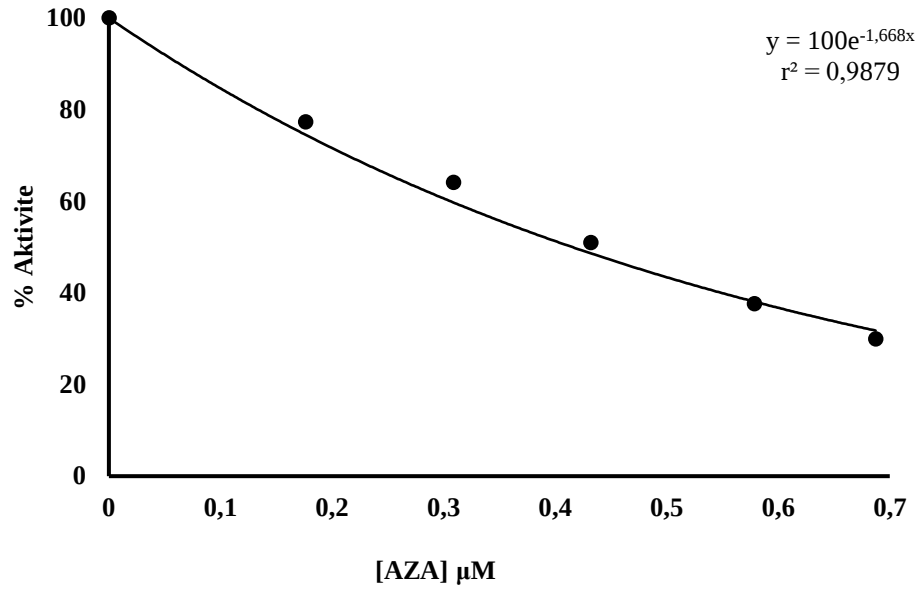
EK B9. Ar-Rh 4i'nin *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA I*)



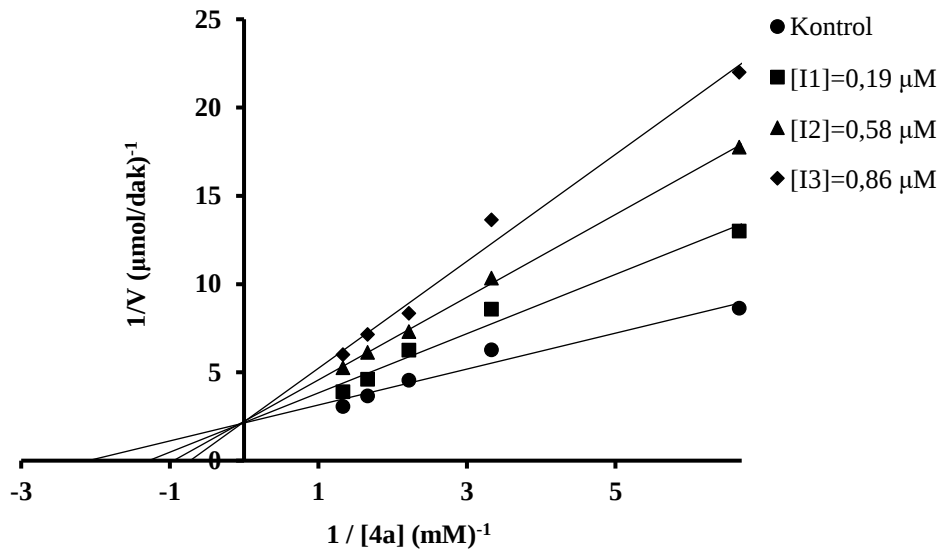
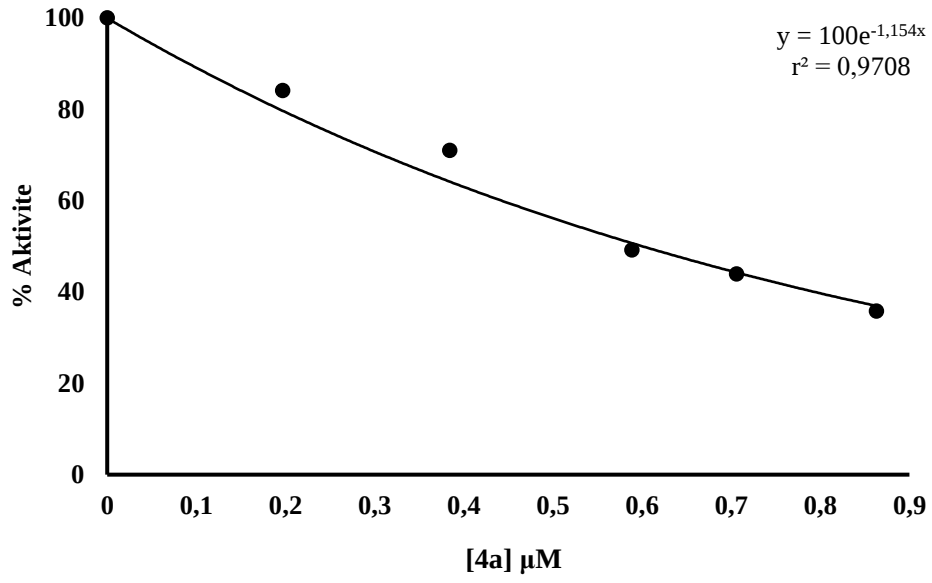
EK B10. Ar-Rh 4j'nin *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA I*)



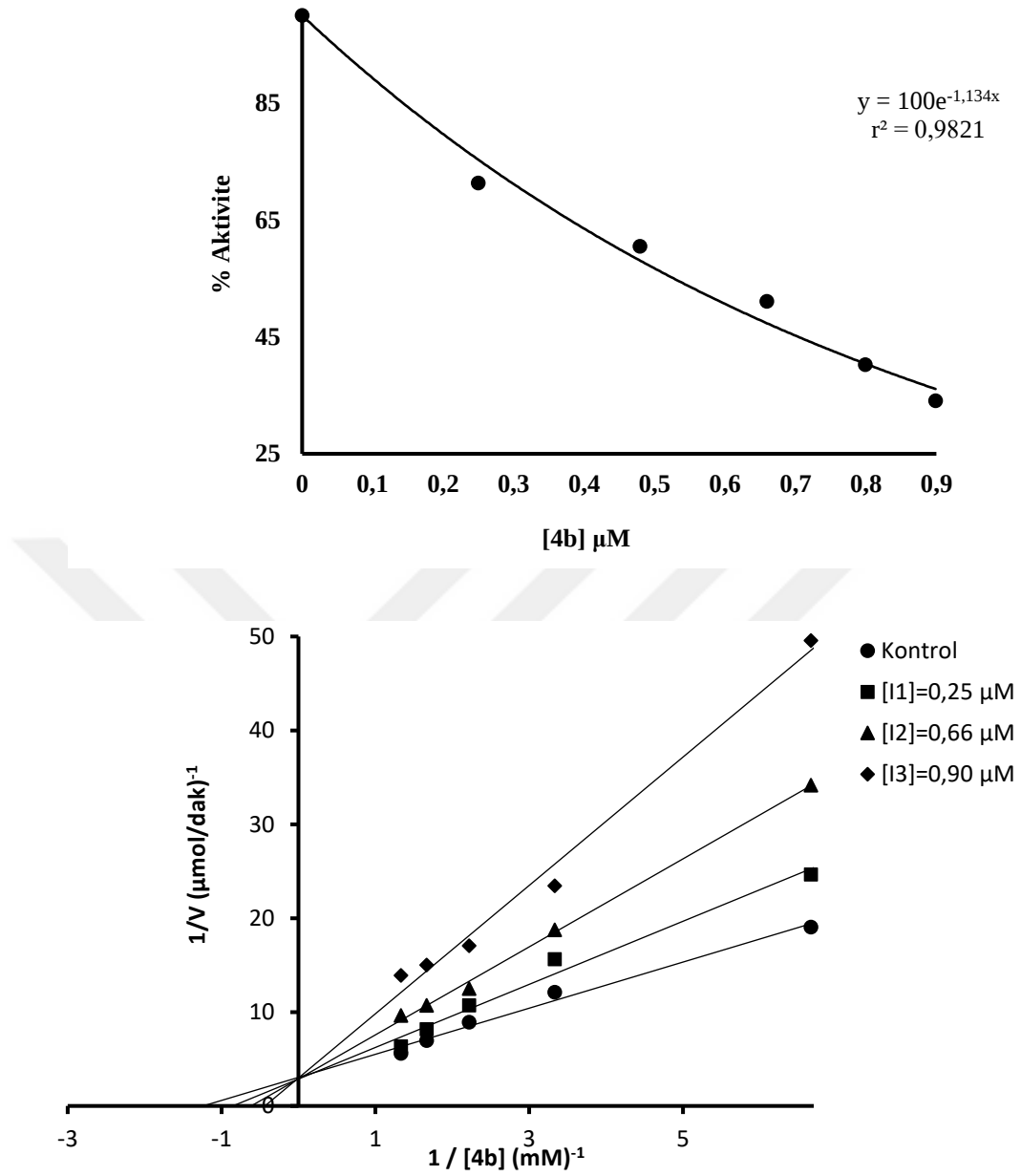
EK B11. Ar-Rh 6j'nin *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA I*)



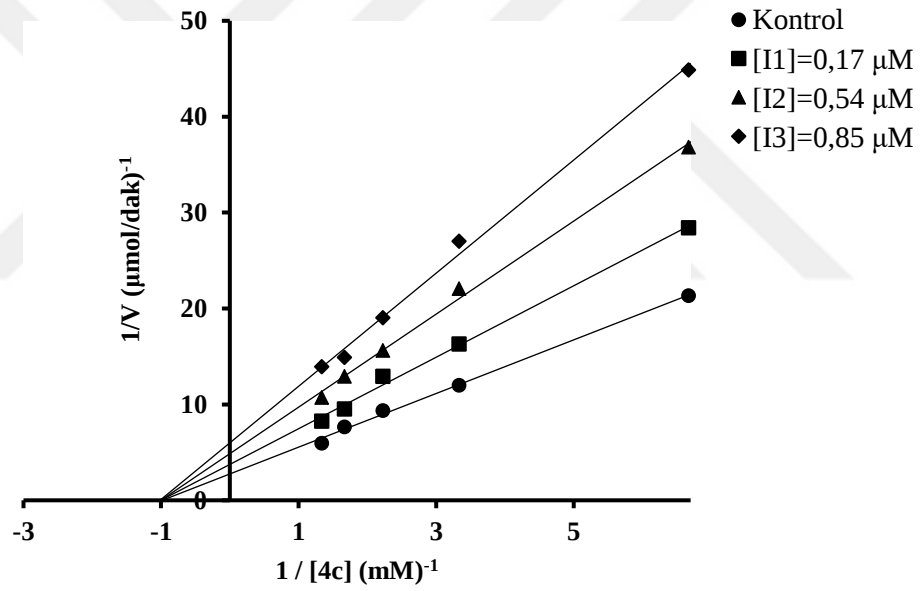
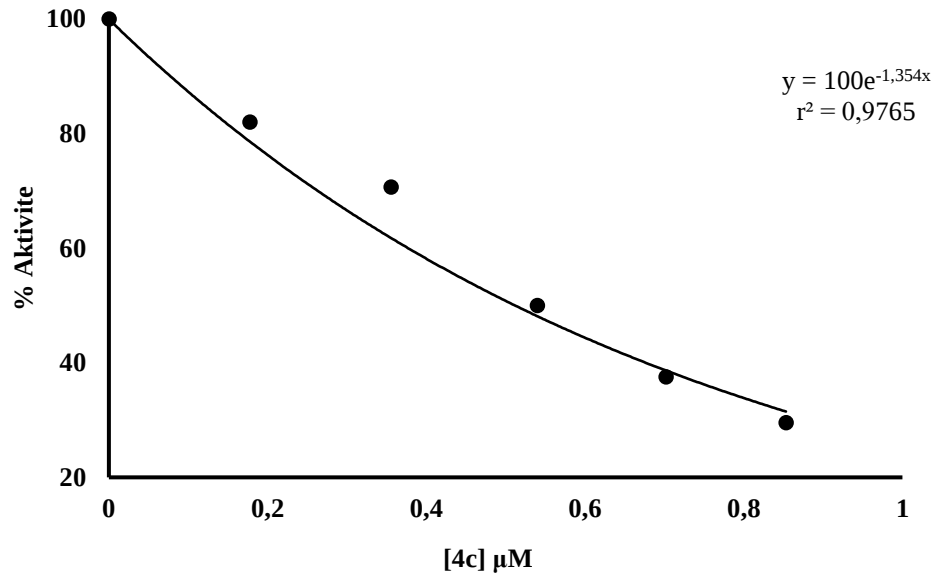
EK B12. Ar-Rh AZA'nın *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver-Burk grafikleri (hCA I)



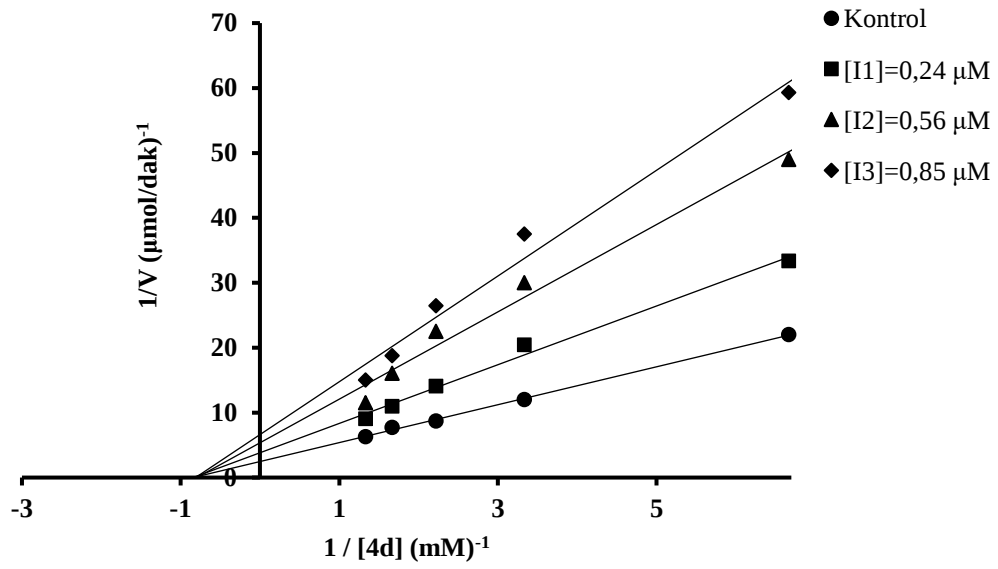
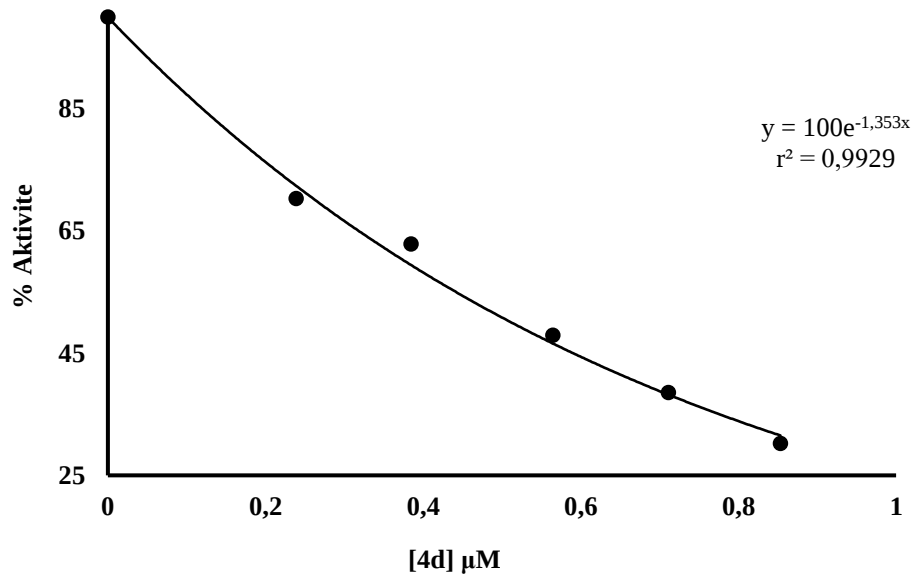
EK B13. Ar-Rh 4a'nın *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA II*)



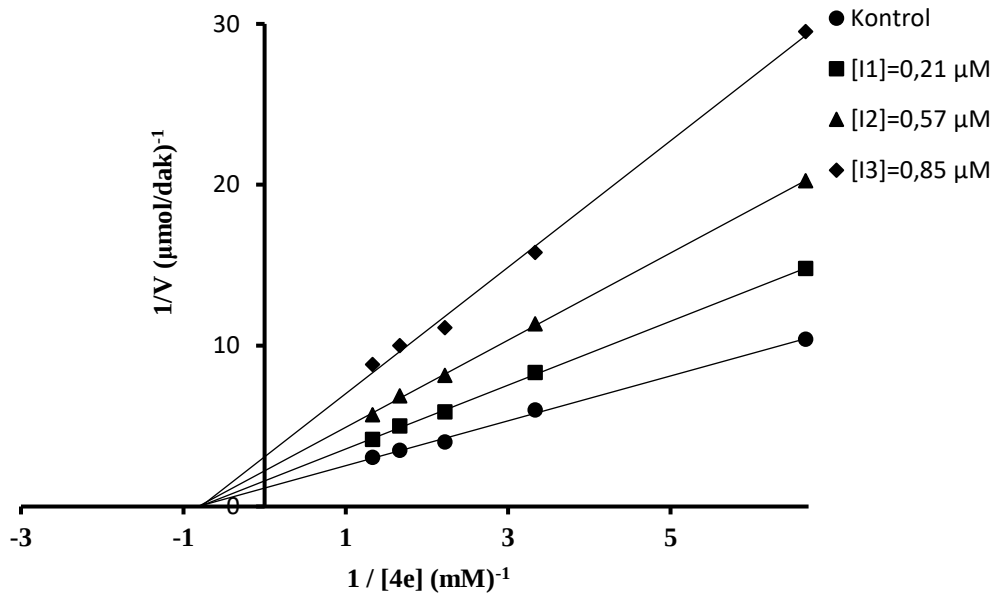
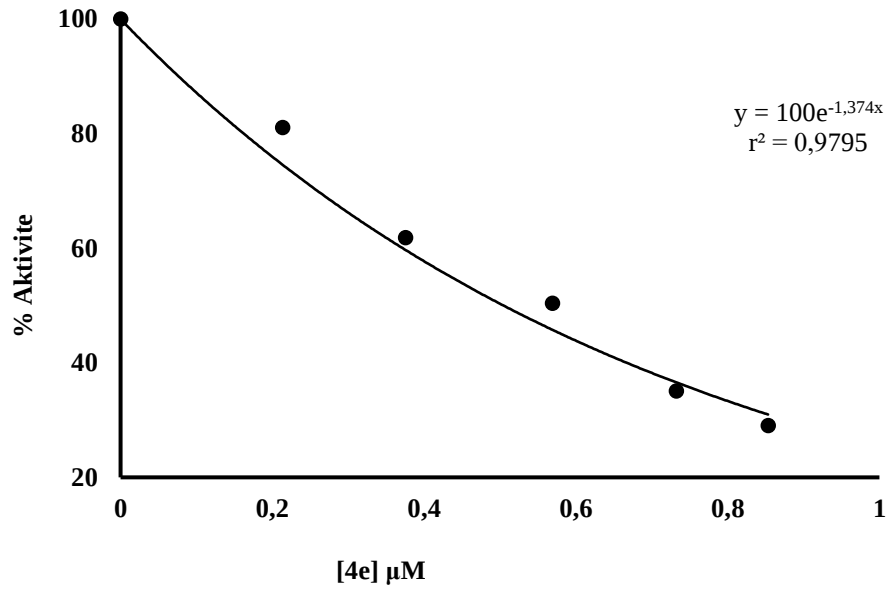
EK B14. Ar-Rh 4b'nin *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA II*)



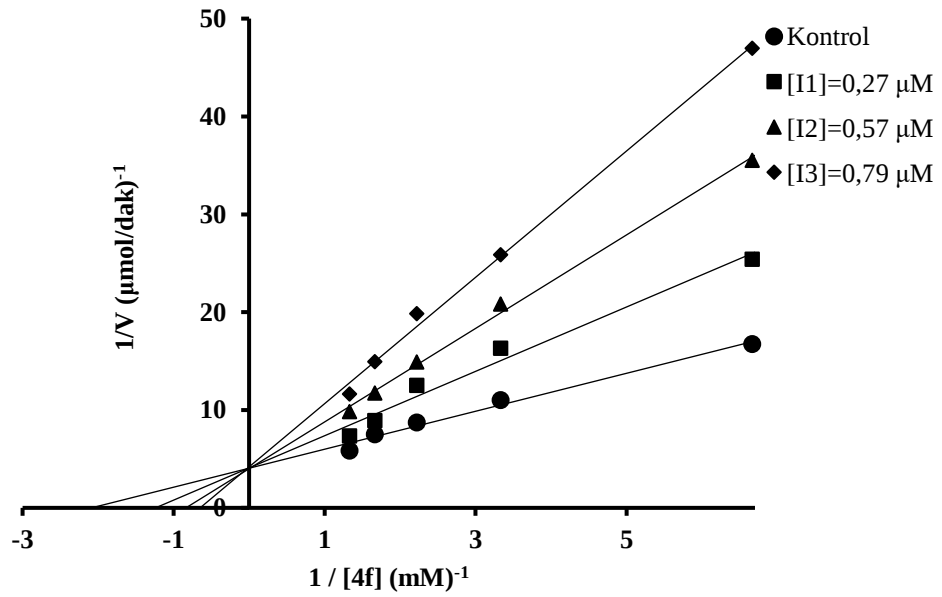
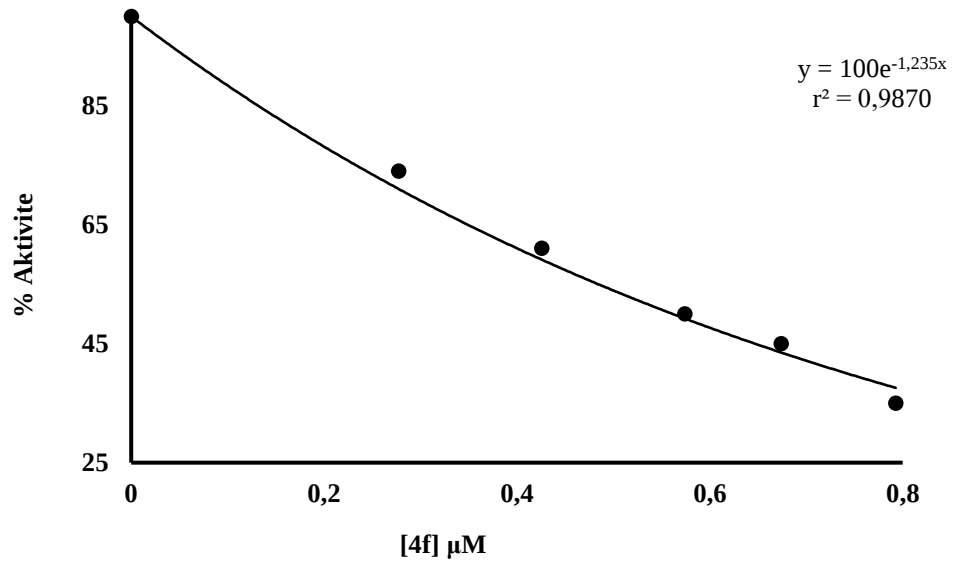
EK B14. Ar-Rh 4c'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA II*)



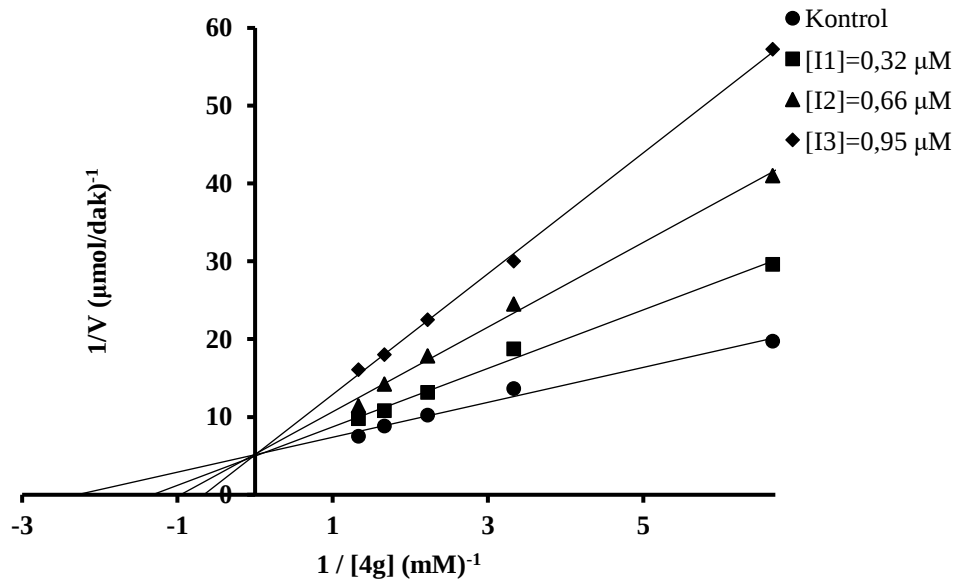
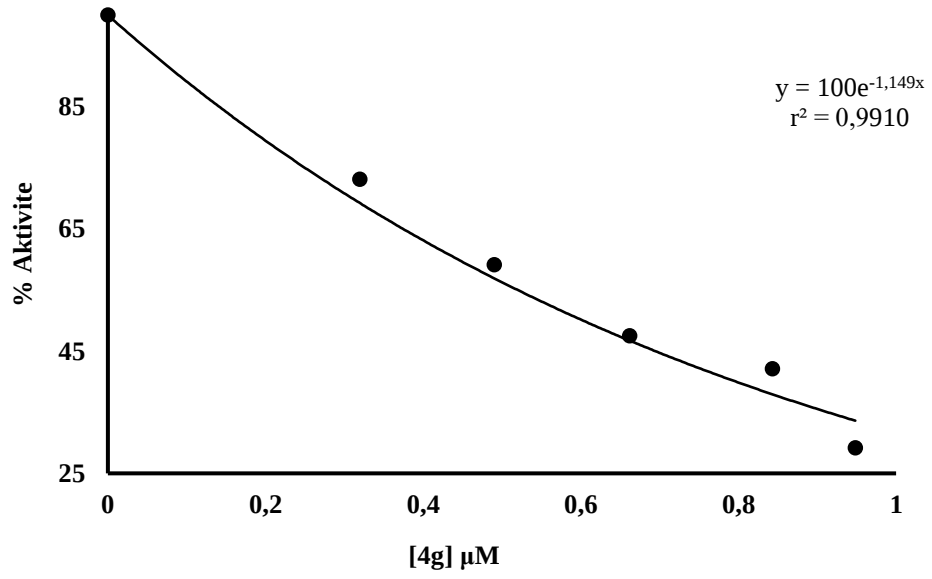
EK B15. Ar-Rh 4d'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA II*)



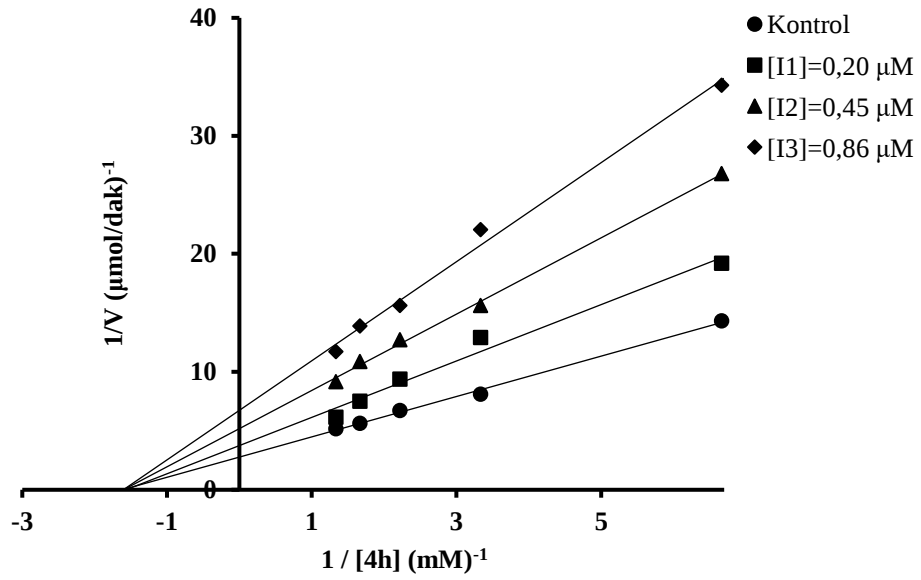
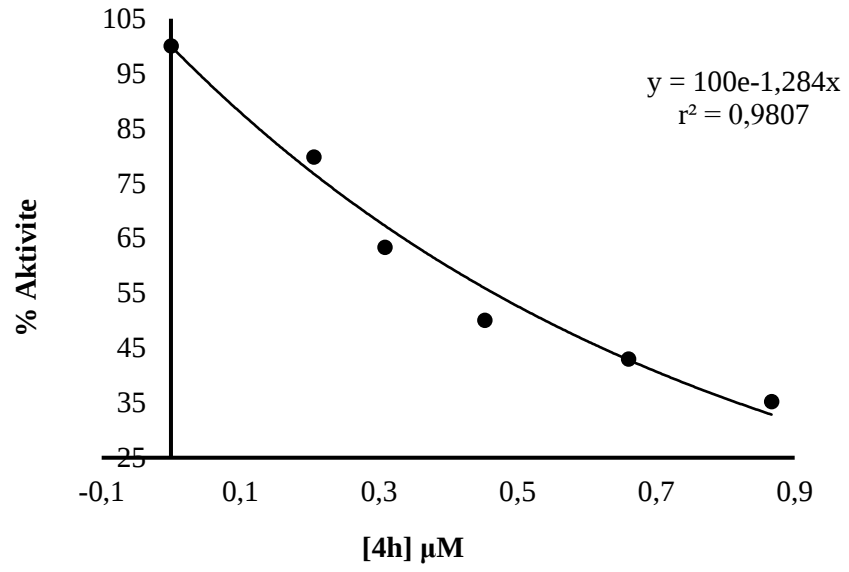
EK B16. Ar-Rh 4e'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA II*)



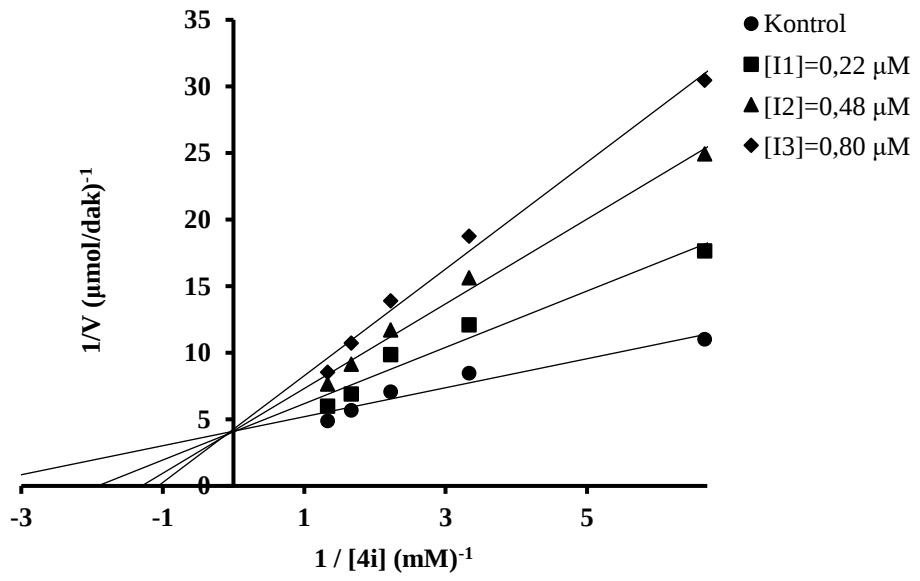
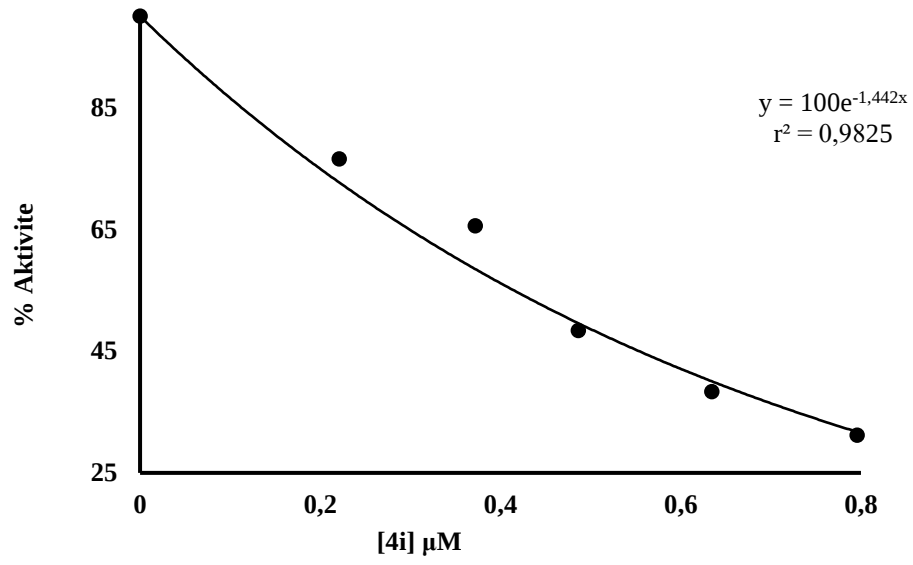
EK B17. Ar-Rh 4f'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA II*)



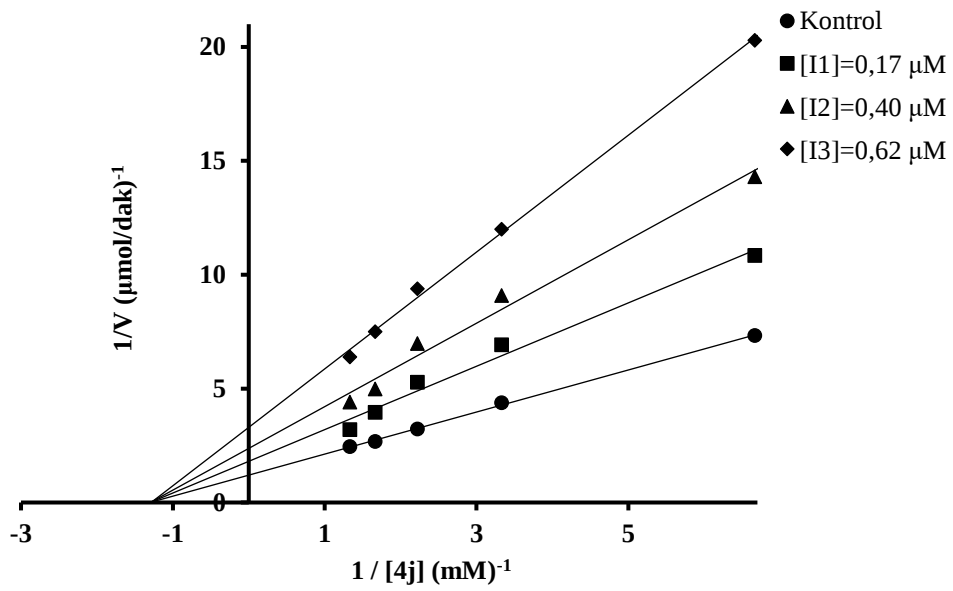
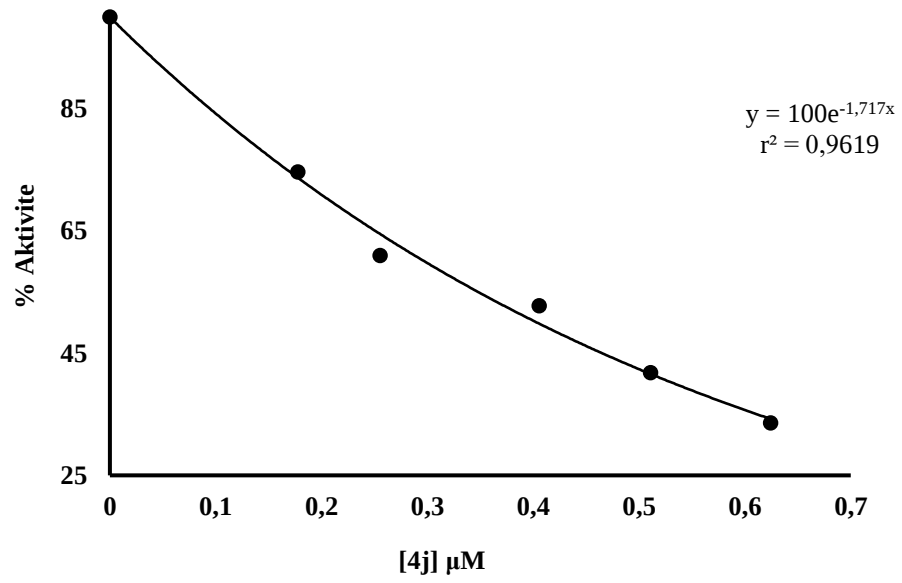
EK B18. Ar-Rh 4g'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (hCA II)



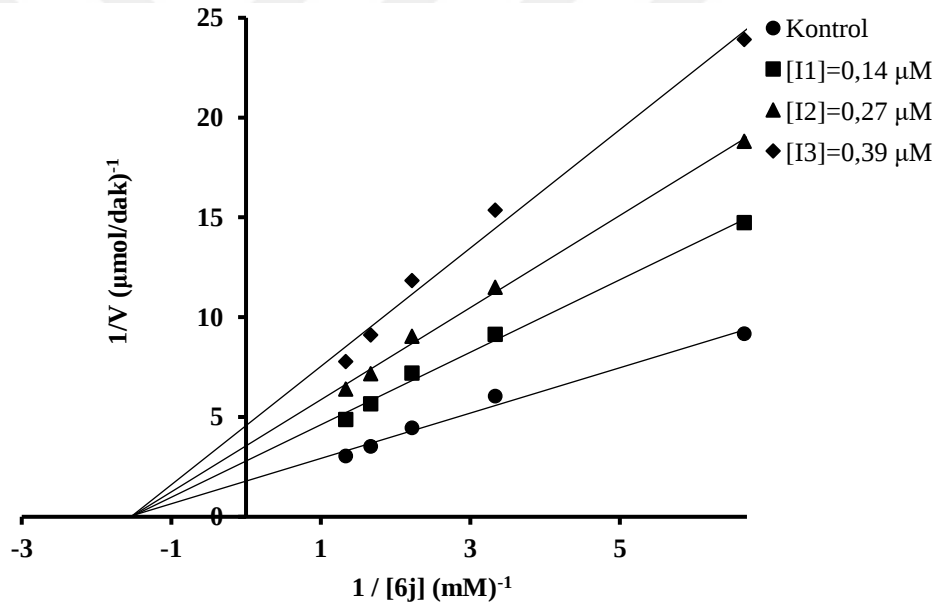
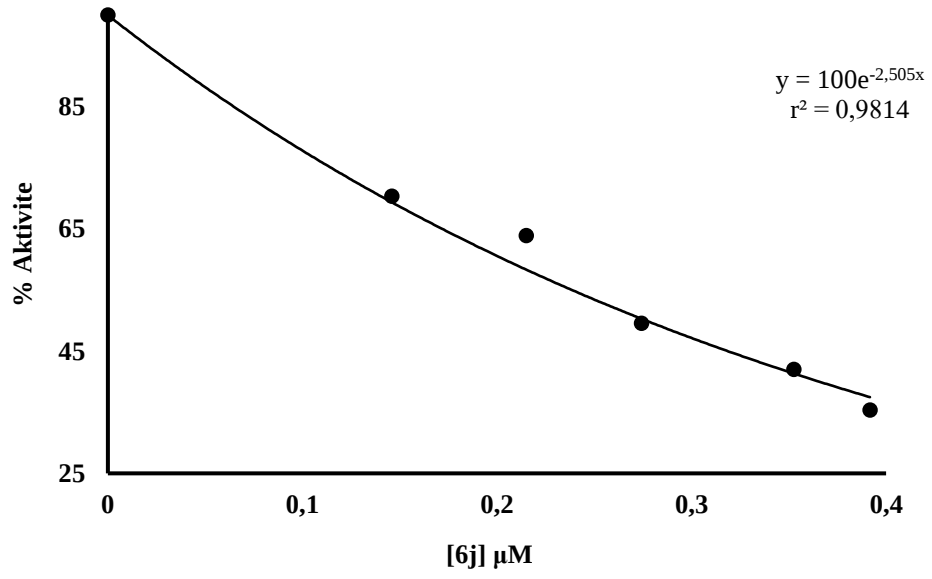
EK B19. Ar-Rh 4h'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (hCA II)



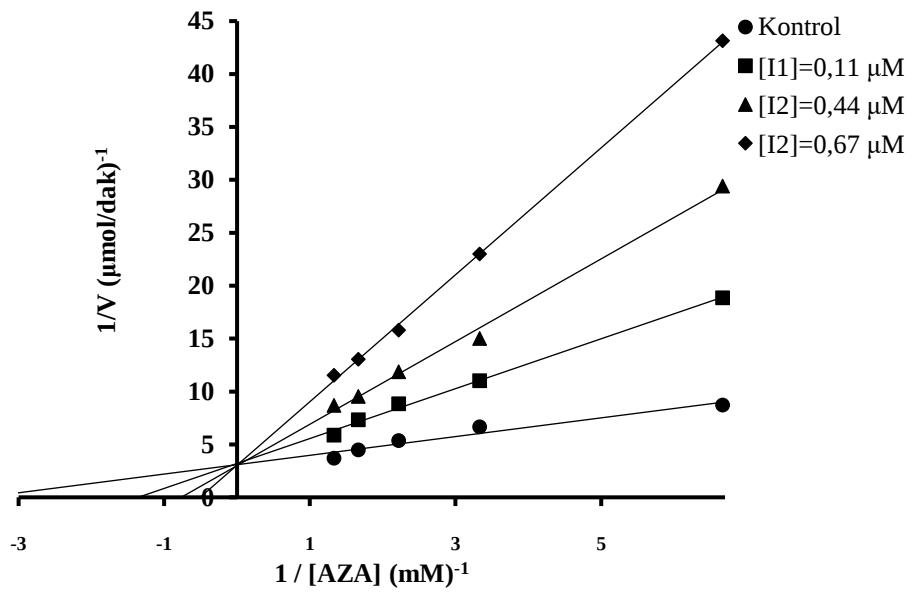
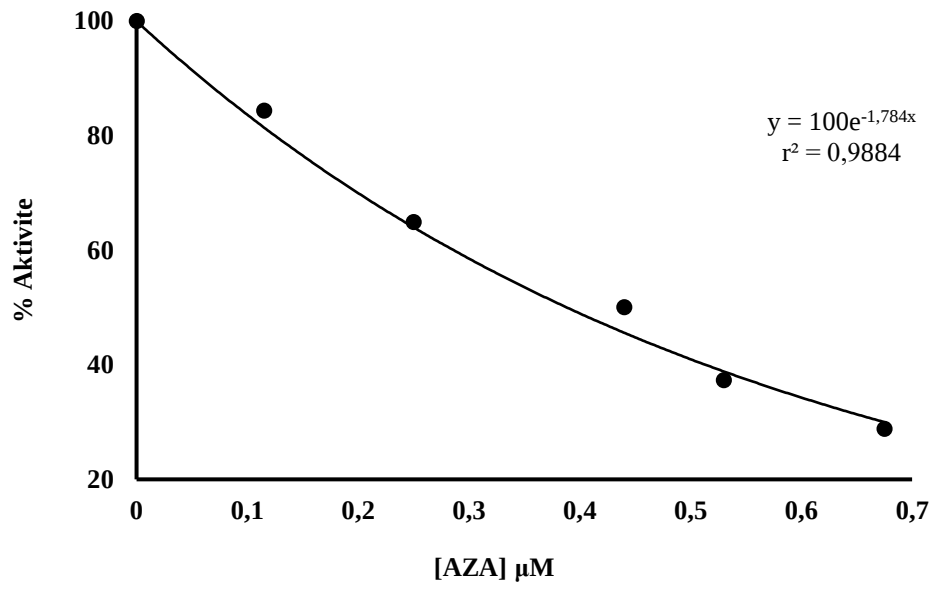
EK B20. Ar-Rh 4i'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA II*)



EK B21. Ar-Rh 4j'nin *in vitro* IC_{50} ve Lineweaver-Burk grafikleri (*hCA II*)



EK B22. Ar-Rh 6j'nin *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver–Burk grafikleri (*hCA II*)



EK B23. Ar-Rh AZA'nın *in vitro* IC₅₀ ve Lineweaver-Burk grafikleri (hCA II)

