

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ SEKONDER SÜLFONAMİDLERİN SENTEZİ VE *İN VİTRO* KARBONİK
ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Taner GÖKÇEN
(509062208)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK
Eş Danışman: Doç. Dr. Ahmet C. GÖREN**

EKİM 2017

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509062208 numaralı Doktora Öğrencisi Taner GÖKÇEN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “YENİ SEKONDER SÜLFONAMİDLERİN SENTEZİ VE *İN VİTRO* KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı :	Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK İstanbul Teknik Üniversitesi	
Eş Danışman :	Doç. Dr. Ahmet C. GÖREN TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü	
Jüri Üyeleri :	Prof. Dr. Gürkan HIZAL İstanbul Teknik Üniversitesi	
	Prof. Dr. Ümit TUNCA İstanbul Teknik Üniversitesi	
	Prof. Dr. Nüket ÖCAL Yıldız Teknik Üniversitesi	
	Prof. Dr. Mehmet EROĞLU Marmara Üniversitesi	
	Yrd. Doç. Dr. Onur ALPTÜRK İstanbul Teknik Üniversitesi	

Teslim Tarihi : 04 Ağustos 2017
Savunma Tarihi : 18 Ekim 2017





Aileme ve dostlarıma,



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, bilgisinden yararlandığım, tez çalışmalarım ve diğer her konuda destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesinden yararlandığım eş-danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN'e teşekkür ederim.

Sentez çalışmalarım sırasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Ramazan ALTUNTAŞ'a ve grubuna teşekkür ederim.

Tezin deneysel çalışmalarını yürüttüğüm TÜBİTAK UME'de, çok değerli kurum yöneticilerime, sentez çalışmalarında yardımcı olan Sayın Melike AL'a, HR-MS çalışmalarında yardımcı olan Sayın Gökhan BİLSEL'e, NMR çalışmalarında yardımcı olan Sayın Muhiddin ÇERGEL'e ve Sayın Dr. İlker ÜN'e, laboratuvar düzenindeki yardımlarından ötürü Sayın Nihal ZORLU'ya, tez yazımındaki yardımlarından dolayı Burhanettin YALÇINKAYA ve Simay GÜNDÜZ'e, ve katkı ve yardımlarından ötürü tüm iş arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve beni bugünlere getiren, üzerime titreyip emek veren, hayatımın tüm evrelerinde maddi ve manevi destek olan, her konuda beni cesaretlendirip teşvik eden, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim canım aileme en içten sevgi ve saygılarımı sunarak sonsuz teşekkür ederim.

Ağustos 2017

Taner GÖKÇEN



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vii
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Karbonik Anhidraz	4
2.1.1 Karbonik anhidrazların katalitik özellikleri	6
2.1.2 Karbonik anhidraz izoenzimleri.....	8
2.1.2.1 Karbonik anhidraz I (CA I).....	9
2.1.2.2 Karbonik anhidraz II (CA II)	10
2.1.3 Karbonik anhidrazların inhibisyonu.....	12
2.1.3.1 Metal iyonuna bağlanan CA inhibitörleri	12
2.1.3.2 Çinko iyonuna (Zn^{2+}) koordine su molekülüne/hidroksit iyonuna tutunanlar.....	22
2.1.3.3 Enzimin aktif bölgesinin girişini kapatarak inhibe edenler.....	27
2.1.3.4 Enzime bilinmeyen bir şekilde bağlananlar	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.2 Kullanılan Cihazlar ve Aletler.....	31
3.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	32
3.4 Aktivite İncelemesi Yapılacak Sülfonamid Türevlerinin Sentezi.....	33
3.4.1 Hidroksil süstitüe benzoik asitlerin asetillenmesi genel prosedürü	35
3.4.2 Açıl klorür bileşiklerinin (3) sentezinin genel prosedürü	36
3.4.3 N-(sülfonamid)-asetoksibenzamid (5 and 6) sentezinin genel prosedürü	36
3.4.4 N-(sülfonamid)-hidroksibenzamid (7 and 8) bileşiklerinin genel sentezi.....	45
3.5 Enzim Saflaştırma Çalışmaları.....	53
3.5.1 CA enzim hemolizatının hazırlanması:	53
3.5.2 CA enziminin afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılması	54
3.5.2.1 Sepharose-4B-L-tirozin afinite jelinin hazırlanması.....	54
3.5.2.2 CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin bağlanması.....	54
3.5.2.3 Sülfanilamidin tirozine kenetlendirilmesi	54
3.5.2.4 Afinite kolonunun paketlenmesi	56
3.5.2.5 Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüe edilmesi	56
3.5.3 CA enzim aktivitesi tayini.....	56
3.5.4 Protein tayini	58
3.5.4.1 Kalitatif protein tayini	58
3.5.4.2 Kantitatif protein tayini	58
3.5.5 Karbonik anhidraz enzimi için yapılan kinetik çalışmalar.....	58

3.5.5.1	Enzim için Km ve Vmax değerlerinin bulunması ile ilgili alışmalar	58
3.5.5.2	SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.	59
4.	BULGULAR VE TARTIşMA	61
5.	SONUÇLAR	69
KAYNAKLAR		71
EKLER		83
ÖZGEçMİş		161



KISALTMALAR

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu)
ATP	: Adenozin Trifosfat
CA	: Carbonic Anhydrase (Karbonik Anhidraz)
CARP	: Carbonic Anhydrase Related Protein (Karbonik Anhidrazla İlişkili Protein)
DMSO	: Dimetilsülfoksit
hCA	: Human Carbonic Anhydrase (İnsan Karbonik Anhidrazı)
EC	: Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojen Gücü)
RNA	: Ribo Nükleik Asit
His	: Histidin
Glu	: Glutamat
HIV	: Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü)
HSV	: Herpes Simplex Virüsü
Tris	: Trihidroksimetilaminometan
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)
HRMS	: High Resolution Mass Spectroscopy (Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektroskopisi)
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
UV	: Ultraviolet (Ultraviyole, mor ötesi)
VIS	: Visible (Görünür Bölge)
TCA	: Trichloroacetic Acid (Trikloroasetik Asit)
SDS	: Sodyumdodekilsülfat
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Poliakrilamid Jel Elektropherez)



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması.	4
Çizelge 2.2 : Katalitik aktivite gösteren karbonik anhidraz izoenzimleri.	9
Çizelge 3.1 : 3 mL’lik kuvarz küvet için karışım oranları.....	57
Çizelge 3.2 : 1 mL’lik kuvarz küvet için karışım oranları.....	57
Çizelge 4.1 : Afinite kolonu uygulaması sonucu saflaştırma katsayısı.	62
Çizelge 4.2 : Sentezlenen maddelerin hCA I ve hCA II aktivite sonuçları.	65



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Sığırdan elde edilen karbonik anhidraz II enzimi kristal yapısı (1V9E). ...	5
Şekil 2.2 : Farklı karbonik anhidraz enzimi ailelerine ait metal iyonu koordinasyonları.	7
Şekil 2.3 : Karbonik anhidraz enzim ailesinde aktif kısmın yapısal görüntüsü.....	8
Şekil 2.4 : Genel olarak sulfonamid inhibitörü ile hCA II enziminin aktif tarafı arasındaki ana etkileşimlerin şematik gösterimi.	13
Şekil 2.5 : Bazı anyonların hCA II enzimiyle oluşturdukları kompleksin yapısal görünüşü [5].	14
Şekil 2.6 : Benzensülfonamidin (siyah) hCA II enziminin aktif bölgesine (gri) bağlanması.	15
Şekil 2.7 : Canlı içinde prontosilin sülfanilamide dönüşme mekanizması.	16
Şekil 2.8 : Sülfanilamid ve klinik olarak kullanılmakta olan bazı sülfonamidler.	17
Şekil 2.9 : Klinik olarak karbonik anhidrazı inhibe etmekte kullanılan bazı sülfonamid örnekleri.	18
Şekil 2.10 : Karbonik anhidraz inhibisyonu ve epilepsi nöbeti etkileri için sentezlenen benzensülfonamid türevleri.	18
Şekil 2.11 : Karbonik anhidraz inhibisyon etkileri üzerine sentezlenen bazı tiyazolsülfonamidler.	19
Şekil 2.12 : Karbonik anhidraz IX inhibisyon etkileri üzerine sentezlenen acridine orange (AO) türevi sülfonamid bileşiği.	19
Şekil 2.13 : Karbonik anhidraz I, II, IV ve VII inhibisyon etkileri incelenen isatin temelli sülfonamid bileşikleri.	19
Şekil 2.14 : Karbonik anhidraz II ve VII inhibisyon etkileri incelenen izosakzol temelli sülfonamid bileşikleri.	20
Şekil 2.15 : Karbonik anhidraz hCA I ve hCA II inhibisyon etkileri incelenen heteroaril tabanlı sülfonamid bileşikleri.	20
Şekil 2.16 : hCA I, hCA II, hCA IX ve hCA XII inhibisyon etkileri incelenen triazol tabanlı sülfonamidler.	20
Şekil 2.17 : Gieling ve diğerleri tarafından sentezlenen ve karbonik anhidraz IX inhibisyon özellikleri incelenen sülfamatlar.	20
Şekil 2.18 : Akıncıoğlu ve diğerleri tarafından sentezlenen ve hCA I ve hCA II inhibisyon özellikleri incelenen sülfamidler.	21
Şekil 2.19 : Karbonik anhidraz inhibitörü olarak ditiyokarbamatlar.	21
Şekil 2.20 : Abellán-Flos ve diğerlerinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak sentezledikleri ksantatlar.	21
Şekil 2.21 : Karbonik anhidraz inhibitörü olarak N-hidroksisülfonamidler.	22
Şekil 2.22 : Di Fiore ve diğerleri tarafından karbonik anhidraz aktivitesi incelenen hidroksamat.	22
Şekil 2.23 : Fenol radikalinin rezonans yapıları.	23
Şekil 2.24 : Önemli biyolojik aktiviteler gösteren birtakım fenolik bileşikler.	24

Şekil 2.25 : Fenolün hCA II karbonik anhidraz enziminin aktif kısmıyla yapmış olduğu etkileşimlerin şematik gösterimi.	25
Şekil 2.26 : Salmas ve diğerleri tarafından CA I ve II inhibisyon etkileri incelenen ve in <i>silico</i> enzim-sübstrat çalışmaları yapılan bazı fenoller.	25
Şekil 2.27 : Huyut ve diğerleri tarafından hCA I ve hCA II inhibisyon etkileri incelenen fenolik bileşikler.	26
Şekil 2.28 : Yamali ve diğerleri tarafından [112] karbonik anhidraz inhibitörü olarak sentezlenen bazı fenolik Mannich bazları.	26
Şekil 2.29 : Scozzafava ve diğerlerinin çalışmasından karbonik anhidraz inhibisyon aktiviteleri incelenen bazı poliamin örnekleri.	27
Şekil 2.30 : Tars ve diğerlerinin çalışmasındaki sülfokumarin örnekleri.	27
Şekil 2.31 : <i>cis</i> -2-Hidroksisünamik asit ile hCA II izoenziminin etkileşimin detaylı gösterimi [120].	28
Şekil 2.32 : Maresca ve diğerleri tarafından çalışılan kumarin bileşikler.	28
Şekil 2.33 : Carta ve diğerleri tarafından çalışılan kumarin ve tiyokso-kumarin bileşiklerinin genel yapısı.	28
Şekil 2.34 : Moeker ve diğerlerinin sentezledikleri ve CA inhibisyon aktivitesini inceledikleri halkalı sekonder sülfonamid bileşiklerinin genel yapısı.	29
Şekil 2.35 : Petrou ve diğerleri tarafından sentezlenen ve CA inhibisyon aktiviteleri incelenen sekonder sülfonamidlerin genel yapısı.	30
Şekil 2.36 : Imatinib ve nilotinib bileşiklerinin yapıları.	30
Şekil 3.1 : Sülfonamidlerin sentezine ait ana şema.	34
Şekil 3.2 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	36
Şekil 3.3 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	37
Şekil 3.4 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	37
Şekil 3.5 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	38
Şekil 3.6 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	38
Şekil 3.7 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	38
Şekil 3.8 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	39
Şekil 3.9 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	39
Şekil 3.10 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid.	40
Şekil 3.11 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	40
Şekil 3.12 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	41
Şekil 3.13 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	41
Şekil 3.14 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	42
Şekil 3.15 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	42
Şekil 3.16 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	43
Şekil 3.17 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	43
Şekil 3.18 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	44
Şekil 3.19 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	44
Şekil 3.20 : <i>N</i> -(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	45
Şekil 3.21 : <i>N</i> -(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.	45
Şekil 3.22 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	46
Şekil 3.23 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	46
Şekil 3.24 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	47
Şekil 3.25 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	47
Şekil 3.26 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	47
Şekil 3.27 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	48
Şekil 3.28 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	48
Şekil 3.29 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.	49

Şekil 3.30 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid.....	49
Şekil 3.31 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	49
Şekil 3.32 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	50
Şekil 3.33 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	50
Şekil 3.34 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	51
Şekil 3.35 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid.....	51
Şekil 3.36 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	52
Şekil 3.37 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	52
Şekil 3.38 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid.....	52
Şekil 3.39 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.	53
Şekil 3.40 : Sepharose-4B-L tirozin afinite jelinin hazırlanma basamakları.....	55
Şekil 3.41 : <i>p</i> -Nitrofenil asetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm mekanizması.	56
Şekil 4.1 : Bradford yöntemiyle protein tayininde kullanılan standart grafik.	61
Şekil 4.2: Karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırma işleminde elüsyon sonrası yapılan aktivite-absorbans ölçümlerinin grafiği.	62
Şekil 4.3 : SDS-poliakrilamit jel elektrofezi fotoğrafı. (a): Standart proteinler; (b): hCA II; (c): hCA I.....	63
Şekil 4.4 : Afinite kromatografisi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.	64
Şekil 4.5 : Afinite kromatografisi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.	64
Şekil A.1 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.....	84
Şekil A.2 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	84
Şekil A.3 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	85
Şekil A.4 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	85
Şekil A.5 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	86
Şekil A.6 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	86
Şekil A.7 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	87
Şekil A.8 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	87
Şekil A.9 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.....	88
Şekil A.10 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	88
Şekil A.11 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.....	89
Şekil A.12 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	89
Şekil A.13 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.....	90
Şekil A.14 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	90
Şekil A.15 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	91
Şekil A.16 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	91
Şekil A.17 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	92
Şekil A.18 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	92
Şekil A.19 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	93
Şekil A.20 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	93
Şekil A.21 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	94
Şekil A.22 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	94
Şekil A.23 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	95
Şekil A.24 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	95
Şekil A.25 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	96
Şekil A.26 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	96
Şekil A.27 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	97
Şekil A.28 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.....	97
Şekil A.29 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	98

Şekil A.30 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	98
Şekil A.31 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	99
Şekil A.32 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	99
Şekil A.33 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	100
Şekil A.34 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	100
Şekil A.35 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu	101
Şekil A.36 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu	101
Şekil A.37 : <i>N</i> -(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	102
Şekil A.38 : <i>N</i> -(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	102
Şekil A.39 : <i>N</i> -(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	103
Şekil A.40 : <i>N</i> -(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu	103
Şekil A.41 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	104
Şekil A.42 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	104
Şekil A.43 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	105
Şekil A.44 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	105
Şekil A.45 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	106
Şekil A.46 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	106
Şekil A.47 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	107
Şekil A.48 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	107
Şekil A.49 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	108
Şekil A.50 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	108
Şekil A.51 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	109
Şekil A.52 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	109
Şekil A.53 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	110
Şekil A.54 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	110
Şekil A.55 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	111
Şekil A.56 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	111
Şekil A.57 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	112
Şekil A.58 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	112
Şekil A.59 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	113
Şekil A.60 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	113
Şekil A.61 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	114
Şekil A.62 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	114
Şekil A.63 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	115
Şekil A.64 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	115
Şekil A.65 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	116
Şekil A.66 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	116
Şekil A.67 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	117
Şekil A.68 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	117
Şekil A.69 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	118
Şekil A.70 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	118
Şekil A.71 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	119
Şekil A.72 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	119
Şekil A.73 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu.	120
Şekil A.74 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu.	120
Şekil A.75 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹ H NMR spektrumu	121

Şekil A.76 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³ C NMR spektrumu	121
Şekil B.1 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	122
Şekil B.2 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.	123
Şekil B.3 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.	124
Şekil B.4 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.	125
Şekil B.5 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	126
Şekil B.6 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	127
Şekil B.7 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	128
Şekil B.8 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	129
Şekil B.9 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -asetoksibenzamid HRMS spektrumu.	130
Şekil B.10 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.	131
Şekil B.11 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	132
Şekil B.12 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	133
Şekil B.13 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	134
Şekil B.14 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.	135
Şekil B.15 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.	136
Şekil B.16 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.	137
Şekil B.17 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.	138
Şekil B.18 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu	139
Şekil B.19 : <i>N</i> -(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.....	140
Şekil B.20 : <i>N</i> -(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu. ..	141
Şekil B.21 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	142
Şekil B.22 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	143
Şekil B.23 : <i>N</i> -(Sülfametazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	144
Şekil B.24 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	145
Şekil B.25 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.	146
Şekil B.26 : <i>N</i> -(Sülfametizol)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	147
Şekil B.27 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	148
Şekil B.28 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.	149
Şekil B.29 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)- <i>p</i> -hidroksibenzamid HRMS spektrumu.	150
Şekil B.30 : <i>N</i> -(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.	151
Şekil B.31 : <i>N</i> -(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.	152
Şekil B.32 : <i>N</i> -(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.	153
Şekil B.33 : <i>N</i> -(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.	154
Şekil B.34 : <i>N</i> -(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	155
Şekil B.35 : <i>N</i> -(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	156
Şekil B.36 : <i>N</i> -(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.	157
Şekil B.37 : <i>N</i> -(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.....	158
Şekil B.38 : <i>N</i> -(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu	159



YENİ SEKONDER SÜLFONAMİDLERİN SENTEZİ VE *İN VİTRO* KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ ÜZERİNE İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Karbonik anhidraz enzimleri tüm canlı organizmalarda bulunan ve geri dönüşümlü bir reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonata ve protona dönüştüğü reaksiyonu katalizleyen bir metaloenzim ailesidir (EC 4.2.1.1). Karbonik anhidraz enziminin yapısı 260 adet aminoasitten oluşmaktadır ve bu enzim doğal hali kürecik şeklinde olan bir protein zinciridir. Karbondioksitin hidratasyonu haricinde, COS ve CS₂ hidratasyonu, siyanamid hidratasyonu, ester hidrolizleri gibi reaksiyonlar da bu enzim süper ailesi tarafından katalizlenmektedir. Bu reaksiyonların katalizlenmeleri diğer tüm karbonik anhidraz katalizleme reaksiyonlarında olduğu gibi metal hidroksitin nükleofil olarak davranması yoluyla gerçekleşir.

Karbonik anhidraz enzim aileleri, katalizleme işlemi sırasında aktif bölgede bulundurdıkları metal iyonuna göre farklılık göstermektedirler. Enzimin aktif bölgesi koni biçiminde geniş bir alana yayılmış, molekülün merkezine kadar uzanan oyuk şeklindedir ve çinko iyonu oyukun alt kısmına bitişik durumdadır.

Tüm karbonik anhidraz ailelerinde katalitik reaksiyon iki kademedен oluşur. İlk kademedē enzimin aktif kısmı olan metal hidroksit kısmı (EM²⁺-OH⁻) nötr pH ortamında güçlü bir nükleofil gibi davranarak karbondioksit molekülü ile bikarbonat enzim kompleksi oluşturur ve sonrasında bu bikarbonat molekülü su molekülüyle yer değiştirir. İkinci kademedē enzim metal kompleksine bağlı su molekülü (EM²⁺-H₂O) enzimin aktif kısım kalıntısına veya bir proton alıcısına (B) proton transfer ederek enzim metal hidroksit kompleksi oluşturur (EM²⁺-OH⁻).

α-karbonik anhidraz ailesi insanlarda bulunan türüdür ve şimdiye kadar bu türe ait 16 farklı izoenzim bulunmuştur. Bunların beş tanesi (CA I, II, III, VII ve XIII) sitozolik, dört tanesi (CA IV, IX, XII ve XIV) membrana bağlı, iki tanesi (CA VA ve VB) mitokondriyal, bir tanesi (CA VI) tükürük salgısında ve sütte bulunur. CA XV insanlarda ve günümüz primatlarında gözlenmez fakat kemirgenlerde ve yüksek omurgalılarda gözlenir. Üç adet de katalitik özellik göstermeyen ve karbonik anhidrazla alakalı proteinler olarak adlandırılan türü mevcuttur (CARP-VIII, CARP-X ve CARP-XI).

CA I enzimi kırmızı kan hücreleri ve kalın bağırsakta yaygın olarak bulunmasına rağmen plazmada bulunan klorür ve bikarbonat ile inhibe olması fizyolojik fonksiyonlarıyla ilgili soru işaretleri oluşturmaktadır ve genellikle araştırmacıların hedefinde pek yoktur. Fakat yapılan bazı araştırmalar bu enzimin eritrositlerdeki aktivitesinin azalmasının kansızlık ve kronik asidoz ile ilişkili olduğu, ve hücre dışı ortamda yüksek seviyede bulunmasının diabetik maküler ödem ve çoğalan diabetik iltihapsız retina hastalığı gibi durumlara yol açan aşırı retinal damar geçirgenliğiyle ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Tüm bunların ötesinde, CA I'in kendisi CA II ve CA IV ile birlikte, Hippel-Lindau tümörleri, ilerleyen polikistik böbrek hastalığı, acinar-ductal pankreatik karsinom,

veya bağışıklık sistemi/idyopatik kronik pankreatitis gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiş ama henüz tam olarak fonksiyonları ortaya konulamamıştır.

Diğer yandan, CA I'nin sadece yüksek seviyelerinin değil bazı durumlarda düşük seviyelerinin de patolojik durumlarla ilişkili olduğu gözlemlenmektedir ve tip II diyabet hastalarının eritrositlerinde CA I seviyelerindeki düşüklük buna örnek olarak verilebilir.

CA II enzimi, kırmızı kan hücrelerinde baskın fizyolojik özellikleriyle bulunan izoenzimdir. Bu izoenzim sitozolik bir karbonik anhidraz izoenzimidir ve tüm omurgalılarda birçok hücre, doku ve organda yaygın olarak bulunmaktadır. Çok önemli bazı görevlerin yanında insan CA II izoenziminin (hCA II) görev aldığı, karbondioksitin bikarbonata ve protona dönüştürülmesi gibi spesifik görevleri de vardır.

Görev aldığı diğer fonksiyonlar ise, idrarın oluşturulması ve börek kanallarında bikarbonatın geri absorplanması, glikoneojenez, lipojeniz ve ürejeniz gibi biyosentetik reaksiyonlar, kemik erimesi, kireçlenme ve henüz yeterli olarak anlaşılamamış birçok fizyolojik/patolojik reaksiyon. Bu izoenzimin aktivitesindeki düzensizliklerin önemli patolojik sonuçları olmaktadır, bunlar (i) gözde aşırı göz sıvısı salgılanması sonucu oluşan göz içi basıncın arttığı glokom; (ii) CA II'nin böbrekte diğer izoformlardan bazılarıyla birlikte rol aldığı prosesler sonucu idrarda yeterli miktarda sıvı salgılanmaması veya elimine edilmemesi sonucu vücutta sıvı birikmesiyle oluşan ödem; (iii) epilepsi; (iv) bazı kanser türlerinde, CA II izoenziminin CA IX ve CA XII gibi diğer bazı izoenzimlerle birlikte seviyelerinde gözlenen yükseklikler.

Yukarıda bazı örneklerini verdiğimiz ve bu enzimlerin seviyelerinde gözlenen yükseklikle ilişkilendirilen patolojik durumlar dolayısıyla bu enzimlerin inhibisyonları önem arz etmektedir. On yıllarca yıldır yapılan çalışmalar nedeniyle günümüzde artık inhibisyon mekanizmaları birçok durumda detaylı olarak anlaşılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar doğrultusunda dört farklı karbonik anhidraz inhibitör grubu ortaya konulmuştur:

- (i) Sülfonamidler ve onların izosterik eşdeğerleri gibi Zn^{2+} iyonuna bağlananlar,
- (ii) fenoller, poliaminler, sülfokumarinler gibi çinko iyonuna koordine su molekülüne/hidroksit iyonuna tutunanlar,
- (iii) kumarinler ve onların izosterik eşdeğerleri gibi enzimin aktif bölgesinin girişini kapatanlar;
- (iv) ve henüz inhibisyon süreci yeterli olarak anlaşılamamış sekonder/tersiyer sülfonamidler, imatinib, nilotinib ve diğerleri.

İlk olarak 1930'larda antibakteriyel özellikleri keşfedilen sülfonamidler aynı zamanda en önemli karbonik anhidraz inhibitör sınıfıdır ve asetazolamid, methazolamid, etoksazolamid, sultiyam, diklorofenamid, dorzolamid, brinzolamid, sulpirid ve zonisamid gibi örnekleri yıllardır klinik olarak idrar söktürücü, glokom veya epilepsi tedavisinde kullanılmaktadırlar.

Fenoller hidroksil grubunda bulunan hidrojeni vererek, lipidlerin ve protein, karbonhidrat, nükleik asitler gibi diğer biyomoleküllerin serbest radikallerle okside olmalarını önlerler. Antioksidan özelliklerinin dışında fenollerin, antikanserojen, antitumör, antibakteriyel, antiviral ve antienflamatuar özelliklerinin olduğu raporlanmıştır.

Fenoller yukarıda saydığımız özelliklerinin dışında potansiyel birer karbonik anhidraz enzimi inhibitörüdürler. Fenolün CA II enzimiyle oluşturmuş olduğu kompleksin X ışını kristal yapısı incelendiğinde daha önce öngörülmemiş şekilde

hidroksil grubu vasıtasıyla enzimin çinko iyonuna bağlı su/hidroksit iyonu ve Thr199'un NH grubuyla bağ kurduğu görülmüştür.

Bu çalışmada her biri ayrı ayrı farklı biyolojik özellikler ihtiva eden ve aynı zamanda her biri farklı inhibisyon mekanizmasına sahip karbonik anhidraz inhibitör grubu olan sülfonamidler ve fenoller tek bir molekülde birleştirilerek, yeni sekonder sülfonamid grubu oluşturulmuş ve bunların insan kanındaki eritrosit hücrelerinden Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin *in vitro* inhibisyonu etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan sülfonamidler, zamanında antibakteriyel ve değişik amaçlarla klinik olarak kullanılmış ve bir kısmı hala aktif olarak kullanılmakta olup, birçok meyve ve bitkide doğal olarak bulunmakta olan ve antioksidan, antikanserijen gibi özellikler göstermekte olan *p*-hidroksibenzoik asit ve 3,4,5-trihidroksibenzoik asit gibi fenollerle birleştirilerek, üzerlerinde tiyazol, pirimidin, piridin, izosoksazol, tiyadiazol, metizol ve dimetoksin gibi gruplar içeren yeni asetoksi benamid ve hidroksi benamid grupları elde edilmiştir. Yapılan *in vitro* hCA I ve hCA II inhibisyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar incelendiğinde genel itibariyle elde edilen yeni moleküllerin başlangıç moleküllerinden daha iyi birer karbonik anhidraz inhibitörü oldukları, ve bazı moleküllerin ise klinik olarak kullanılmakta olan asetazolamid bileşiğinden daha etkin birer karbonik anhidraz inhibitörü olduğu görülmektedir.



SYNTHESIS OF NOVEL SECONDARY SULFONAMIDES AND THEIR *IN VITRO* CARBONIC ANHYDRASE ISOZYMES INHIBITION EFFECTS

SUMMARY

Carbonic anhydrase isozymes are abundant in all life kingdoms and is a super family of metalloenzyme (EC 4.2.1.1) that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate and proton. It has a globular form and is a protein chain builded up from 260 aminoacids. In addition to hydration of carbon dioxide they also catalyze hydration of COS and CS₂, hydration of cyanamide and hydrolysis of esters. All these processes are achieved in a simple way where, activated metal hydroxide act as a nucleophile.

All carbonic anhydrases are metalloenzymes and all six distinct families (α -, β -, γ -, δ -, ζ - and η -CAs) discovered up to now differ in their presence for metal ions used within the active site for performing the catalysis. Active site of the enzyme is widespread in a conical shape cavity reach out way to the center of the enzyme and the zinc ion is next to the underside of this cavity.

In all CA classes, the reversible hydration of carbon dioxide to bicarbonate and proton ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) follows a two step catalytic mechanism, where an enzyme metal hydroxide adduct ($\text{E-M}^{2+}\text{-OH}^-$) is the catalytically active species. At neutral pH, this enzyme metal hydroxide adduct act as a strong nucleophile on the carbon dioxide molecule bound in a hydrophobic pocket nearby by with consequent formation of bicarbonate ion, and then it is displaced from the active site by a water molecule. At the second step of the reaction, proton transfer from the water molecule bound to metal ion to an exogenous proton acceptor regenerates the metal hydroxide species again. This second step is the rate-determining step of the catalytic turnover in many enzymes. For some α - and ζ -carbonic anhydrases achieves $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ values bigger than $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, making carbonic anhydrases among the most effective catalysts known in the nature.

Human carbonic anhydrases (hCAs) belong to the α -class of this super enzyme family; 15 different isoforms out of 16 in this group described in humans so far. 12 of them are catalytically active (CAs I-IV, VA, VB, VI, VII, IX, and XII-XIV) and 3 of them do not exhibit any catalytic activity so called CA-related proteins (CARPs). The catalytically active human carbonic anhydrases differ on their subcellular localization and can be grouped in four different subclasses; hCAs I, II, III, VII and XIII are cytosolic, hCAs IV, IX, XII and XIV are membrane-associated, hCAs VA and VB exist in mitochondria, hCA VI is secreted in saliva and milk. These isozymes are involved in various crucial physiological processes and can be found in many tissues and organs through out the body.

CA I isozyme is in general not in the target of scientists although it is prevalently expressed in red blood cells and colon. Since it can be inhibited by chlorine and bicarbonate ions, there are question marks raising about its physiological functions. However, several evidences demonstrated that changing levels of this isozyme are correlated with several pathological processes. For example, studies showed up that

there is a correlation between some types of anemia and chronic acidosis with a decrease of CA I activity in erythrocytes. Another discovery reported by Gao et al. is that the excessive retinal vascular permeability was correlated with a high level of CA I in the extracellular medium.

CA I was also associated alone or together with some other CA isozymes, with vasogenic edema, colorectal cancers, prostate cancer, von Hippel-Lindau tumors, progressive kidney disease, acinar-ductal pancreatic carcinomas, or autoimmune/idiopathic chronic pancreatitis.

Not only high levels, but also lower levels of CA I is associated to pathological processes, such as low levels of CA I in erythrocytes have been evidenced in type II diabetic patients.

CA II is a ubiquitously cytosolic carbonic anhydrase isoform which is first discovered in the red blood cells with essential physiological functions over than 80 years ago, and it is widespread in a multitude of cells, tissues, and organs in all vertebrates. CA II has crucial and specialized functions, and among them the human carbonic anhydrase (hCA II) is involved in the transport of carbondioxide/bicarbonate from tissues where it is generated to the lungs. Blood of mammals comprise two carbonic anhydrase isoforms, CA I and CA II, and the total concentration can be as high as 0.2 mM. The catalytic activity of CA II is much higher than CA I isozyme. In addition to catalytic activity for the conversion of water and carbondioxide to bicarbonate and proton, CA II has several functions include urine formation and bicarbonate reabsorption in the kidney tubules, biosynthetic reactions, such as ureagenesis, lipogenesis and gluconeogenesis, bone resorption and calcification.

To regulate the irregular activities of this isoform in one or more tissues is or can be a solution for some pathological processes associated with it, such as, increase in the intraocular pressure due to excessive aqueous humor secreted in the eye (glaucoma), fluid accumulation in the body due to inadequate fluids are secreted/eliminated in the urine (edema) (due to processes in the kidney associated to CA II with other carbonic anhydrase isozymes such as CA IV, XII and XIV), processes associated with CA II with other brain isoforms which causes epilepsy, and some forms of cancers associated to increased quantities of CA II alone or with other cancer related isoforms CA IX and CA XII. In addition to pathologies above, CA II is involved in acute mountain sickness (AMS), atherosclerosis and also osteoporosis.

Due to the pathological processes associated with CA activities, inhibition of these enzymes become an essential task. Due to the investigations done for decades on the inhibition of these enzymes, inhibition mechanisms are well known in detail today. If we need to categorize, we can sum the CA inhibitors into four main groups:

- (i) Inhibitors that bind to metal ions, for example sulfonamides and their isosteres (such as sulfamates, sulfamides and *N*-hydroxy-sulfonamides), the dithiocarbamates and their isosteres (such as the xanthates), the hydroxamates.
- (ii) Inhibitors that anchor to the zinc-coordinated water molecule/hydroxide ion, such as phenols, polyamines and sulfocoumarins.
- (iii) Inhibitors that occlude the entrance of the enzyme active site, such as coumarins and their isosteres.
- (iv) Inhibitors that bind in an unknown manner such as secondary/tertiary sulfonamides, imatinib and nilotinib.

Sulfonamides are best known carbonic anhydrase inhibitors, and since their first discovery in 1930s as antibiotics they become solution for many other pathologies such as glaucoma, epilepsy and diuretic. Today several sulfonamides such as

acetazolamide, methazolamide, ethoxazolamide, sulthiame, dichlorophenamide, dorzolamide, brinzolamide, sulpiride, zonisamide, topiramate, saccharin, celecoxib, chlorothiazide, furosamide and bumethanide are still in clinical use as diuretics, antiglaucoma agents and antiepileptics.

Phenols prevent biomolecules such as lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids to get oxidized by giving proton of their hydroxyl group. In addition to their antioxidant properties, anticarcinogen, antimutagenic, antibacterial, antiviral and antiinflammatory effects are also reported by various studies.

Phenols are also potentially a carbonic anhydrase inhibitors in addition to properties we mentioned above. Phenol is also the first compound reported to inhibit CA by different mechanism than binding to zinc ion. In this group of inhibitors, the inhibitor is not in a direct contact with the metal ion, instead by a presence of anchoring group which is attached to a scaffold that can interact with the two halves of the active side of the enzyme. Further studies on the X-ray crystallographic examinations of adduct formed by CA II enzyme and phenol evidenced that, hydroxyl group of phenol interacts with zinc-coordinated water/hydroxide ion and NH moiety of Thr199 by forming hydrogen bonds.

In this work new secondary sulfonamides are synthesized by combining primary sulfonamides with naturally occurring phenols in one molecule. Sulfonamides used in this work are clinically approved for various applications, and phenols (*p*-hydroxybenzoic acid and 3,4,5-trihydroxybenzoic acid) are naturally occurring in various plants and evidenced that they comprise properties such as antioxidant, antibacterial and anticarcinogen. These new secondary sulfonamides are classified in four groups, (i) acetoxybenzamide, (ii) triacetoxybenzamide, (iii) hydroxybenzamide and (iv) trihydroxybenzamide, all having thiazole, pyrimidine, pyridine, isoxazole and thiadiazole moieties and their inhibitory effects were studied *in vitro* on two metalloenzymes, i. e. human carbonic anhydrase isozymes (hCA I and II), purified from human erythrocyte cells by Sepharose-4B-L tyrosine-sulfanilamide affinity chromatography. In comparison to starting primary sulfonamides, new compounds in general has better inhibition activity and also some of them showed better activity than acetazolamide which is a CA inhibitor in clinical use.



1. GİRİŞ

Bu tezde yapılan çalışmada çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren sülfonamidlerin gene çeşitli biyolojik aktiviteler göstermekte olan ve birçok meyve ve bitkide doğal olarak bulunmakta olan gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) ve *p*-hidroksi benzoik asit tabanlı yeni türevlerinin sentezlenmesi ve elde edilen bu bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen yeni sülfonamid türevlerinin, insan kanından elde edilen eritrosit hücrelerinden Sepharose-4B-L-tirozin-sülfanilamid afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin inhibisyon etkileri incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Biyokimya tarihinin çoğu enzim araştırmaları tarihidir. Biyolojik katalizörler ilk olarak 1800'lü yılların başında etin mide salgıları ile sindirilmesi, nişastanın tükürük ile şekere dönüştürülmesi ve çeşitli bitki özütleri çalışmalarında tanımlanmış ve açıklanmıştır [1].

Küçük bir grup katalitik RNA molekülü dışında enzimler proteindir. Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hiçbir yan ürün oluşumuna meydan vermeden yüzde yüzlük bir verimle hızlandıran katalizörlerdir [2].

Katalitik aktiviteleri doğal protein konformasyonlarının bütünlüğüne bağlıdır. Eğer bir enzimin doğal yapısı bozulur veya alt ünitelerine ayrıştırılırsa genellikle katalitik aktivitesi de bozulur. Tıpkı diğer proteinler gibi enzimlerin molekül ağırlıkları da 12000'den başlayıp bir milyonun üzerine kadar çıkabilmektedir. Bazı enzimler aktiviteleri için kendi amino asit kalıntıları dışında herhangi bir kimyasala ihtiyaç duymazken bazıları kofaktör olarak adlandırılan ilave kimyasallara ihtiyaç duyar. Kofaktör Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} veya Mn^{2+} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon olabildiği gibi koenzim olarak adlandırılan karmaşık bir yapıda organik veya metaloorganik molekül olabilir [1]. Bir koenzim veya metal iyonu enzim proteinine kovalent bağ ile bağlıysa buna prostetik grup denilir ve karbonik anhidraz enzimindeki Zn^{2+} iyonu bir prostetik gruptur [2].

Enzimler isimlendirilirken genelde substrat adının sonuna veya aktivitelerini tanımlayan kelime veya sözcük sonuna “-az” eki getirilir. Örnek olarak üreaz enzimi ürenin hidrolizini katalizler. Bazen bir enzimin birden fazla adı veya farklı iki enzime aynı adın verilmesi gibi durumlardan dolayı uluslararası kabul gören bir sınıflandırma sistemine gidilmiştir. Bu sınıflandırma sistemi (E. C. numarası) 4 rakamdan oluşmakta olup örnek olarak ATP: glikoz fosfotransferaz enzimi E.C. numarası 2.7.1.1 olup burada; ilk rakam (2) transferaz sınıfını, ikinci rakam (7) altsınıf fosfotransferaz sınıfını, üçüncü rakam (1) alıcı olarak hidroksil grubu içeren fosfotransferazlar ve dördüncü rakam (1) fosfat grubu alıcısı olarak D-glikozu temsil

etmektedir. Aşağıdaki çizelgede enzimlerin uluslararası sınıflandırılması gösterilmektedir (Çizelge 2.1) [1].

Çizelge 2.1 : Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması.

No	Enzim Sınıf Adı	Enzimin Görevi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrat iyonu veya H atomları)
2	Transferazlar	Grup-transfer reaksiyonları
3	Hidrolazlar	Hidroliz reaksiyonları (fonksiyonel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağa grupların eklenmesi veya grupların uzaklaştırılmasıyla çift bağın oluşumu
5	İzomerazlar	Moleküllerin içindeki grupların transferiyle izomerik formların eldesi
6	Ligazlar	C-C, C-S, C-O ve C-N gibi bağların oluşturulması

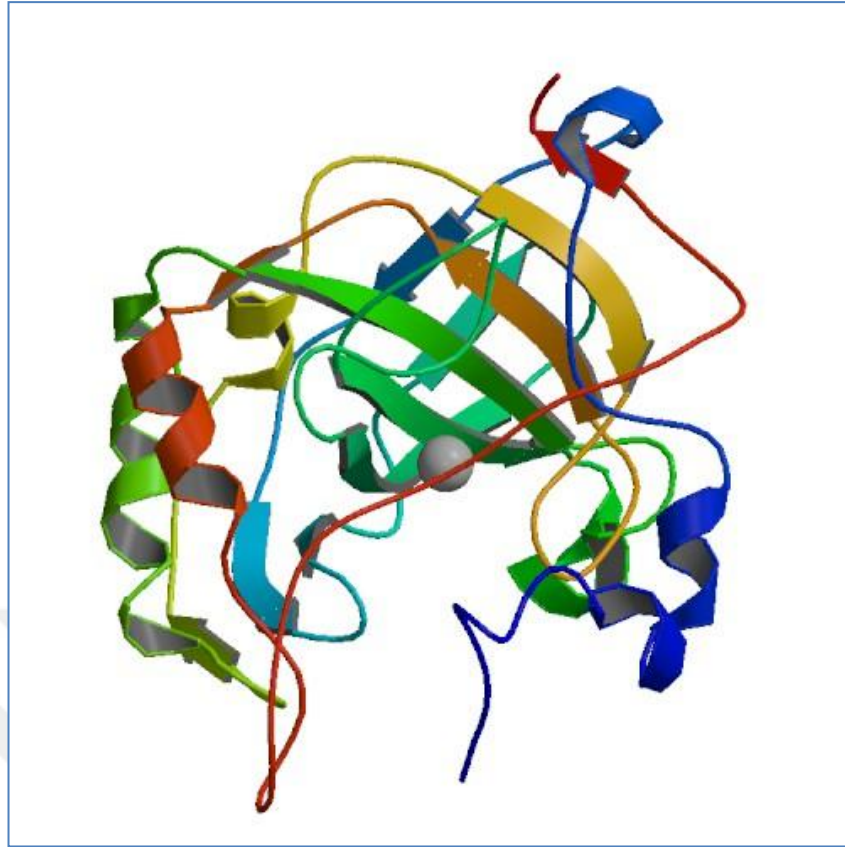
2.1 Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidraz enzimleri tüm canlı organizmalarda bulunan bir metaloenzim ailesidir (EC 4.2.1.1) ve geri dönüşümlü bir reaksiyon olan karbondioksitin bikarbonata ve protona dönüştüğü reaksiyonu katalizlediği bilinmektedir (2.1).



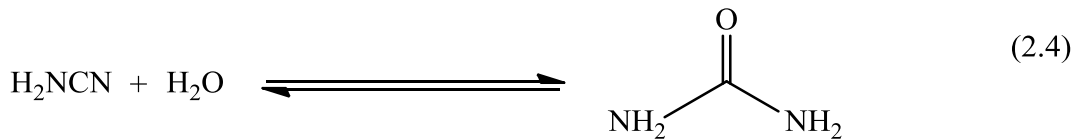
Karbonik anhidraz enziminin varlığı 1932’de Meldrum ve Roughton tarafından bulunmuştur, Keilin ve Mann tarafından ise 1940 yılında enzimdeki aktif metalin çinko iyonu (Zn^{+2}) olduğu gösterilmiştir, 1942 yılında Scott ve Fisher tarafından enzimin kristallendirilmesi, 1940 yılında Leiner tarafından etkinleştiricilerin varlığının iddiası ve gene 1940 yılında Keilin ve Mann tarafından sulfanilamidin karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi bildirilmiştir [3].

Karbonik anhidraz enzimi, 260 adet aminoasitten oluşan ve doğal hali kürecik şeklinde olan bir protein zinciridir (Şekil 2.1) [4].



Şekil 2.1 : Sığırdan elde edilen karbonik anhidraz II enzimi kristal yapısı (1V9E).

Karbondioksitin hidratasyonu haricinde, aşağıda reaksiyonları verilen COS ve CS₂ hidratasyonu (Denklem 2.2 ve 2.3), siyanamid hidratasyonu (Denklem 2.4), ester hidrolizleri (Denklem 2.5 ve 2.6) gibi reaksiyonlar da karbonik anhidraz enzim süper ailesi tarafından katalizlenmektedir. Bu reaksiyonların katalizlenmeleri diğer tüm karbonik anhidraz katalizleme reaksiyonlarında olduğu gibi metal hidroksitin nükleofil olarak davranmasıyla kolay bir şekilde gerçekleşir [5].



Karbondioksit karbonun kararlı bir formu olup, dünyadaki yaşamın merkezinde olan bir bileşiktir. Karbondioksitin su ile reaksiyonu sonucu oluşan kararsız bir bileşik

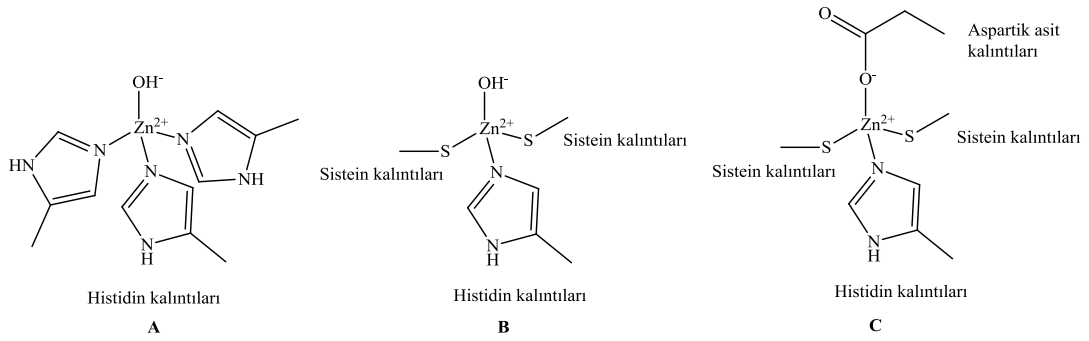
olan H_2CO_3 anında bikarbonat ve protona dönüşür. Birçok organ ve dokudaki fizyolojik pH seviyesi olan pH 7.5’de bu reaksiyon çok yavaştır [5]. Tüm canlı formları metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan yüksek miktardaki karbondioksitin idaresi için karbonik anhidrazilara ihtiyaç duyarlar [6]. Tüm canlı formlarında biyolojik reaksiyonlar pH tarafından sıkı bir şekilde düzenlendiğinden pH kontrolü de büyük önem arz etmektedir ve karbonik anhidrazların metabolik proseslerde yüksek miktarda oluşan karbondioksitin idaresi dışında, bunlara bağlı olarak ortaya çıkan asit-baz dengesizliklerini de 1 numaralı reaksiyonda ortaya çıkan ürünlerden bikarbonatın yüksek tampon ve protonun asit özelliğini kullanarak idare ettiği bilinmektedir [5].

Alfa-karbonik anhidrazlar omurgalılarda, tek hücreli hayvanlarda, su yosunlarında, yeşil bitkilerin ve bazı bakterilerin sitoplazmalarında [7,8,9,10]; β -karbonik anhidrazlar baskın olarak bakterilerde, su yosunlarında, tekçenekli ve ikiçenekli bitkilerin kloroplastlarında, bununla birlikte birçok küf türünde ve bazı arkebakterilerde [6,8,9-14]; γ -karbonik anhidrazlar arkebakteri, siyanobakteri ve çoğu bakteri türünde [10,15]; δ - ve ζ -karbonik anhidrazlar yalnız tek hücreli deniz otlarında [16]; η -karbonik anhidrazlar ise tek hücreli hayvanlarda görülmektedir [11].

2.1.1 Karbonik anhidrazların katalitik özellikleri

Tüm karbonik anhidrazlar metalloenzimdir ve apoenzim kısımlarının aktivite özellikleri olmadığından, metal iyonu enzimin katalizleme özelliği açısından önemlidir [5,8,17-19]. Bugüne kadar 7 farklı karbonik anhidraz enzim ailesi tespit edilmiştir; α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η - ve θ -karbonik anhidrazlar [20]. Karbonik anhidraz enzim aileleri, katalizleme işlemi sırasında aktif bölgede bulundurdıkları metal iyonuna göre farklılık göstermektedirler. Tüm hepsinde çinko iyonu (Zn^{2+}) kullanılmasına rağmen, γ -karbonik anhidrazlar büyük olasılıkla demir (Fe^{2+}) iyonu enzimidir (bağlı çinko (II) iyonu veya kobalt (II) iyonu ile de aktif) [5,8,21], ζ -karbonik anhidrazlar ise $Cd(II)$ veya $Zn(II)$ iyonunu fizyolojik katalizleme performansı için kullanırlar [5,22,23].

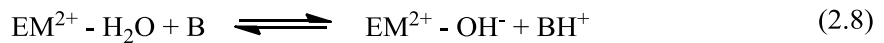
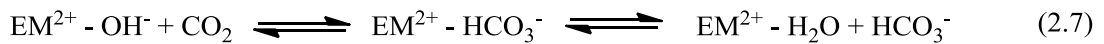
Enzimin aktif bölgesi koni biçiminde geniş bir alana yayılmış, molekülün merkezine kadar uzanan oyuk şeklindedir ve çinko iyonu oyukun alt kısmına bitişik durumdadır [24]. Değişik karbonik anhidraz enzim ailelerine ait metal iyonu koordinasyonları Şekil 2.2’de verilmiştir [5].



Şekil 2.2 : Farklı karbonik anhidraz enzim ailelerine ait metal iyonu koordinasyonları.

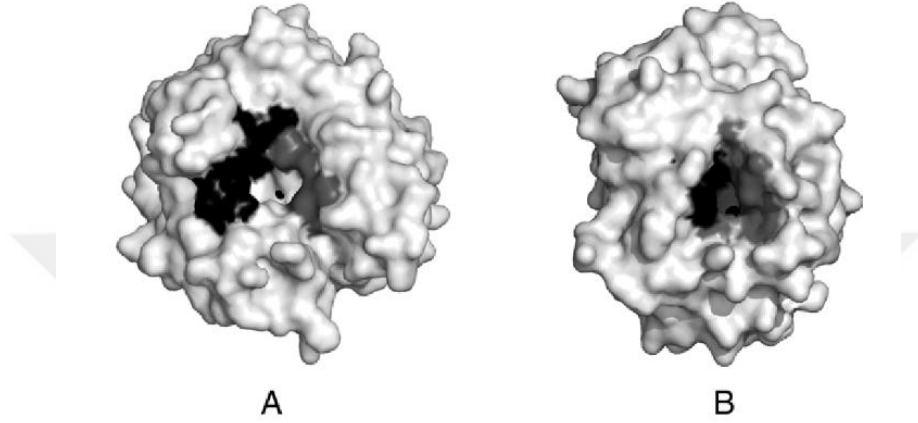
Şekil 2.2’de (A) ; α-, γ-, ve δ-karbonik anhidrazlarda üç adet Histidin kalıntısı ve su molekülü/hidroksit iyonu. Bazı γ-sınıfı üyelerinde üç adet Histidin kalıntısı ve iki adet su molekülüyle bipiramidal koordinasyon da gözlenmektedir [25]. (B) β-, ve ζ-karbonik anhidrazlarda (ζ-ailesinde aktif kısımda kadmiyum değil çinko bulundurduğu zaman) bir Histidin, iki adet Sistein kalıntısı ile beraberinde su molekülü/hidroksit iyonu. (C) β-karbonik anhidrazlarda kapanmış aktif kısımda bir Histidin, bir Aspartik asit ve iki Sistein kalıntılarıyla [26].

Tüm karbonik anhidraz ailelerinde katalitik reaksiyon iki kademedен oluşur. İlk kademedē enzimin aktif kısmı olan metal hidroksit kısmı ($EM^{2+}-OH^-$) nötr pH ortamında güçlü bir nükleofil gibi davranarak karbondioksit molekülü ile bikarbonat enzim kompleksi oluşturur ve sonrasında bu bikarbonat molekülü su molekülüyle yer değiştirir (Denklem 2.7). İkinci kademedē enzim metal kompleksine bağlı su molekülü ($EM^{2+}-H_2O$) enzimin aktif kısım kalıntısına veya bir proton alıcısına (B) proton transfer ederek enzim metal hidroksit kompleksi oluşturur ($EM^{2+}-OH^-$) (Denklem 2.8) [5].



Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Birçok enzim türünde metal su kompleksinden metal hidroksit kompleksinin oluştuğu aşama (Denklem 2.8) enzimin katalitik turnover için hız-belirleme kademesidir ve bazı α- ve ζ-karbonik anhidrazlar k_{cat} / K_M değerinde $10^8 M^{-1}s^{-1}$ değerini aşarak karbonik anhidrazları doğada bilinen en efektif katalizler arasına sokmaktadır [2,5,24,27].

Karbonik anhidrazlarda bulunan en çarpıcı özelliklerden birisi de aktif kısmında bir tarafta hidrofobik diğer tarafta hidrofilik özellik gösteren iki farklı çevreyi barındırmasıdır [19]. Bu yapı Şekil 2.3’ de insan kaynaklı hCA II ve tek hücreli deniz otuna ait karbonik anhidraz enzimi şekillerinde siyah ve gri bölgeler olarak gösterilmiştir [5]. Metal iyonu kürenin merkezindedir, hidrofobik kısım siyah ile hidrofilik kısım gri ile gösterilmiştir.



Şekil 2.3 : Karbonik anhidraz enzim ailesinde aktif kısmın yapısal görüntüsü.

2.1.2 Karbonik anhidraz izoenzimleri

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen fakat buna rağmen farklı kimyasal ve fiziksel özellikler gösteren enzimlere izoenzim denir. İzoenzimlerin substratlarına, inhibitörlerine ve kofaktörlerine ilgileri farklıdır ve buna sebep olarak her bir izoenzimin farklı aminoasit dizilimine sahip olması, izoelektrik noktalarının farklı olması ve elektroforetik hareketlerinin farklı olması sayılabilir. İzoenzimler farklı dokularda lokalize olabildikleri gibi, bir hücrenin farklı althücre bölümlerinde de bulunabilirler [27].

İnsanlarda da bulunan α -karbonik anhidraz ailesinde şimdiye kadar 16 farklı izoenzim bulunmuştur [28]. Bunların beş tanesi (CA I, II, III, VII ve XIII) sitozolik, dört tanesi (CA IV, IX, XII ve XIV) membrana bağlı, iki tanesi (CA VA ve VB) mitokondriyal, bir tanesi (CA VI) tükürük salgısında ve sütte bulunur. CA XV insanlarda ve günümüz primatlarında gözlenmez fakat kemirgenlerde ve yüksek omurgalılarda gözlenir [29]. Üç adet de katalitik özellik göstermeyen formu mevcuttur (CARP-VIII, CARP-X ve CARP-XI) ve bunlara karbonik anhidrazla alakalı proteinler denir (CARPs) [30]. Katalitik özellik gösterenlerin katalitik aktivite

özelliği, vücutta nerelerde bulunduğu ve ilişkili olduğu hastalıklarla ilgili bilgiler Çizelge 2.2’ de verilmiştir.

Çizelge 2.2 : Katalitik aktivite gösteren karbonik anhidraz izoenzimleri.

Enzim	Katalitik aktivite	Organ/doku dağılımı	İlişkili olduğu hastalık
CA I	Düşük	Eritrositler, sindirim sistemi, göz	Retina/beyin ödemi
CA II	Yüksek	Eritrositler, sindirim sistemi, göz, böbrek, akciğerler, kemik hücreleri, testis, beyin	Glokom, ödem, epilepsi, yükseklik hastalığı
CA III	Çok düşük	İskelet kaslarında, adipositlerde	Oksidatif stres
CA IV	Orta	Böbrek, pankreas, akciğer, beyin kapillerleri, kolon, kalp kası, göz	Glokom, inme, gece körlüğü
CA VA	Düşük	Karaciğer	Obezite
CA VB	Yüksek	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, omurilik, sindirim sistemi	Obezite
CA VI	Düşük	Tükürük ve süt bezleri	Diş çürükleri
CA VII	Yüksek	Merkezi sinir sistemi	Epilepsi, oksidatif stres
CA IX	Yüksek	Tümörler ve sindirim mukozası	Kanser
CA XII	Düşük	Böbreğe ait, bağırsağa ait, üreme epitelleri, göz, tümörler	Kanser, glokom
CA XIII	Düşük	Böbrek, beyin, akciğer, üreme sistemi, bağırsak	Kısırlık
CA XIV	Düşük	Beyin, karaciğer, göz, iskelet kası	Epilepsi, iltihapsız retina hastalığı

2.1.2.1 Karbonik anhidraz I (CA I)

CA I enzimi kırmızı kan hücreleri ve kalın bağırsakta yaygın olarak bulunmasına rağmen genellikle araştırmacıların hedefinde pek yoktur. Fakat yapılan bazı araştırmalar bu enzimin bazı hastalıklarla ilişkisini ortaya koymuştur, bunlara örnek olarak Gambhir ve diğerlerinin eritrositlerdeki CA I aktivite azalmasının kansızlık ve kronik asidoz ile ilişkisini ortaya koyduğu çalışmayı gösterebiliriz [31]. Bunun yanında hücre dışı ortamda yüksek seviyede bulunmasının diabetik maküler ödem ve çoğalan diabetik iltihapsız retina hastalığı gibi durumlara yol açan aşırı retinal damar geçirgenliğiyle ilişkili olduğu Gao ve diğerleri tarafından yapılan çalışmayla gösterilmiştir [32]. Bunlara ilaveten, Gao ve diğerlerinin yaptığı çalışmada kan-

retinal ve kan-beyin bariyerlerindeki hücre dışı ortamdaki yüksek CA I miktarlarının vazojenik ödeme yol açtığı ortaya konulmuştur [32]. Yapılan başka bir çalışmada ise kolon epitel hücrelerindeki CA I enzimi miktarı düşüklüğünün kolon kanseri için belirleyici ve spesifik bir işaretleyici olarak kullanılabileceği gösterilmiştir [33]. Diğer yandan, yaygın bir şekilde bulunmasına rağmen CA I'in sindirim sistemi, karaciğer ve pankreastaki fonksiyonlara ilişkin data bulunmamaktadır. Daha yakın bir zamanda Takakura ve diğerleri tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise prostat kanseri hastalarının plazma örneklerinde sağlıklı insanların plazmasındakine oranla daha yüksek miktarda CA I peptit parçalarına rastlanmıştır ve bu sonuçlar onların prostat kanseri hücrelerinin daha fazla CA I ürettikleri ve aynı zamanda plazmadaki CA I seviyesi ölçümünün prostat kanseri için bir biomarker olabileceği hipotezini ortaya atmalarına yol açmıştır [34]. Chang ve diğerleri ise ankilozan spondilit hastalarında sinovyal membran içerisinde belirgin oranda CA I artışı gözlemişlerdir [35,36]. Tüm bunların ötesinde, CA I'in kendisi CA II ve CA IV ile birlikte, Hippel-Lindau tümörleri, ilerleyen polikistik böbrek hastalığı, acinar-ductal pankreatic karsinom, veya bağışıklık sistemi/idyopatik kronik pankreatitis gibi ilişkilendirildiği hastalıklardaki rolü araştırılmalıdır [5].

Diğer yandan, CA I'in düşük seviyelerinin de bazı patolojik durumlarla ilişkili olduğu gözlemlenmektedir [37]. Örnek olarak, tip II diyabet hastalarının eritrositlerinde CA I seviyelerinde düşüklük gözlenmiştir [31].

2.1.2.2 Karbonik anhidraz II (CA II)

CA II enzimi, ilk kez 80 yıldan uzun zaman önce kırmızı kan hücrelerinde baskın fizyolojik özellikleriyle bulunan izoenzim olduğundan, “fevkalade, mükemmel” karbonik anhidraz izoenzimi olarak bilinmektedir [8,9,12,13,17]. CA II enzimi, sitozolik bir karbonik anhidraz izoenzimidir ve tüm omurgalılarda birçok hücre, doku ve organda bulunan yaygın türüdür [6,8,14,17,37]. Çok önemli görevler üstlenmesinin dışında bazı spesifik görevleri de yerine getirmektedir [6,19,30,37-42]. Bu görevler içerisinde, insan CA II izoenziminin (hCA II) görev aldığı, karbondioksitin bikarbonata ve protona dönüştürülmesi de vardır. hCA II izoenzimi kanda baskın şekilde bulunmaktadır ve karbondioksitin bikarbonata ve protona dönüştürülmesi reaksiyonundaki katalitik aktivitesi hayli yüksektir (20 °C ve pH 7.5’de k_{cat} değeri: $1,40 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ve k_{cat}/K_M değeri: $1,50 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [8,9,12,17].

İnsanları da kapsayan memelilerde, kanda iki farklı karbonik anhidraz izoenzimi bulunur, bunlar CA I ve CA II'dir ve toplamdaki konsantrasyonları 200 nM gibi hayli yüksek bir seviye olabilir. hCA I izoenziminin hCA II izoenzimine oranla katalitik aktivitesi hayli düşüktür ve bunun yanında, hCA I izoenziminin plazmada da bulunan klorür ve bikarbonat ile inhibe olması bu izoformun fizyolojik fonksiyonlarıyla ilgili soru işaretleri oluşturmaktadır [38]. hCA II izoenzimine dönecek olursak, bu izoform sadece bikarbonat bakımından zengin gözün ön odasında bulunan göz sıvısında [43,44] veya omurilik sıvısında [45,46] olduğu gibi birçok dokudaki elektrolitlerin salgılanmasında değil, bunların yanında tüm vücuttaki pH ve karbondioksit dengesinin kurulmasında da görev alır. Görev aldığı diğer fonksiyonlar ise, idrarın oluşturulması ve börek kanallarında bikarbonatın geri absorplanması [45,47], glikoneojenez, lipojeniz ve ürejeniz gibi biyosentetik reaksiyonlar [48-50], kemik erimesi ve kireçlenme [51] ve henüz yeterli olarak anlaşılamamış birçok fizyolojik/patolojik reaksiyon. Bunların yanında, bir veya daha fazla dokuda bu izoenzimin aktivitesinin düzenlenmesinin önemli patolojik sonuçları olmaktadır, bunlara örnek olarak (i) gözde aşırı göz sıvısı salgılanması sonucu oluşan göz içi basıncın arttığı glokom [52-54]; (ii) CA II'nin böbrekte diğer izoformlardan bazılarıyla birlikte rol aldığı prosesler sonucu idrarda yeterli miktarda sıvı salgılanmaması veya elimine edilmemesi sonucu vücutta sıvı birikmesiyle oluşan ödem [55-57]; (iii) epilepsi (CA II ve diğer beyin CA izoformlarının bu hastalığındaki etkileri henüz yeterli olarak anlaşılamamış olsada kesinlikle alakasız değillerdir) [58-60]; (iv) bazı kanser türlerinde, CA II izoenziminin CA IX ve CA XII gibi diğer bazı izoenzimlerle birlikte seviyelerinde gözlenen yükseklikler [9,61-65]. Yukarıda saydıklarımızın dışında, CA II izoenziminin AMS (yüksek seviyelerde oksijen basıncının azlığıyla gözlenen hastalık) [66,67], damar tıkanıklığı [68] ve osteoporoz [69] gibi hastalıklarla ilişkisiyle ilgili hayli yayın bulunmaktadır [5,69,70].

CA II izoenzimi yukarıda saydığımız hastalıklarla ilişkisi nedeniyle geliştirilen ilaçlarda hedef olarak alınmasının dışında bu enzimin bulunduğu organlardaki değişik patolojik durumlarda görüntüleme amacıyla da kullanılmaktadır, buna örnek olarak beyin ve omurilik sıvısı [71,72], veya sindirim sistemi [73] verilebilir.

2.1.3 Karbonik anhidrazların inhibisyonu

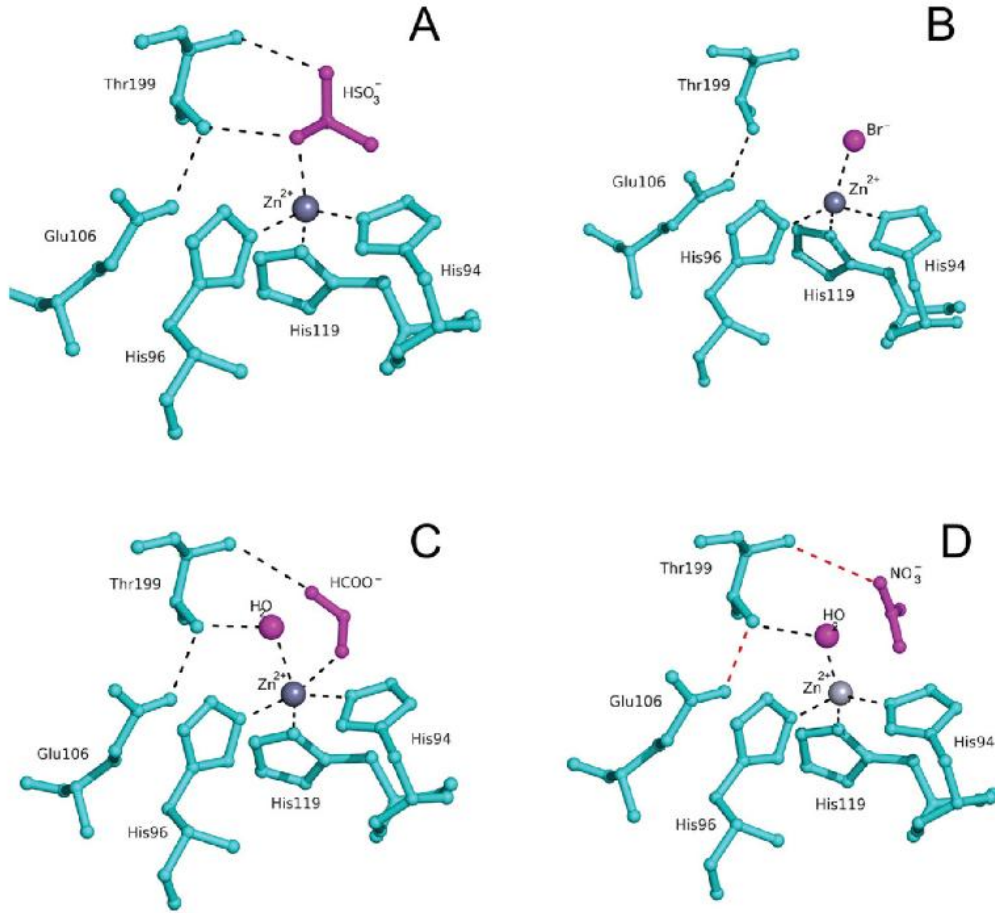
Karbonik anhidrazların inhibisyonları on yıllarca yıldır çalışılmaktadır ve günümüzde detaylı olarak anlaşılmış süreçlerdir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar ışığında karbonik anhidraz inhibitörlerini inhibisyon mekanizmalarına göre aşağıdaki gibi dört başlık altında toplayabiliriz:

- (i) metal iyonuna (inorganik anyon) bağlananlar: sülfonamidler ve onların sülfamatlar, sülfamidler ve *N*-hidroksi-sülfonamidler gibi izosterik eşdeğerleri; ditiyocarbamatlar ve onların ksantatlar gibi izosterik eşdeğerleri; hidroksamatlar ve diğerleri [5,8,9,12,17,52-58,60-65];
- (ii) fenoller, poliaminler, sülfokumarinler gibi çinko iyonuna koordine su molekülüne/hidroksit iyonuna tutunanlar [8,66-68];
- (iii) kumarinler ve onların izosterik eşdeğerleri gibi enzimin aktif bölgesinin girişini kapatanlar [5,69-71];
- (iv) henüz inhibisyon süreci yeterli olarak anlaşılamamış sekonder/tersiyer sülfonamidler, imatinib, nilotinib ve diğerleri [5,72-75].

2.1.3.1 Metal iyonuna bağlanan CA inhibitörleri

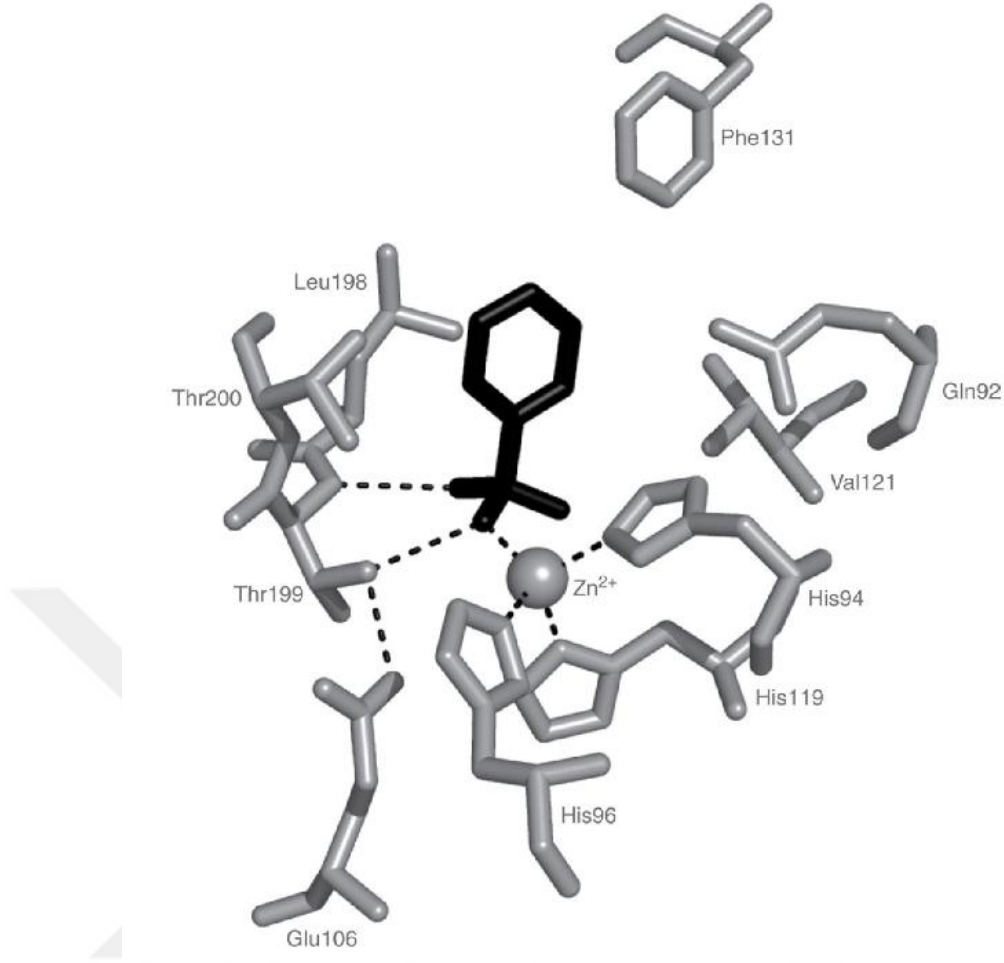
Sülfonamidler

Metal iyonuna bağlanan inhibitörler ya düzgün dörtyüzlü ya da üçgen piramit şeklinde koordinasyon sağlarlar [5,8,9,12,16,17,21,22,39,76-79]. Sülfonamidler, sülfamatlar, sülfamidler, ditiyokarbamatlar ve ksantatlar anyon şeklinde bağlanırlar ve azot veya sülfür çinko iyonuna Zn(II) düzgün dörtyüzlü şeklinde koordine olur (Şekil 2.4) [5].



Şekil 2.5 : Bazı anyonların hCA II enzimiyle oluşturdukları kompleksin yapısal görünüşü [5].

Yapılan birçok çalışma sonucunda bir protonunu kaybederek negatif yükle yüklenecek azot atomu barındıran sülfonamidlerin pozitif yüklü çinko $Zn(II)$ iyonuyla kolay bir şekilde bağ kurabileceği ortaya konulmuştur. Primer sülfonamidlerin çoğu potansiyel hCA II inhibitörüdür ve enzim-inhibitör katsayı değerleri (K_i) düşük mikromolar seviyeden pikomolar seviyeye kadar olan bir aralıkta olabilir. Bununla beraber sülfonamid bileşiğinde bulunan R grubuna bağlı olarak enzimin aktif bölgesinde bulunan hidrofilik ve/veya hidrofobik bölgelerle oluşacak ilave bağlantılar kompleksin daha kararlı veya kararsız olmasına ve Şekil 2.6'da hCA II enzimine bağlanan benzensülfonamidde görüldüğü gibi farklı inhibisyon şekilleri oluşturmaya yol açabilir [5,17].

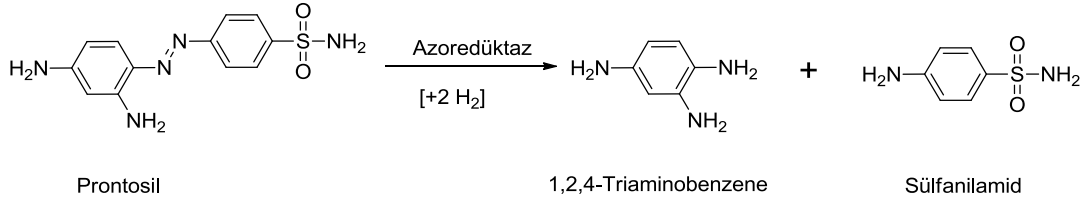


Şekil 2.6 : Benzensülfonamidin (siyah) hCA II enziminin aktif bölgesine (gri) bağlanması.

Sülfonamidlerin ilk olarak antibakteriyel özelliklerinin keşfedildiği 1930’lardan günümüze önemi gittikçe artmış ve antibakteriyel özelliklerinin dışında klinik olarak başka hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceği keşfedilmiştir. İlk olarak Bayer firmasında çalışan Josef Klarer tarafından sentezlenen kırmızı azo boyar madde olan Prontosil’in hayvanlarda bakterinin üremesini durdurduğu gözlenmiştir fakat canlı dışında (in vitro) yapılan deneylerde etki etmediği görülmüştür. Heinrich Hörlein’in 1920’lerde bakteriyel ve tropikal hastalıkların sentetik kimyasallarla tedavisi üzerine başlatmış olduğu farmasötik araştırma programı sonrası 1920’lerin sonuna kadar her hafta otuza yakın yeni bileşik streptokokkal suş üzerinde denenmiştir [84-86].

1935 yılında antibakteriyel testlerden sorumlu olan Gerhard Domagk tarafından sülfonamidlerin antibakteriyel etkisi keşfedilmiştir ve kendisine 1939 yılında bu keşfinden dolayı Nobel Ödülü layık görülmüştür. Domagk prontosili kullanarak farelerde ve tavşanlarda streptokokkal enfeksiyonunu kontrol altına almıştır.

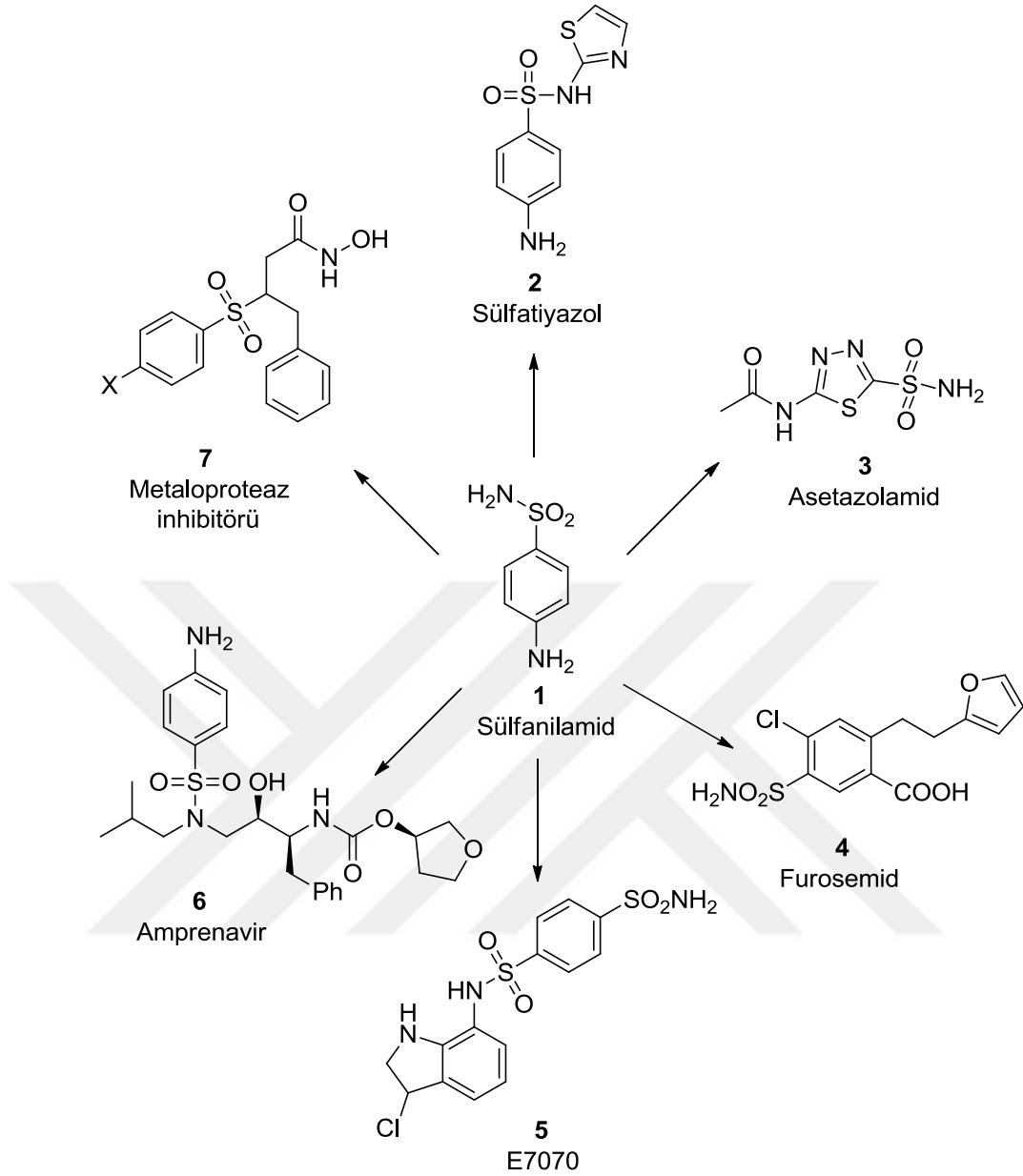
Paristeki Pasteur enstitüsünde Ernest Fourneau ve çalışma arkadaşları 1935 yılında, canlı içinde etkin olan ama canlı dışında antibakteriyel etki göstermeyen prontosilin canlı içinde sülfanilamide dönüştüğü metabolizmayı (Şekil 2.7) ortaya çıkararak etkin olan kısmın sülfanilamid olduğunu ortaya koymuştur, ve sülfanilamid 1937 yılında ilk antibakteriyel ajan olarak İngiltere, Fransa ve Amerika Birleşik Devletlerinde piyasaya sürülmüştür [86].



Şekil 2.7 : Canlı içinde prontosilin sülfanilamide dönüşme mekanizması.

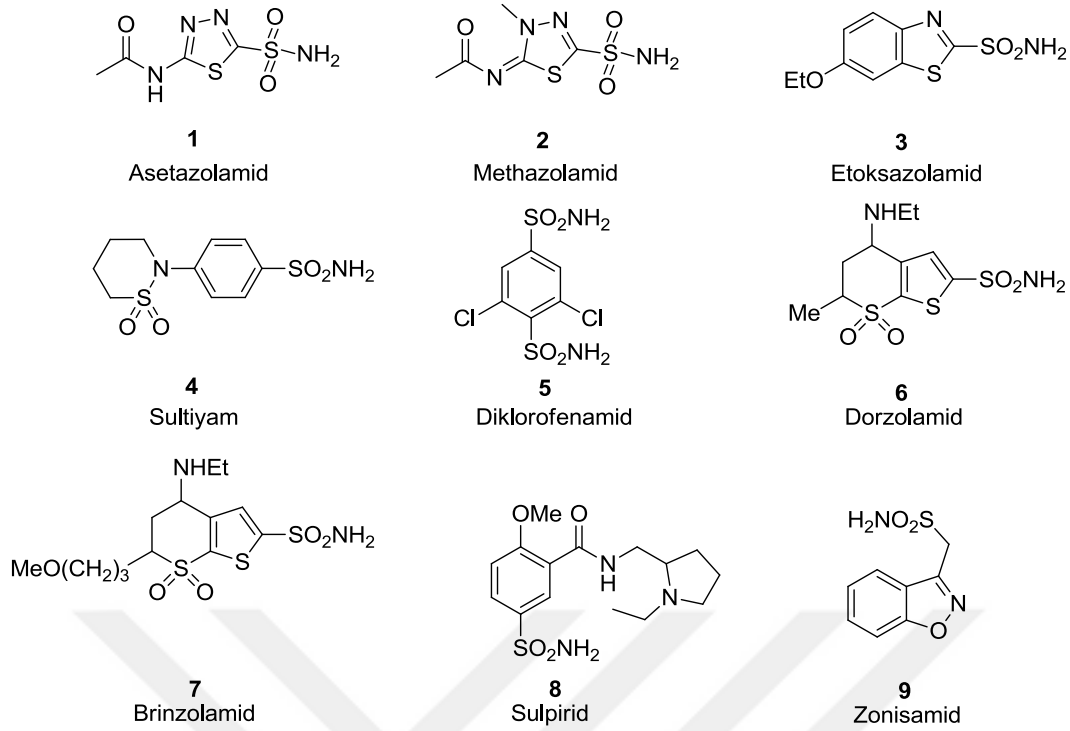
1941’de penisilinin bulunuşuna kadar farklı sülfonamid türevleri sentezlenmiş ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ana tedavi yöntemi olmuşlardır [87]. Sülfonamidlerin bağırsaklarda zayıf emilimi, idrarda kristal bulunması ve böbreksel toksisite, bakterilerde sülfonamidlere karşı oluşan direnç gibi sebeplerle insanlardaki antibakteriyel amaçlı kullanımı kısıtlanmış olsa da günümüzde hala bazı türevlerinin idrar yolları enfeksiyonları, göz ve kulak enfeksiyonları ve bronşit gibi durumlarda kullanımı devam etmektedir [87].

Antibakteriyel olarak kullanımları kısıtlanan sülfonamidler günümüzde birçok farklı farmakolojik özellik gösteren bir ilaç ailesidir ve bunlara örnek olarak basit öncü molekül sülfanilamidden 1 (Şekil 2.8) başlayarak yola çıkılan antibakteriyel özellik gösteren sülfatiazol 2, karbonik anhidraz inhibitörü asetazolamid 3, idrar söktürücü furosemid 4, kanseri önlemede ileri seviye klinik çalışma aşamasında olan E7070 5, AIDS ve HIV enfeksiyonunda kullanılan HIV proteaz inhibitörü amprenavir 6, metaloproteaz inhibitörü olarak 7 gösterilebilir [88].



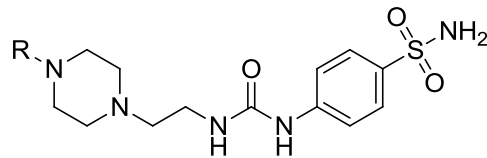
Şekil 2.8 : Sülfanilamid ve klinik olarak kullanılmakta olan bazı sülfonamidler.

Sülfonamidler en önemli karbonik anhidraz inhibitör sınıfıdır ve asetazolamid 1, methazolamid 2, etoksazolamid 3, sultiyam 4, diklorofenamid 5, dorzolamid 6, brinzolamid 7, sulpirid 8 ve zonisamid 9 gibi örnekleri (Şekil 2.9) yıllardır klinik olarak idrar söktürücü, glokom veya epilepsi tedavisinde kullanılmaktadırlar.



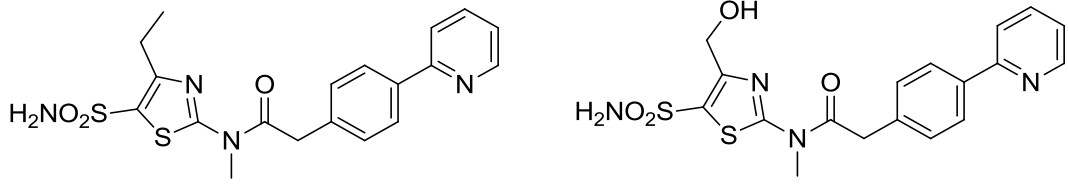
Şekil 2.9 : Klinik olarak karbonik anhidrazı inhibe etmekte kullanılan bazı sülfonamid örnekleri.

Karbonik anhidraz inhibitörü olarak sentezlenen sülfonamidlere yakın zamanda yapılan çalışmalardan örnek verecek olursak: Mishra ve diğerlerinin sentezledikleri benzensülfonamid türevlerinin (Şekil 2.10) karbonik anhidraz inhibisyonu ve epilepsi nöbeti engelleyici etkileri üzerine çalışmayı [89];



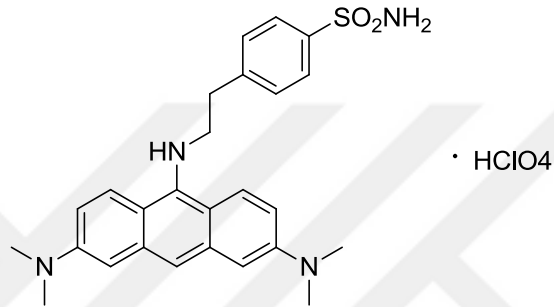
Şekil 2.10 : Karbonik anhidraz inhibisyonu ve epilepsi nöbeti etkileri için sentezlenen benzensülfonamid türevleri.

Carta ve diğerlerinin hCA I, hCA II, hCA VA, hCA VB, hCA IX ve hCA XII inhibisyon aktivitelerini incelemek üzere sentezledikleri, herpes simplex virüsü (HSV) gibi virüslere karşı etkili olan ve faz II klinik aşamasında olan Pritelivir benzeri tiyazolsülfonamidler (Şekil 2.11) üzerine yapılan çalışmayı [90];



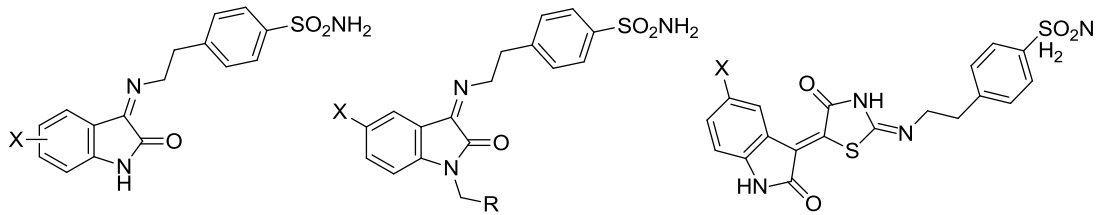
Şekil 2.11 : Karbonik anhidraz inhibisyon etkileri üzerine sentezlenen bazı tiyazolsülfonamidler.

Bragagni ve diğerlerinin, hCA I ve hCA II'ye oranla hCA IX'un seçici olarak inhibisyonu etkilerini araştırdıkları nükleik-asit seçici floresan katyonik boya olan acridine orange (AO) türevi sülfonamid (Şekil 2.12) sentezi yaptıkları çalışmayı [91];



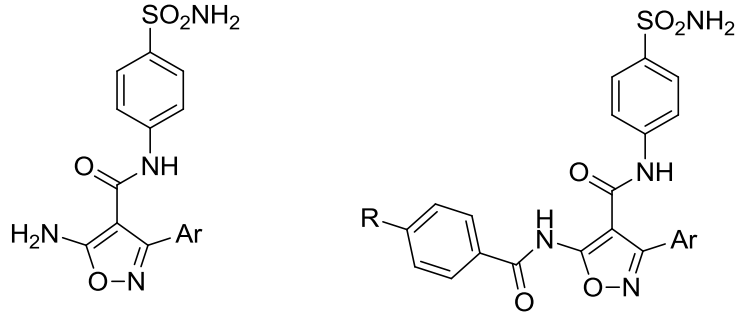
Şekil 2.12 : Karbonik anhidraz IX inhibisyon etkileri üzerine sentezlenen acridine orange (AO) türevi sülfonamid bileşiği.

Eldehna ve diğerlerinin, anti-kanserojen ve karbonik anhidraz inhibisyonu gibi değişik biyolojik etkilere sahip isatin (1*H*-indol-2,3-dion) temelli sülfonamidlerin (Şekil 2.13) sentezi, karbonik anhidraz izoformları I, II, IV ve VII üzerine inhibisyon etkileri ve moleküler kenetlenme çalışmalarını yaptıkları çalışmayı [92];



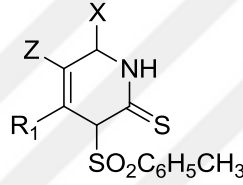
Şekil 2.13 : Karbonik anhidraz I, II, IV ve VII inhibisyon etkileri incelenen isatin temelli sülfonamid bileşikler.

Altug ve diğerlerinin izosakzol içeren sülfonamidlerin (Şekil 2.14) sentezini ve karbonik anhidraz II ve VII üzerine inhibisyon etkilerini inceledikleri çalışmayı [93];

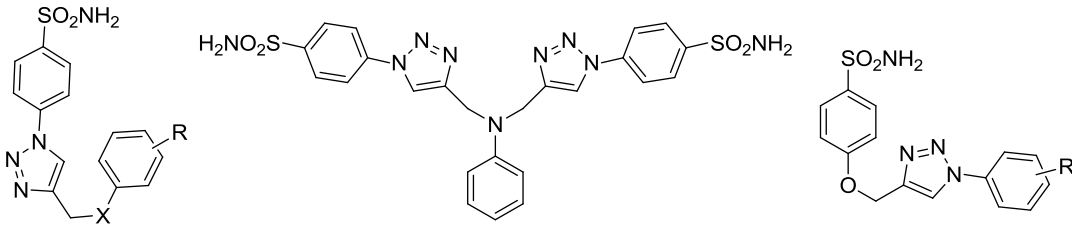


Şekil 2.14 : Karbonik anhidraz II ve VII inhibisyon etkileri incelenen izosakzol temelli sülfonamid bileşikleri.

Taslimi ve diğerlerinin heteroaril tabanlı sülfonamidlerin (Şekil 2.15) sentezi ve karbonik anhidraz inhibisyonu ve diğer bazı biyolojik etkilerinin incelendiği çalışmayı [94] ve Nocentini ve diğerlerinin triazol tabanlı sülfonamidlerin (Şekil 2.16) sentezini ve bunların hCA I, hCA II, hCA IX ve hCA XII inhibisyon etkileri inceledikleri çalışmayı gösterebiliriz [95].

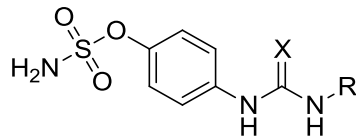


Şekil 2.15 : Karbonik anhidraz hCA I ve hCA II inhibisyon etkileri incelenen heteroaril tabanlı sülfonamid bileşikleri.



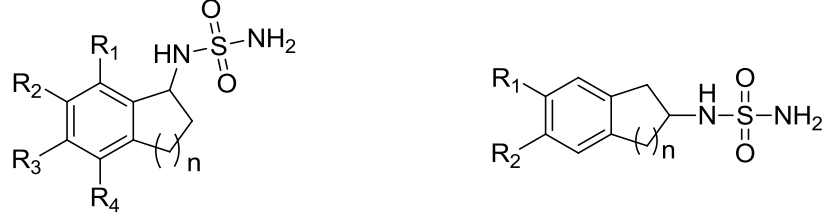
Şekil 2.16 : hCA I, hCA II, hCA IX ve hCA XII inhibisyon etkileri incelenen triazol tabanlı sülfonamidler.

Sülfonamidler dışında metal iyonuna bağlanan konunun başında da belirttiğimiz diğer gruplara örnek verecek olursak, Gieling ve diğerlerinin sentezledikleri karbonik anhidraz IX inhibitörü sülfamatların (Şekil 2.17) göğüs kanseri dokularındaki antimetastatik etkilerinin incelendiği çalışmayı [96];



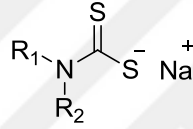
Şekil 2.17 : Gieling ve diğerleri tarafından sentezlenen ve karbonik anhidraz IX inhibisyon özellikleri incelenen sülfamatlar.

Akıncıoğlu ve diğerlerinin hCA I ve hCA II inhibisyonu üzerine etkilerini inceledikleri sentezledikleri yeni sülfamidlerin (Şekil 2.18) olduğu çalışmayı [97];



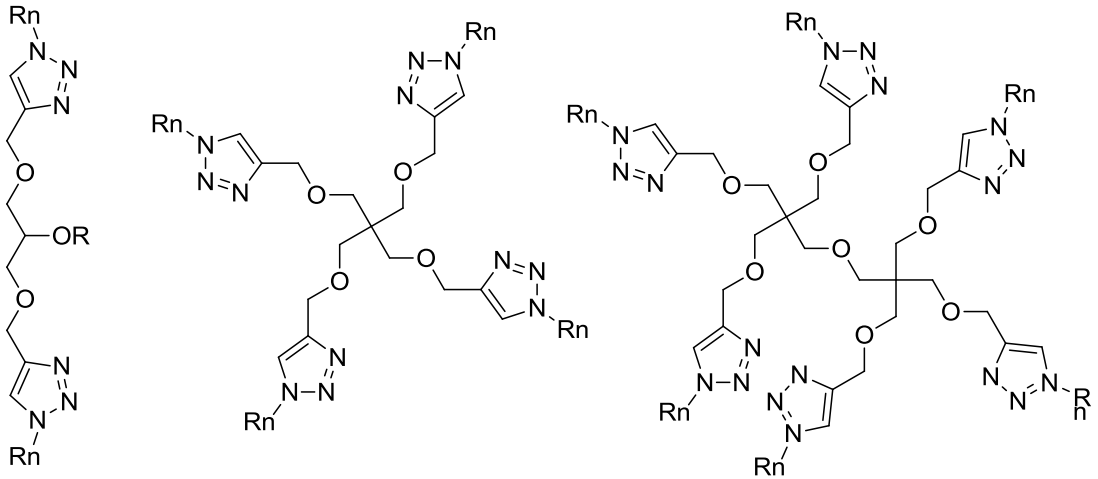
Şekil 2.18 : Akıncıoğlu ve diğerleri tarafından sentezlenen ve hCA I ve hCA II inhibisyon özellikleri incelenen sülfamidler.

Carta ve diğerlerinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak yeni bir sınıf altında inceledikleri ve kristal yapısı ve kinetiklerinin yanında hCA I, hCA II ve hCA IX inhibisyon aktivitelerini inceledikleri ditiyokarbamatlarla (Şekil 2.19) ilgili çalışmayı [98];



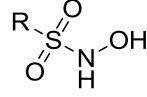
Şekil 2.19 : Karbonik anhidraz inhibitörü olarak ditiyokarbamatlar.

Abellán-Flos ve diğerlerinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak sentezledikleri ve hCA I, hCA II, hCA IX ve hCA XII inhibisyon aktivitelerini inceledikleri ksantatları (Şekil 2.20) [99] ;



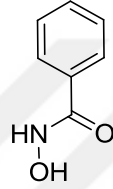
Şekil 2.20 : Abellán-Flos ve diğerlerinin karbonik anhidraz inhibitörü olarak sentezledikleri ksantatlar.

Mincione ve diğerlerinin sentezlemiş oldukları *N*-hidroksisülfonamidlerin (Şekil 2.21) hCA I, hCA II ve bCA IV inhibisyon aktivitelerini inceledikleri çalışmayı [100];



Şekil 2.21 : Karbonik anhidraz inhibitörü olarak *N*-hidroksisülfonamidler.

Ve Di Fiore ve diğerlerinin 2012 yılında hidroksamatı (Şekil 2.22) yeni karbonik anhidraz inhibitör sınıfı olarak gösterdikleri ve karbonik anhidraz inhibisyon aktivitesini inceledikleri çalışmayı [101] örnek olarak gösterebiliriz.

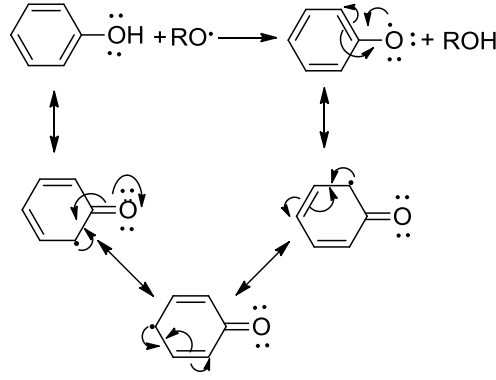


Şekil 2.22 : Di Fiore ve diğerleri tarafından karbonik anhidraz aktivitesi incelenen hidroksamat.

2.1.3.2 Çinko iyonuna (Zn²⁺) koordine su molekülüne/hidroksit iyonuna tutunanlar

Fenoller

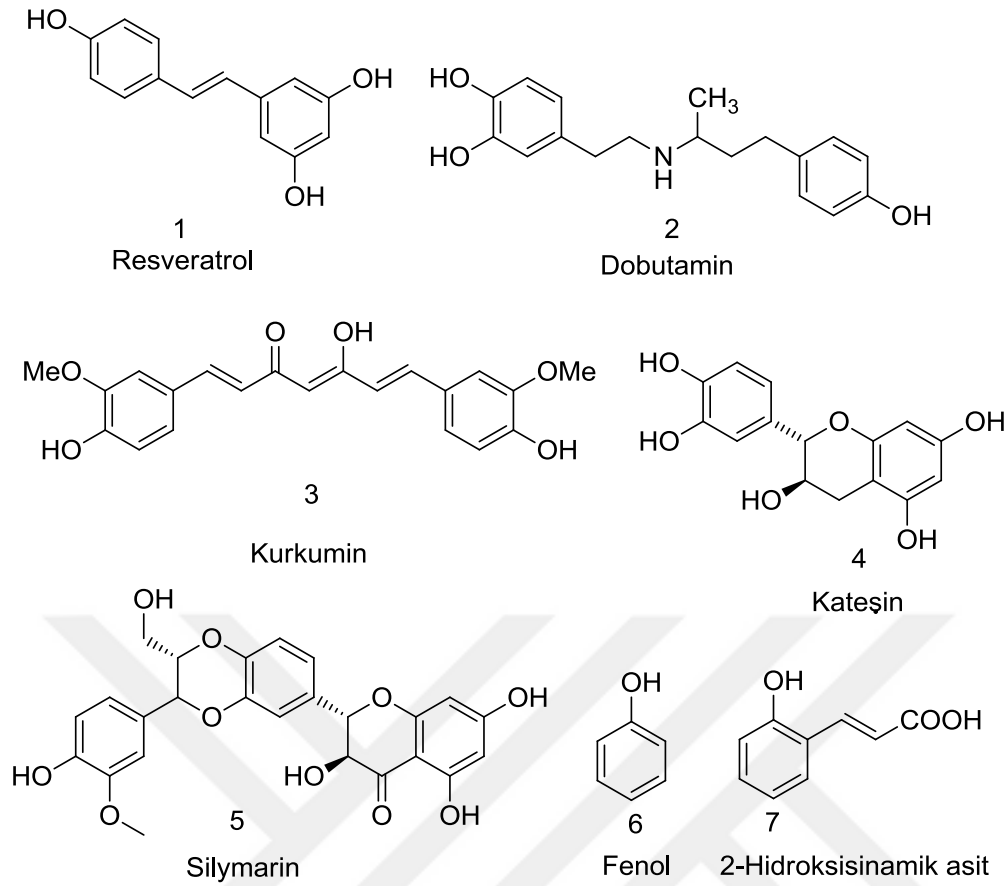
Genellikle antioksidan özellikleriyle isimlerini duymuş olduğumuz fenoller veya yaygın olarak kullanılan ismi ile polifenoller, bitkilerde doğal olarak bol miktarda bulunan, çevresel stres faktörlerine karşı bitkilerde koruma sağlayan, meyve ve çiçeklere renklerini veren benzen halkasına hidroksil bağlı kimyasal bileşiklerdir [27]. Fenol radikaline kararlılık kazandıran rezonans özelliği (Şekil 2.23), serbest radikalleri temizleme [102,103], singlet oksijen oluşumunu engelleme veya azaltma [102] ve metal iyonlarla bileşik oluşturma gibi özellikleri fenolik bileşiklere antioksidan özelliği sağlamaktadır [27].



Şekil 2.23 : Fenol radikalinin rezonans yapıları.

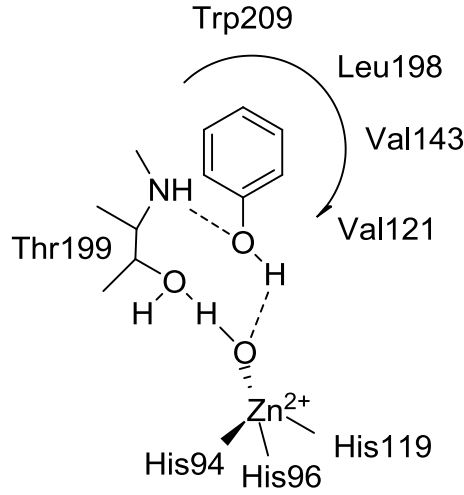
Fenoller hidroksil grubunda bulunan hidrojeni vererek, lipidlerin ve protein, karbonhidrat, nükleik asitler gibi diğer biyomoleküllerin serbest radikallerle okside olmalarını önlerler [104]. Antioksidan özelliklerinin dışında fenollerin, antikanserojen, antitümör, antibakteriyel, antiviral ve antiinflamatuvar özelliklerinin olduğu raporlanmıştır [105].

Resveratrol 1, dobutamin 2, kurkumin 3, kateşin 4 ve silymarin 5 gibi bileşikler (Şekil 2.24) farklı yapısal formlara sahip olmalarına karşın güçlü antioksidan özellik gösterirler. Kırmızı şarapta bulunan resveratrol (1) bileşiğinin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağladığı düşünülmektedir [106]. Dobutamin (2) bileşiği ise akut kalp yetmezliği tedavisinde kullanılmaktadır [107]. Zerdeçal bitkisinin kökünden elde edilen kurkumin (3) bileşiğinin ise birçok biyolojik etkisinin yanında en önemlisi olarak anti-kanserojen etki gösterdiği bilinmektedir [108]. Çaylarda ve yediğimiz birçok meyve ve sebze de bulunan kateşin 4 bileşiği ise antioksidan özellik göstermektedir [109]. Devedikeninin meyve tohumlarından izole edilen silymarin 5 bileşiğinin ise kanser, varis, menstrual problemler, depresyon, düşük miktarda göğüs sütü üretimi, karaciğer rahatsızlıkları gibi durumlarda faydalı olacağı raporlanmıştır [110,111].



Şekil 2.24 : Önemli biyolojik aktiviteler gösteren birtakım fenolik bileşikler.

Fenoller yukarıda saydığımız özelliklerinin dışında potansiyel birer karbonik anhidraz enzimi inhibitörüdürler. Lindskog grubu tarafından, insan karbonik anhidrazı II (hCA II) inhibisyonu üzerine yapılan çalışmada fenolün sübstrat olarak CO₂ ile yarışmalı olarak davranan tek inhibitör olduğu ortaya konulmuştur [105,112]. Christianson grubu tarafından yapılan çalışmada ise fenolün hCA II enzimi ile oluşturduğu yapının X-ışını yapısını ortaya konulmuştur, ve fenolün daha önce öngörülmemiş şekilde hidroksil grubu vasıtasıyla enzimin çinko iyonuna bağlı su/hidroksit iyonuyla ve Thr199'un NH grubuyla bağ kurduğu görülmüştür (Şekil 2.25) [113].



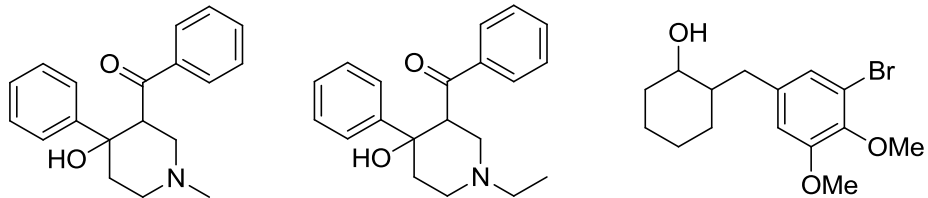
Şekil 2.25 : Fenolün hCA II karbonik anhidraz enziminin aktif kısmıyla yapmış olduğu etkileşimlerin şematik gösterimi.

Fenoller genelde mikromolar seviyede etkili karbonik anhidraz inhibitörleridir. Son yıllarda yayınlanan fenol türevi karbonik anhidraz enzimi inhibitörlerine ait çalışmalara ait örnekler olarak:

Innocenti ve diğerlerinin 7 adet antioksidan fenol ve polifenolünkarbonik anhidrazların memeli izoformları I-XV üzerindeki inhibisyon etkilerini inceledikleri çalışmayı [105];

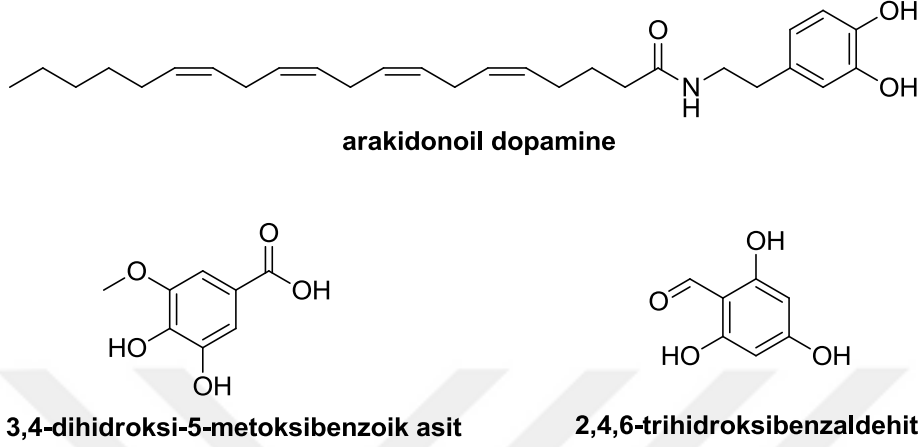
Öztürk ve arkadaşları tarafından salisilik asit, tannic acid, 3-hidroksi benzoik asit gibi toplamda 12 adet fenolik bileşiğin canlı dışında α -karbonik anhidraz izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin incelendiği çalışmayı [114];

Salmas ve diğerlerinin Şekil 2.26'daki gibi bazı fenolik bileşiklerin sentezi, karbonik anhidraz izoformları I ve II üzerine inhibisyon etkilerinin incelendiği ve enzim-sübstrat etkileşimlerinin *in silico* incelendiği çalışmayı [115];



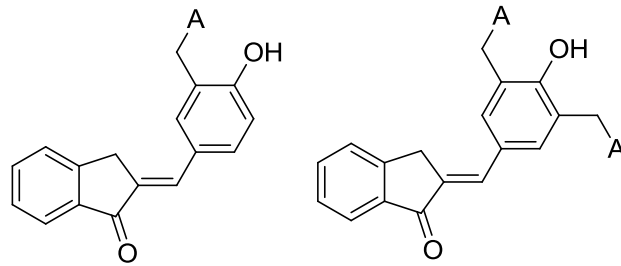
Şekil 2.26 : Salmas ve diğerleri tarafından CA I ve II inhibisyon etkileri incelenen ve *in silico* enzim-sübstrat çalışmaları yapılan bazı fenoller.

Huyut ve diğerleri tarafından arakidonoil dopamine, 2,4,6-trihidroksibenzaldehit ve 3,4-dihidroksi-5-metoksibenzoik asit bileşiklerinin (Şekil 2.27) hCA I ve hCA II inhibisyon etkilerinin canlı dışında ve fareler üzerinde canlı içinde incelendiği çalışmayı [116];



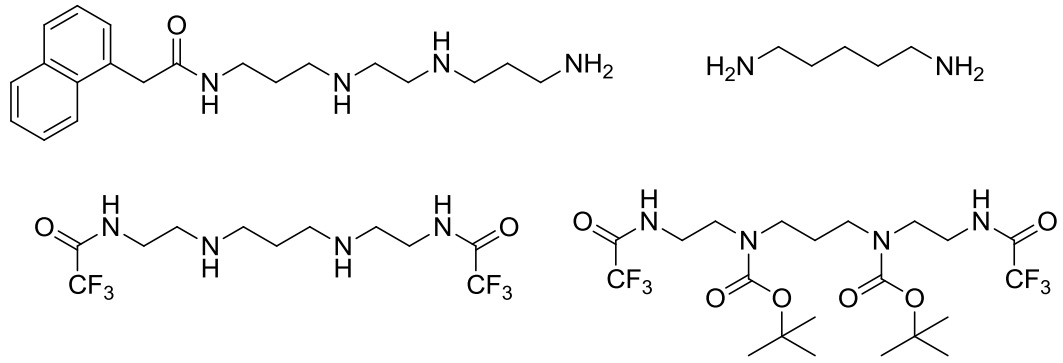
Şekil 2.27 : Huyut ve diğerleri tarafından hCA I ve hCA II inhibisyon etkileri incelenen fenolik bileşikler.

Yamali ve diğerleri tarafından bazı fenolik Mannich bazlarının (Şekil 2.28) karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkilerinin incelendiği çalışmayı [117] örnek verebiliriz.



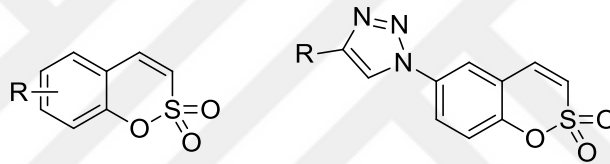
Şekil 2.28 : Yamali ve diğerleri tarafından [112] karbonik anhidraz inhibitörü olarak sentezlenen bazı fenolik Mannich bazları.

Fenollerin dışında bu başlık altında daha önce de belirttiğimiz gibi poliaminleri ve sülfokumarinleri örnek olarak verebiliriz. Poliaminler için Scozzafava ve diğerleri tarafından hCA I-XV inhibisyon aktivitelerinin incelendiği değişik poliamin bileşiklerini (Şekil 2.29) içeren çalışmayı [118];



Şekil 2.29 : Scozzafava ve diğerlerinin çalışmasından karbonik anhidraz inhibisyon aktiviteleri incelenen bazı poliamin örnekleri.

Tars ve diğerlerinin hCA I, hCA II, hCA IX ve hCA XII inhibisyon aktivitelerini inceledikleri ve izoenzimleri seçici olarak inhibe etme potansiyeli olduğunu gösterdikleri bir grup sülfokumarin bileşiğinin (Şekil 2.30) sentezini yapmış oldukları çalışmayı [119] örnek olarak gösterebiliriz.

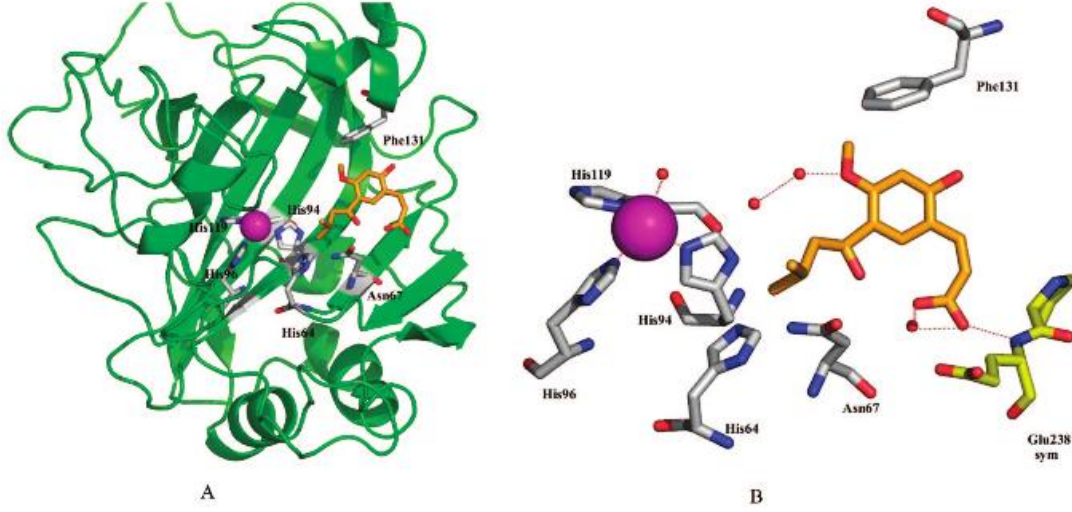


Şekil 2.30 : Tars ve diğerlerinin çalışmasındaki sülfokumarin örnekleri.

2.1.3.3 Enzimin aktif bölgesinin girişini kapatarak inhibe edenler

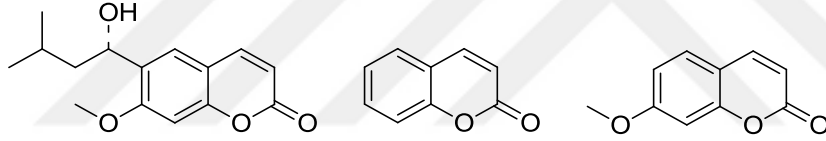
Kumarinler ve izosterikleri olan tiyokumarinler, 2-tiyoksikumarinler, kumarin oksimler, 5- veya 6-üyelı laktonlar ve tiyolaktonlar gibi karbonik anhidraz inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenen bileşiklerin özellikle hCA II enzimiyle etkileşimleri incelendiğinde, bu bileşiklerin karbonik anhidrazın esterez aktivitesi ile hidrolize olarak substitüe-2-hidroksisinamik aside dönüşerek enzimin aktif kısmının girişine bağlandığı ve girişi kapattığı bulunmuştur [5].

Bu maddelerle ilgili yapılan çalışmalara örnek verecek olursak, 2009 yılında Maresca ve diğerlerinin yeni bir karbonik anhidraz inhibitör sınıfı olarak ve inhibisyon mekanizmasında çinko iyonundan bağımsız oldukları kristal yapı analizleriyle ortaya konulan (Şekil 2.31) 3 adet kumarin bileşiğinin (Şekil 2.32) karbonik anhidraz I-XV inhibisyon aktivite çalışmasını [120];



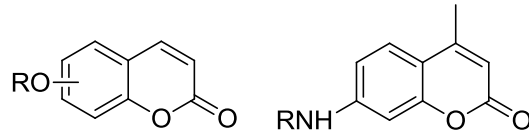
Şekil 2.31 : *cis*-2-Hidroksisinamik asit ile hCA II izoenziminin etkileşimin detaylı gösterimi [120].

Şekil 2.31’de kumarin bileşiğinin hidrolize olarak *cis*-2-hidroksisinamik asit bileşiğine dönüştükten hCA II izoenzimiyle oluşturduğu kompleksin kristal yapısı (A) ve enzimle inhibitör arasındaki etkileşimin detaylı gösterimi (B) görülmektedir.



Şekil 2.32 : Maresca ve diğerleri tarafından çalışılan kumarin bileşikleri.

Carta ve diğerleri tarafından sentezlenen yeni kumarin ve tiyokso-kumarin bileşikleri (Şekil 2.33) ile bunların tümörlerle ilişkili insan karbonik anhidrazı IX ve XII beraberinde hCA I ve hCA II inhibisyon aktivitesinin incelendiği çalışmayı [121];



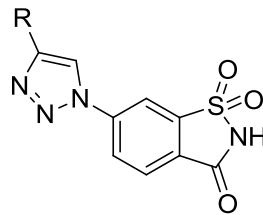
Şekil 2.33 : Carta ve diğerleri tarafından çalışılan kumarin ve tiyokso-kumarin bileşiklerinin genel yapısı.

ve Davis ve diğerleri tarafından 2013 yılında otuza yakın doğal kumarin bileşiğinin insan karbonik anhidraz izoenzimleri CA I, CA II, CA VII, CA IX, CA XII ve CA XIII inhibisyon aktivitelerinin incelendiği çalışmayı [122] verebiliriz örnek olarak verebiliriz.

2.1.3.4 Enzime bilinmeyen bir şekilde bağlananlar

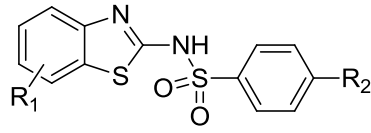
Son zamanlarda sayıları gittikçe artmakta olan bir diğer inhibitör grubu ise sekonder/tersiyer benzensülfonamidler ve imatinib, nilotinib gibi mekanizması henüz bilinmeyen gruplardır. Sekonder/tersiyer benzensülfonamidler α -karbonik anhidraz inhibisyon aktivitesi açısından efektif (mikromolar seviyeden nanomolar seviyeye kadar) ve izoenzim seçici olabilmektedirler [123-125]. Bu bileşikler $\text{SO}_2\text{NRR}'$ üzerinde barındırdığı hacimli gruplar (R, R' : alkil, aril, hetaril vs.) dolayısıyla karbonik anhidrazlardaki katalitik çinko metali iyonuna bağlanamazlar. Çözücü ile etkileşime girecek hetero atom da barındırmadıklarından dolayı, çinko iyonuna koordine su molekülü/hidroksit iyonuna da tutunamayacaklarından bu mekanizma ile de inhibisyon yapamazlar. Kumarin bileşiklerindeki gibi hidroliz olmaları sonucu enzimin aktif kısmının girişine bağlanarak girişi kapatma yoluyla inhibisyon mekanizmasını bu bileşiklerde göz ardı etmemizi gerektirecek bir durum söz konusu değildir fakat bunu destekleyecek molekül-enzim kompleksine ait X-ışını kristal yapısı şimdiye kadar gösterilmediği için mekanizmanın nasıl işlediği henüz bilinmemektedir.

Bu grupta yapılan çalışmalara örnek verecek olursak, 2014 yılına ait Moeker ve diğerlerinin sentezledikleri ve CA I, CA II, CA IX ve CA XII inhibisyon aktivitesini inceledikleri halkalı sekonder sülfonamid bileşiklerine (Şekil 2.34) ait çalışmayı [126];



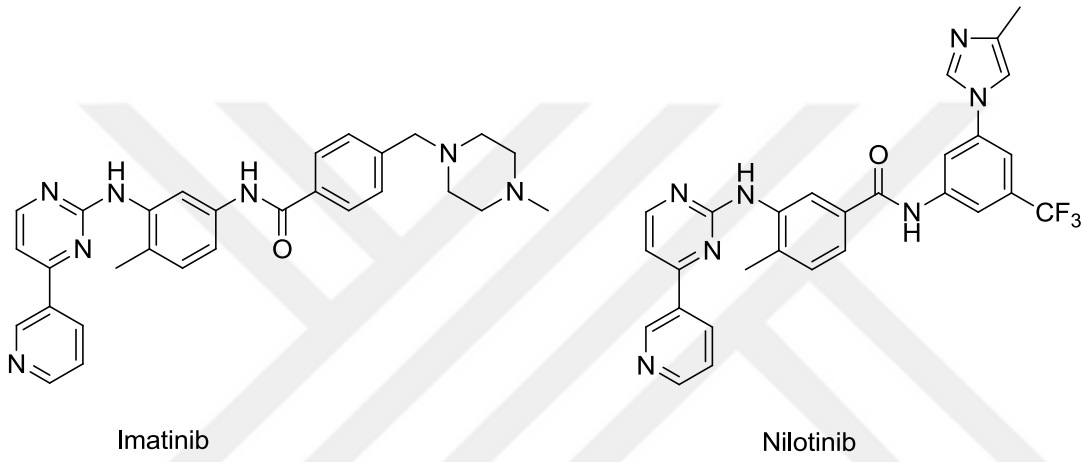
Şekil 2.34 : Moeker ve diğerlerinin sentezledikleri ve CA inhibisyon aktivitesini inceledikleri halkalı sekonder sülfonamid bileşiklerinin genel yapısı.

Petrou ve diğerleri tarafından sentezlenen ve hCA I, II, IX ve XII inhibisyon aktiviteleri incelenen ve benzotiyazol yapısı içeren sekonder sülfonamidlere (Şekil 2.35) ait çalışmayı [127];



Şekil 2.35 : Petrou ve diğerleri tarafından sentezlenen ve CA inhibisyon aktiviteleri incelenen sekonder sülfonamidlerin genel yapısı.

Sekonder/tersiyer sülfonamidlerin dışında aynı zamanda protein tirozin kinaz inhibitörü de olan ve iyi birer karbonik anhidraz inhibitörü oldukları Parkkila ve diğerlerinin yaptığı çalışmayla gösterilmiş [128] imatinib ve nilotinib (Şekil 2.36) gibi bileşikler de bu grup altında verebiliriz.



Şekil 2.36 : Imatinib ve nilotinib bileşiklerinin yapıları

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan 3,4,5-trihidroksibenzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, sülfanilamid, sülfasetamid, sülfatiyazol, sülfadiazin, sülfametazin, sülfapiridin, sülfasokzazol, sülfametizol, sülfamerazin, sülfadimetoksin, sülfakloropiridazin, tiyonil klorür, piridin, aseton, metanol, etanol, etil asetat, n-hekzan, tetrahidrofuran, seryum (IV) sülfat tetrahidrat, hidroklorik asit, sülfürik asit, Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, standart serum albumin, L-tirozin, sodyum hidroksit, sodyum bikarbonat, trihidroksimetilaminometan (Tris), sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, 2-merkaptotanol, brom timol mavisi, glisin, fosforik asit, izopropanol, sodyum barbital, akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, G-250, coomassie brilliant blue R-250, DMSO-d₆ ve silika jel 60 Å (230-400 mesh) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Asetik anhidrit TMO Genel Müdürlüğü Afyon Alkaloidleri fabrikasından temin edilmiştir. İnce tabaka kromatografi tabakaları silika jel-60 F254, Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2 Kullanılan Cihazlar ve Aletler

NMR	: Varian 600 MHz
HR-MS	: BrukerMicrOTOF-Q
HPLC-UV	: Thermo Dionex Ultimate 3000
C, H, N analizi	: Thermo Finnigan Flash 1112 EA
Erime noktası tayini	: Barnstead Electrothermal IA9200
UV-VIS spektrofotometre	: Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86 °C)	: Sanyo, Japan
pH metre	: Hanna Instrument
Hassas terazi	: Mettler Toledo XP205 ve XP56

İnkübatör	: Elektro-Mag (0-300 °C)
Otomatik pipetler	: Biohit, Socorex, Brand, Oxford
Çalkalayıcı	: Nüve SL 350
Vorteks	: Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	: Merck Millipore Q-POD Element
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph
UV-Spektroforometre küveti	: 1 cm ³ 'lük kuartz küvet

3.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

1. 0,2 M NaHCO₃ pH 8,8 : Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan bu tampon 16,8 g NaHCO₃ , 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile titre edilerek pH 8,8 seviyesine getirildikten sonra saf su ile 1 litreye tamamlandı.

2. 25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na₂SO₄ pH 8,7 : Afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan bu tampon, 3,03 g Tris ve 14,20 g Na₂SO₄ , 950 mL saf suda çözülerek 1N HCl ile pH 8,7 seviyesine getirildi ve üzerine saf su eklenilerek 1 litreye tamamlandı.

3. 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ pH 8,7 : Hemolizatın uygulanmasından sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan bu tampon çözelti, 3,03 g Tris ve 3,12 g Na₂SO₄ 950 mL saf suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 8,7 seviyesine getirilerek ve üzerine saf su eklenilerek 1 litreye tamamlanmak suretiyle hazırlandı.

4. 25 mM Na₂HPO₄/ 1 M NaCl pH 6,3 : Kolona tutunmuş hCA I izoenziminin elüsyonu için kullanılan bu tampon çözelti, 2,20 g Na₂HPO₄ ve 14,63 g NaCl 200 mL suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 6,3 seviyesine getirildi ve üzerine saf su eklenerek 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

5. 50 mM Tris-SO₄ pH 7,4 : Esteraz aktivitesinde kullanılan bu tampon çözelti, 6,06 g Tris 950 mL su içerisinde çözüldükten sonra 1 N H₂SO₄ ile pH 7,4 seviyesine getirildi ve üzerine saf su eklenilerek bir litreye tamamlandı.

6. 0,1 M CH₃COONa / 0,5 M NaClO₄ pH 5,6 : Kolona tutunmuş hCA II izoenziminin elüsyonu için kullanılan bu tampon çözelti, 9,19 g NaClO₄ ve 2,04 g CH₃COONa.3H₂O 120 mL saf su içerisinde çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 5,6 seviyesine getirildi ve üzerine saf su eklenilerek toplam 150 mL'ye tamamlandı.

7. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi: Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan bu çözelti, 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml %95'lik etanol içerisinde çözüldü, üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit eklendikten sonra toplam hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

8. SDS-PAGE'de kullanılan bu numune tamponu: 0,65 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 1 ml %10'luk SDS, 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1'lik brom timol mavisi karıştırılarak saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan hemen önce 950 µL tampon üzerine 50 µL β-merkaptoetanol ilave edildi.

9. SDS-PAGE'de kullanılan bu yürütme tamponu: 1,50 g Tris ve 7,20 g glisin 50 mL suda çözüldü, daha sonra bunun üzerine 5 mL %10'luk SDS ilave edilerek toplam hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

10. Elektrovez jelinin boyanması için kullanılan çözelti: %0,1 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

11. Akrilamid-bisakrilamid çözeltisinin hazırlanması: 30,0 g akrilamid ve 800 mg bisakrilamid karışımı 100 mL suda çözüldü.

12. %10'luk SDS çözeltisinin hazırlanması: 10 g SDS 90 g saf su içerisinde çözüldü

13. 3M Tris-HCl (pH 8,8) çözeltisinin hazırlanması: 36,3 g Tris 48 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü ve saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

14. Sabitleştirme çözeltisi: elektrovez jelindeki proteinlerin sabitleştirilmesi için %50 izopropil alkol, % 10 TCA ve %40 saf su olacak şekilde karışım hazırlandı.

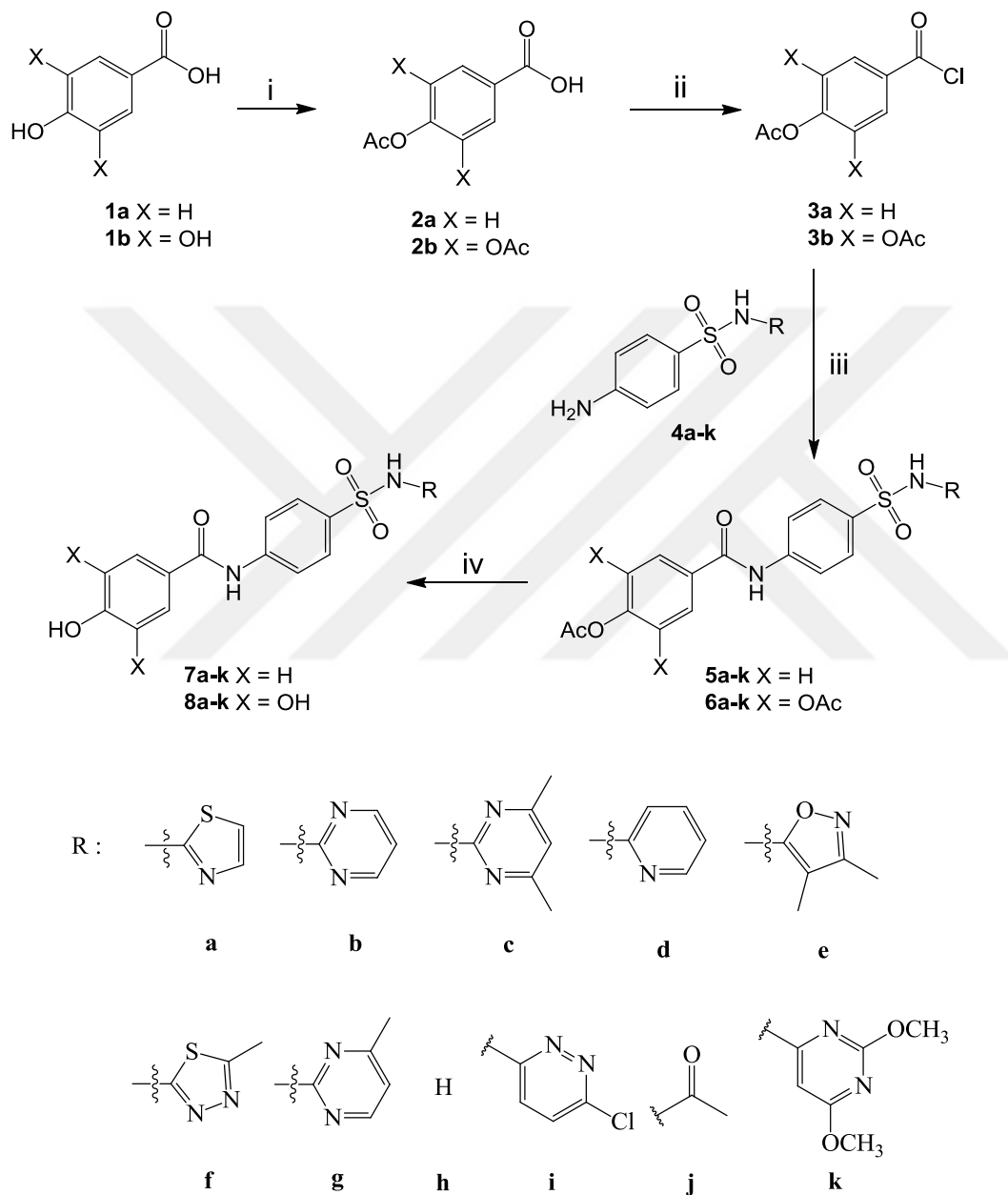
15. Jel yıkama çözeltisinin hazırlanması: %50 metanol, %10 asetik asit ve % 40 saf su olacak şekilde hazırlandı.

16. Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 mL % 10'luk H₂SO₄ içerisinde çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plakalarına püskürteç kullanılarak püskürtüldü.

3.4 Aktivite İncelemesi Yapılacak Sülfonamid Türevlerinin Sentezi

Aktivite çalışması yapılacak sülfonamidlerin sentezine birçok bitki ve meyvede bulunan *p*-hidroksi **1a** ve 3,4,5-trihidroksi **1b** benzoik asitlerle başlanıldı (Şekil 3.1). Asetik anhidrit ile seçimli olarak girdikleri reaksiyonla 4-asetoksi **2a** ve 3,4,5-triasetoksi **2b** benzoik asitler elde edildi, ve bunların da tiyonil kloritle reaksiyonu ile

benzoil klorür **3a,b** bileşikleri elde edildi. Elde edilen benzoil klorür bileşiklerinin antibakteriyel ve başka biyolojik aktiviteler de gösteren sülfonamidlerle **4a-k** girdikleri reaksiyonlar sonucu yeni sülfonamid türevleri, asetoksibenzamidler **5a-i** ve triasetoksibenzamidler **6a-k** bileşikleri sentezlendi. Elde edilen bu ürünleri asidik ortamda deasetilasyonları ile yeni sülfonamid türevleri **7a-i** ve **8a-i** elde edildi.



Reaktifler ve şartlar: (i) Asetik anhidrit, H₂SO₄, 25 °C, 1 saat; (ii) SOCl₂, 80 °C, 5 saat; (iii) sülfonamid, aseton, piridin, 0 °C, 20 saat; (iv) THF, MeOH, HCl, 60 °C, 1 saat.

Şekil 3.1 : Sülfonamidlerin sentezine ait ana şema.

Reaksiyonların ilerlemeler alüminyum ince tabaka plakaları kullanılarak 254 nm dalga boyunda UV-floresans ışığı ile kontrol edildi ve sonrasında üzerine seryum (IV) sülfat boyası spreylenecek ısıtıcıda yakılarak noktalar kontrol edildi. Maddelerin saflaştırılmaları etanol içerisinde kristallendirme yöntemiyle veya n-hekzan/etil asetat çözücüsü kullanılarak dolgu maddesi olarak 60 Å (230-400 mesh) silikanın kullanıldığı kolon kromatografisi ile gerçekleştirildi. ¹H and ¹³C NMR spektrumları 25 °C sıcaklıkta alındı. ¹H and ¹³C NMR spektrumlarında elde edilen kimyasal kaymalar ppm olarak raporlandı ve çözücü olarak kullanılan DMSO-D₆'nın kalıntı solventinin proton için (δ = 2.50 ppm) karbon için (δ = 39.52 ppm) sinyalleri baz alınarak hesaplandı. Sinyal kodlamaları şu şekilde yapıldı: tekli sinyal s (singlet); ikili sinyal d (doublet); üçlü sinyal t (triplet); çoklu sinyal m (multiplet); iki tane ikili sinyal dd (doublet of doublet). Etkileşme sabitleri *J* hertz (Hz) cinsinden raporlandı. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrumları BrukerMicrOTOF-Q cihazında pozitif elektro spre y iyonlaşma (ESI+) modu kullanılarak alındı, hata değeri olarak 5 ppm ve altı kabul kriteri olarak belirlendi. Erime noktaları Barnstead Electrothermal IA9200 cihazında bakıldı. Maddelerin saflıkları Thermo Finnigan Flash 1112 EA Series cihazında C, H, N analizleriyle ve Thermo Dionex HPLC-UV cihazında 270 nm dalga boyunda kontrol edildi, %95 üzeri saflıkta olan maddelere biyolojik aktivite çalışmaları yapıldı.

3.4.1 Hidroksil süstitüe benzoik asitlerin asetillenmesi genel prosedürü

Balon içerisindeki benzoik asit **1** (20 mmol) üzerine asetik anhidrit (120 mmol) eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya başlandı. Karışım üzerine birkaç damla konsantre H₂SO₄ eklendi, karışım sıcaklığında hızlı bir artış gözlemlendi, benzoik aside ait katı tamamen çözündü. Karıştırmaya yüksek devirde 1 saat devam edildi. Sonrasında asetik anhidritin fazlasını uzaklaştırmak için üzerine 100 mL soğuk su eklenerek karıştırmaya 2,5 saat daha devam edildi. Elde edilen beyaz katı süzülerek iki kere 50 mL soğuk su ile yıkandı. 10 dakika hava geçirilerek kurutulduktan sonra elde edilen katı balon içerisine konularak tamamen kuruması için yüksek vakum altında gece boyunca bırakıldı.

p-Asetoksibenzoik asit (2a): Beyaz katı , verim %90. ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ: 2.28 (s, 3H), 7.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H).

3,4,5-Triasetoksibenzoik asit (2b): Beyaz katı , verim %85. ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ: 2.27 (s, 6H), 2.30 (s, 3H), 7.72 (s, 2H).

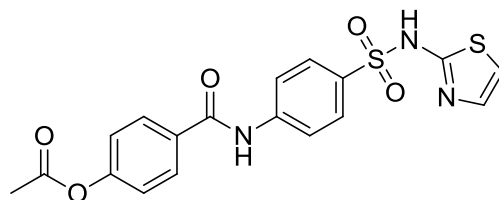
3.4.2 Açıl klorür bileşiklerinin (3) sentezinin genel prosedürü

Yağ banyosundaki balon içerisindeki bir önceki reaksiyonda asetil koruması takılmış benzoik asit bileşikleri **2** (20 mmol) üzerine tiyonil klorür (300 mmol) eklendi ve manyetik karıştırıcıda 80 °C sıcaklıkta geri soğutucu altında 5 saat karıştırıldı. Daha sonra tiyonül klorürün fazlası uzaklaştırıldı. Elde edilen katı 20 mL aseton içerisinde çözülerek herhangi bir saflaştırma yapılmadan bir sonraki reaksiyonda kullanıldı.

3.4.3 N-(sülfonamid)-asetoksibenzamid (5 and 6) sentezinin genel prosedürü

Cam balon içerisine sülfonamid **4** (20 mmol) ve piridin (20 mmol) eklendi, üzerlerine 50 mL aseton eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya başlandı. Karışım buz banyosu kullanılarak soğutuldu ve üzerine bir önceki reaksiyonda elde edilen 20 mL aseton içerisindeki açıl klorür bileşiği **3** damla damla eklenerek karıştırmaya devam edildi, oda sıcaklığına gelen karışım gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.⁵⁴ Reaksiyonun ilerlemesi ince tabaka kromatografisi yöntemiyle kontrol edildi, plakalar 254 nm UV ışığı altında ve sonrasında serik sülfat boyasıyla boyandıktan sonra ısıtılarak kontrol edildi. Reaksiyon sonrasında ürün katı çökelti olarak oluştuysa süzüldü, oluşmadıysa vakum altında çözücü uzaklaştırılarak katı elde edildi. Elde edilen ham madde etanol içerisinde kristallendirilerek veya kolon kromatografisi yöntemiyle n-hekzan/etil asetat (1:1) karışımıyla elüe edilerek saflaştırıldı.

N-(Sülfatiazol)-p-asetoksibenzamid (5a):

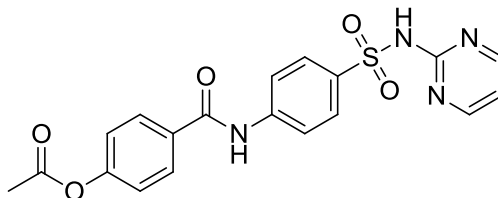


Şekil 3.2 : N-(Sülfatiazol)-p-asetoksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %58. e.n. 267-268 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,57 (s, 1H), 8,00 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,79 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,25 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 2,31

(s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ : 169,27, 165,61, 153,57, 142,79, 137,21, 132,46, 129,79, 127,23, 124,83, 122,36, 120,18, 108,55, 21,33. HRMS (ESI⁺): m/z C₁₈H₁₆N₃O₅S₂ [M+H⁺]: teorik 418,0526, bulunan 418,0526.

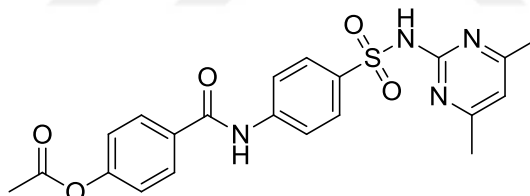
***N*-(Sülfadiazin)-*p*-asetoksibenzamid (5b):**



Şekil 3.3 : *N*-(Sülfadiazin)-*p*-asetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %55. e.n. 269-270 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ : 11,71 (s, 1H), 10,61 (s, 1H), 8,51 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 7,98 (m, 6H), 7,31 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,05 (t, J = 4,8 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ : 169,38, 165,74, 158,79, 157,37, 153,62, 143,55, 134,94, 132,41, 129,82, 129,14, 122,37, 119,95, 116,23, 21,32. HRMS (ESI⁺): m/z C₁₉H₁₆N₄O₅S₁Na₁ [M+Na⁺]: teorik 435,0734, bulunan 435,0738.

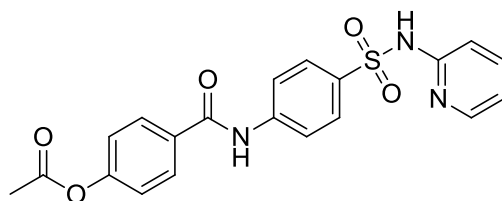
***N*-(Sülfametazin)-*p*-asetoksibenzamid (5c):**



Şekil 3.4 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-asetoksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %62. e.n. 245-246 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ : 10,58 (s, 1H), 8,00 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,98 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,94 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,31 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,26 (s, 6H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ : 169,37, 167,72, 165,66, 157,08, 153,29, 132,41, 130,72, 129,79, 129,54, 122,35, 119,60, 114,19, 112,26, 23,54, 21,31. HRMS (ESI⁺): m/z C₂₁H₂₁N₄O₅S₁ [M+H⁺]: teorik 441,1227, bulunan 441,1214.

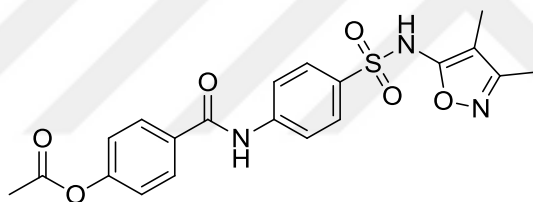
***N*-(Sülfapiridin)-*p*-asetoksibenzamid (5d):**



Şekil 3.5 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-asetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %65. e.n. 259-260 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,57 (s, 1H), 8,03 (d, J = 3,6 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,92 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,75 – 7,68 (m, 1H), 7,31 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,15 (d, J = 8,6 Hz, 1H), 6,88 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,94, 165,23, 153,15, 152,96, 142,55, 140,11, 136,07, 132,00, 129,38, 127,64, 126,63, 121,91, 119,75, 115,78, 113,53, 20,88. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_1$ [M+H $^+$]: teorik 412,0962, bulunan 412,0963.

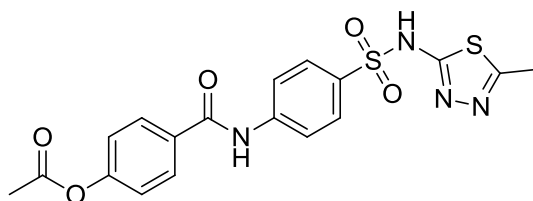
***N*-(Sülfisoksazol)-*p*-asetoksibenzamid (5e):**



Şekil 3.6 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-asetoksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %47. e.n. 221-222 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,68 (s, 1H), 8,02 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 8,00 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,76 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,32 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 2,31 (s, 3H), 2,09 (s, 3H), 1,66 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 169,39, 165,81, 161,86, 155,94, 153,65, 143,95, 134,53, 132,34, 129,86, 128,20, 122,39, 120,42, 105,58, 21,33, 10,77, 6,33. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_1$ [M+H $^+$]: teorik 430,1067, bulunan 430,1066.

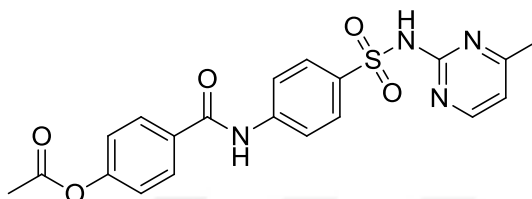
***N*-(Sülfametizol)-*p*-asetoksibenzamid (5f):**



Şekil 3.7 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-asetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %58. e.n. 244-246 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 10,60 (s, 1H), 8,01 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,95 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,78 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,31 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d6) δ: 169,37, 168,24, 165,65, 154,88, 153,60, 143,11, 136,74, 132,40, 129,80, 127,20, 122,36, 120,30, 21,32, 16,50. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₈H₁₇N₄O₅S₂ [M+H⁺]: teorik 433,0635, bulunan 433,0636.

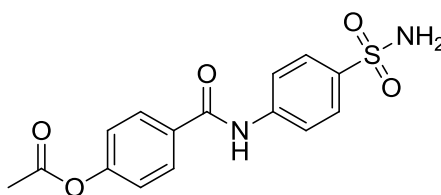
***N*-(Sülfamerazin)-*p*-asetoksibenzamid (5g):**



Şekil 3.8 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-asetoksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %62. e.n. 260-261 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 11,61 (s, 1H), 10,60 (s, 1H), 8,33 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8,00 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,98 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,95 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H), 7,31 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 6,91 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 2,33 (s, 3H), 2,31 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d6) δ: 169,39, 169,02, 165,71, 157,49, 156,98, 153,61, 143,43, 135,12, 132,41, 129,81, 129,34, 122,36, 119,80, 115,28, 23,69, 21,30. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₉H₁₉N₃O₈S₁ [M+H⁺]: teorik 449,0887, bulunan 449,0890.

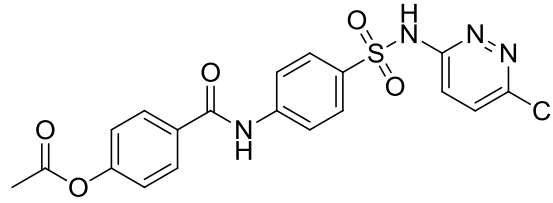
***N*-(Sülfanilamid)-*p*-asetoksibenzamid (5h):**



Şekil 3.9 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-asetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %55. e.n. 251-252 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ: 10,58 (s, 1H), 8,03 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,95 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,82 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,32 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,28 (s, 2H), 2,32 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d6) δ: 169,38, 165,61, 153,58, 142,51, 139,20, 132,44, 129,79, 126,96, 122,36, 120,22, 21,32. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₅H₁₅N₂O₅S₁ [M+H⁺]: teorik 335,0696, bulunan 335,0694.

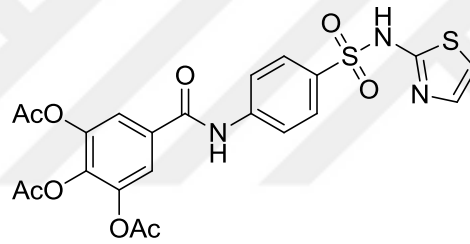
***N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-asetoksibenzamid (5i):**



Şekil 3.10 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-asetoksibenzamid.

Sarımtırak katı, verim %45. e.n. 235-236 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,63 (s, 1H), 8,00 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,97 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,91 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,78 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 7,57 (broad, 1H), 7,31 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 2,31 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 168,97, 165,30, 154,27, 153,22, 143,30, 131,95, 131,64, 129,42, 128,06, 122,60, 122,03, 119,85, 20,90. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₉H₁₅ClN₄O₅SNa [M+Na⁺]: teorik 469,0344, bulunan 469,0342.

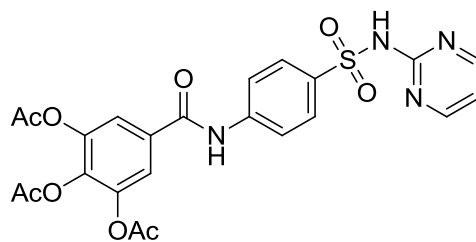
***N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6a):**



Şekil 3.11 : *N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Sarımtırak katı , verim %50. e.n. 177-178 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,71 (s, 1H), 10,63 (s, 1H), 7,90 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,82 (s, 2H), 7,80 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,25 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,32 (s, 6H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 168,75, 168,03, 166,97, 163,54, 143,17, 141,98, 137,58, 137,15, 132,48, 126,84, 124,42, 120,72, 120,00, 108,17, 20,33, 19,89. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₂H₂₀N₃O₉S₂ [M+H⁺]: teorik 534,0635, bulunan 534,0641.

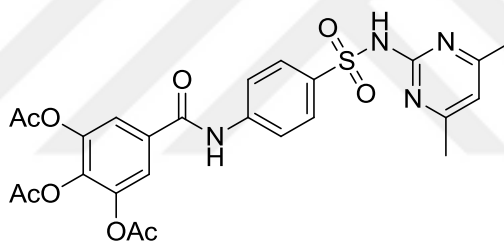
***N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6b):**



Şekil 3.12 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %40. e.n. 207-208 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,64 (s, 1H), 8,48 (d, *J* = 4,8 Hz, 2H), 7,95 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,90 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,79 (s, 2H), 7,02 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,29 (s, 6H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 168,43, 167,37, 164,08, 158,79, 157,33, 143,58, 143,13, 138,03, 135,30, 132,84, 129,13, 121,15, 120,16, 116,23, 20,73, 20,29. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₃H₂₁N₄O₉S₁ [M+H⁺]: teorik 529,1024, bulunan 529,1015.

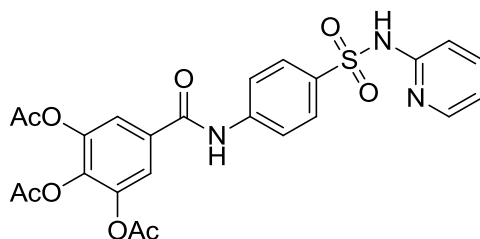
***N*-(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6c):**



Şekil 3.13 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %48. e.n. 236-238 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,62 (s, 1H), 7,97 (d, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 8,9, 2,6 Hz, 2H), 7,80 (s, 2H), 6,72 (s, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,30 (s, 6H), 2,22 (s, 6H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 169,16, 168,43, 167,38, 164,01, 156,60, 143,58, 142,81, 139,52, 138,01, 135,80, 132,86, 129,55, 121,14, 119,80, 23,27, 21,45, 20,28. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₅H₂₅N₄O₉S₁ [M+H⁺]: teorik 557,1337, bulunan 557,1336.

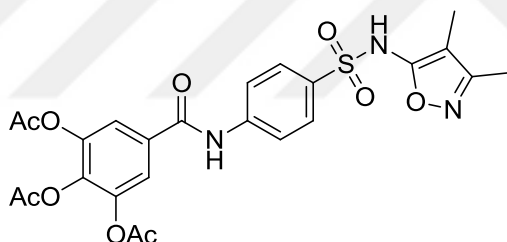
***N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6d):**



Şekil 3.14 : *N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %62. e.n. 213-214 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,61 (s, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,90 – 7,82 (m, 4H), 7,79 (s, 2H), 7,70 (dd, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,85 (dd, *J* = 6,3 Hz, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,30 (s, 6H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 168,44, 167,38, 164,01, 153,47, 143,89, 143,58, 142,53, 140,66, 138,00, 136,94, 132,89, 128,07, 121,13, 120,38, 116,14, 114,04, 20,73, 20,28. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₄H₂₂N₃O₉S₁ [M+H⁺]: teorik 528,1071, bulunan 528,1068.

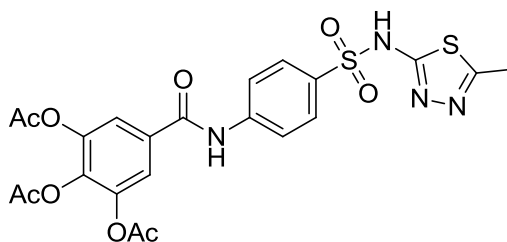
***N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6e):**



Şekil 3.15 : *N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %54. e.n. 147-148 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,72 (s, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,82 (s, 2H), 7,75 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 2,33 (s, 3H), 2,31 (s, 6H), 2,07 (s, 3H), 1,63 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 168,02, 166,96, 163,74, 161,43, 155,51, 143,17, 143,13, 137,65, 134,48, 132,38, 127,80, 120,79, 120,21, 105,14, 20,33, 19,89, 10,35, 5,90. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₄H₂₃N₃O₁₀SNa [M+Na⁺]: teorik 568,0996, bulunan 568,0997.

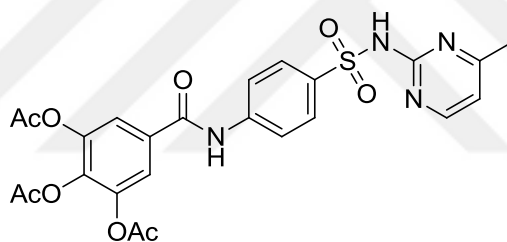
***N*-(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6f):**



Şekil 3.16 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Sarımtırak katı , verim %40. e.n. 225-226 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,68 (s, 1H), 7,93 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,84 (s, 2H), 7,80 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 2,47 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 2,33 (s, 6H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,08, 167,92, 167,02, 163,62, 154,57, 143,21, 142,34, 137,65, 136,70, 132,45, 126,85, 120,79, 120,17, 20,36, 19,92, 16,12. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: teorik 571,0564, bulunan 571,0564.

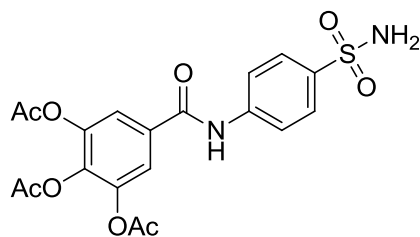
***N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6g):**



Şekil 3.17 : *N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Sarımtırak katı , verim %42. e.n. 234-236 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10,66 (s, 1H), 8,33 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,99 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,93 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,82 (s, 2H), 6,91 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H), 2,33 (s, 6H), 2,32 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,26, 168,00, 166,95, 163,63, 157,53, 156,56, 143,17, 142,61, 137,61, 135,08, 132,45, 128,93, 120,75, 119,58, 114,85, 23,25, 20,31, 19,87. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_1$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 543,1180, bulunan 543,1180.

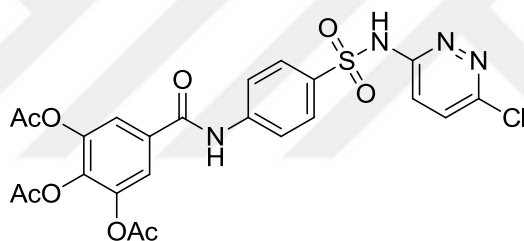
***N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6h):**



Şekil 3.18 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Beyaz katı , verim %54. e.n. 222-223 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ : 10,61 (s, 1H), 7,89 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,81 (s, 2H), 7,79 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,26 (s, 2H), 2,32 (s, 3H), 2,30 (s, 6H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,02, 166,96, 163,53, 143,17, 141,69, 139,09, 137,57, 132,45, 126,57, 120,71, 120,02, 20,33, 19,88. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_1\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: teorik 473,0625, bulunan 473,0625.

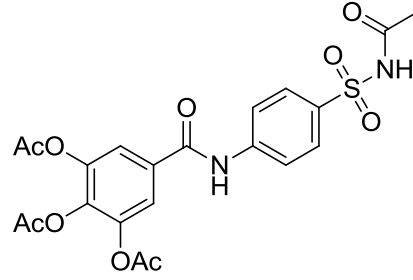
***N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6i):**



Şekil 3.19 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Sarımtırak katı, verim %35, e.n. 242-243 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,67 (s, 1H), 7,93-7,89 (m, 4H), 7,80 (s, 2H), 7,76 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 7,50 (broad, 1H), 2,32 (s, 3H), 2,30 (s, 6H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,84, 168,12, 167,06, 163,76, 154,32, 150,50, 145,50, 143,24, 139,16, 137,71, 132,45, 128,10, 120,83, 120,15, 119,99, 20,39, 19,94. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{ClN}_4\text{O}_9\text{S}_1$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 563,0634, bulunan 563,0640.

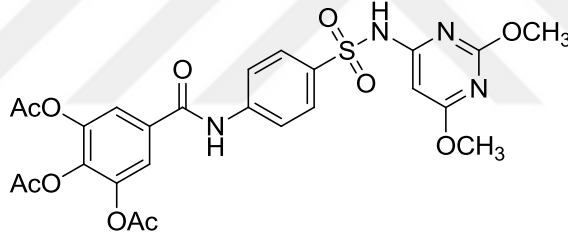
***N*-(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6j):**



Şekil 3.20 : *N*-(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

Kirli beyaz, verim %43. e.n. 220-221 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,01 (s, 1H), 10,72 (s, 1H), 7,96 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,89 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,82 (s, 2H), 2,33 (s, 3H), 2,31 (s, 6H), 1,90 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 169,14, 168,46, 167,39, 164,14, 143,79, 143,61, 138,10, 134,17, 132,78, 129,19, 121,23, 120,33, 23,65, 20,77, 20,32. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₁H₂₁N₂O₁₀S [M+H⁺]: teorik 493,0911, bulunan 493,0927.

***N*-(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid (6k):**



Şekil 3.21 : *N*-(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid.

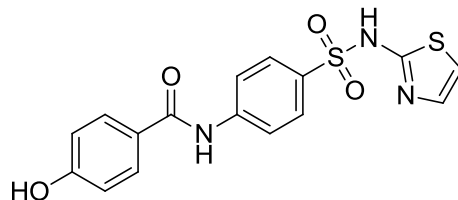
Beyaz katı, verim %57. e.n. 197-198 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,71 (s, 1H), 7,98 – 7,93 (m, 4H), 7,82 (s, 2H), 5,96 (s, 1H), 3,80 (s, 3H), 3,77 (s, 3H), 2,35 (s, 3H), 2,33 (s, 6H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 172,11, 168,42, 167,37, 164,69, 164,13, 160,31, 143,59, 143,48, 138,07, 134,78, 132,80, 128,79, 121,18, 120,47, 85,02, 54,97, 54,24, 20,72, 20,28. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₂₅H₂₅N₄O₁₁S₁ [M+H⁺]: teorik 589,1235, bulunan 589,1235.

3.4.4 *N*-(sülfonamid)-hidroksibenzamid (7 and 8) bileşiklerinin genel sentezi

Balon içerisindeki asetil koruması bulunduran *N*-(sülfonamid)-asetoksibenzamid 5 veya 6 bileşiği (1 g) üzerine 10 mL tetrahidrofuran, 10 mL metanol ve 5 mL konsantre hidroklorik asit eklendi. Su banyosunda 60 °C’de bir saat karıştırıldı.

Çözücüler vakum altında uzaklaştırıldı ve elde edilen katı etanolde kristallendirilerek veya silika dolgulu kolon kromatografisi yöntemiyle n-hekzan/etil asetat (1:1) karışımıyla elüe edilerek saflaştırıldı.

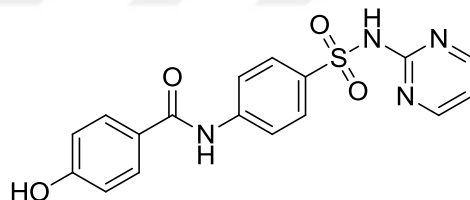
***N*-(sülfatiazol)-*p*-hidroksibenzamid (7a).**



Şekil 3.22 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-hidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %48. e.n. 293-294 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,68 (s, 1H), 10,28 (s, 1H), 10,16 (s, 1H), 7,91 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,86 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,76 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,24 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,81 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 169,16, 165,85, 161,30, 143,19, 136,75, 130,35, 127,15, 125,33, 124,77, 120,02, 115,42, 108,48. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₆H₁₄N₃O₄S₂ [M+H⁺]: teorik 376,0420, bulunan 376,0419.

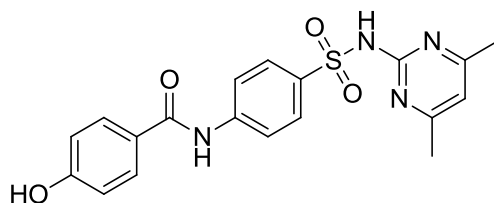
***N*-(Sülfadiazin)-*p*-hidroksibenzamid (7b).**



Şekil 3.23 : *N*-(Sülfadiazin)-*p*-hidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %44. e.n. 298-299 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,33 (s, 1H), 8,51 (d, *J* = 4,9 Hz, 2H), 7,94 (s, 4H), 7,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,04 (t, *J* = 4,9 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 165,96, 161,37, 158,77, 157,38, 143,96, 134,42, 130,39, 129,05, 125,24, 119,79, 116,21, 115,43. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₇H₁₅N₄O₄S₁ [M+H⁺]: teorik 371,0809, bulunan 371,0817.

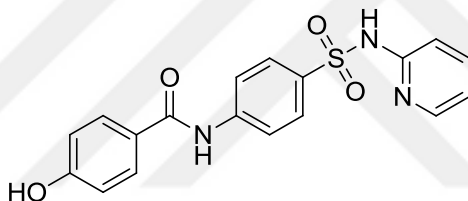
***N*-(Sülfametazin)-*p*-hidroksibenzamid (7c).**



Şekil 3.24 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-hidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %48. e.n. 162-163 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,31 (s, 1H), 7,95 (q, *J* = 9,0 Hz, 4H), 7,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,88 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 6,76 (s, 1H), 2,26 (s, 6H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 167,79, 165,90, 161,34, 156,67, 143,66, 134,84, 130,36, 129,46, 125,25, 119,45, 115,42, 114,01, 23,33. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₉H₁₉N₄O₄S₁ [M+H⁺]: teorik 399,1122, bulunan 399,1123.

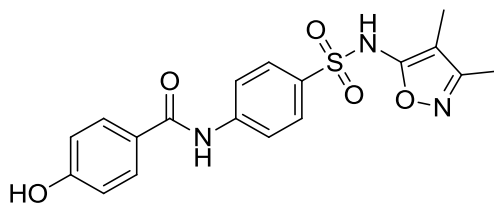
***N*-(Sülfapiridin)-*p*-hidroksibenzamid (7d).**



Şekil 3.25 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-hidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %50. e.n. 282-283 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,29 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,91 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,84 (two doublets, 4H), 7,71 (d, 1H), 7,14 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,87 (3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 165,45, 160,93, 152,85, 143,94, 142,98, 140,02, 135,45, 129,91, 127,54, 124,76, 119,57, 115,42, 114,96, 113,43. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₈H₁₆N₃O₄S₁ teorik [M+H⁺]: 370,0856, bulunan 370,0856.

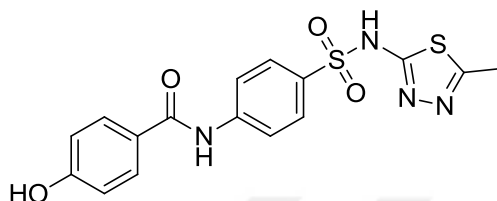
***N*-(Sülfisoksazol)-*p*-hidroksibenzamid (7e).**



Şekil 3.26 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-hidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %41. e.n. 235-236 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,92 (s, 1H), 10,39 (s, 1H), 10,19 (s, 1H), 7,99 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,88 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,65 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 166,02, 161,84, 161,42, 156,01, 144,37, 134,05, 130,44, 128,12, 125,19, 120,25, 115,46, 105,52, 10,77, 6,32. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{SNa}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: teorik 410,0781, bulunan 410,0781.

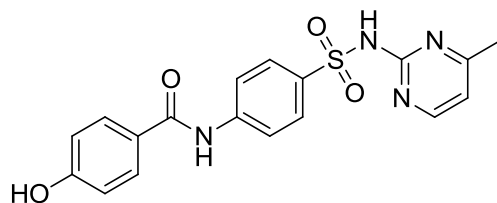
***N*-(Sülfametizol)-*p*-hidroksibenzamid (7f).**



Şekil 3.27 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-hidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %39. e.n. 272-273 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,29 (s, 1H), 10,14 (s, 1H), 7,91 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,84 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 2,45 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,20, 165,89, 161,34, 154,85, 143,54, 136,26, 130,38, 127,13, 125,27, 120,14, 115,43, 16,51. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 391,0529, bulunan 391,0530.

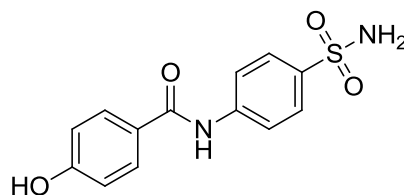
***N*-(Sülfamerazin)-*p*-hidroksibenzamid (7g).**



Şekil 3.28 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-hidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %50. e.n. 271-272 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,36 (s, 1H), 8,33 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,95 (s, 4H), 7,89 – 7,86 (m, 2H), 6,91 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 6,90 – 6,87 (m, 2H), 2,32 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,65, 165,93, 161,40, 157,96, 157,00, 143,86, 134,56, 130,38, 129,22, 125,17, 119,65, 115,44, 115,35, 23,70. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 385,0965, bulunan 385,0965.

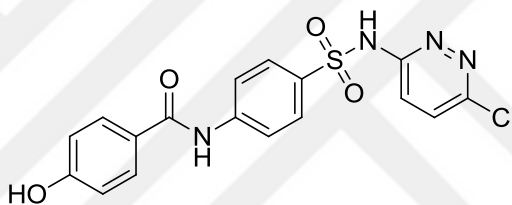
***N*-(Sülfanilamid)-*p*-hidroksibenzamid (7h).**



Şekil 3.29 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-hidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %47. e.n. 308-309 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,30 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 7,95 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H), 7,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,80 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,26 (s, 2H), 6,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 165,52, 160,93, 142,56, 138,34, 129,99, 126,54, 124,96, 119,73, 115,08. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₃H₁₃N₂O₄S₁ [M+H⁺]: teorik 293,0591, bulunan 293,0594.

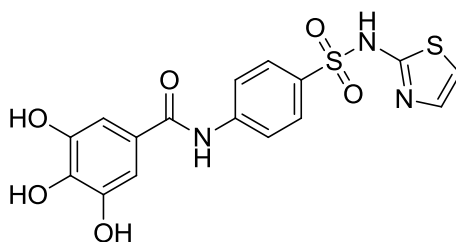
***N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-hidroksibenzamid (7i):**



Şekil 3.30 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-hidroksibenzamid.

Sarımtırak katı, verim 35%, e.n. 161-162 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,34 (s, 1H), 10,18 (s, 1H), 7,96 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,89-7,84 (m, 4H), 7,78 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H), 7,52 (broad, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 165,50, 160,91, 154,22, 143,79, 132,36, 129,95, 128,02, 124,78, 119,67, 115,01. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₇H₁₃ClN₄O₄SN_a [M+Na⁺]: teorik 427,0238, bulunan 427,0237.

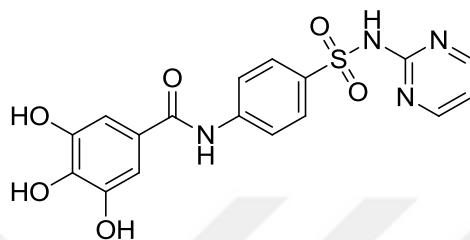
***N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8a).**



Şekil 3.31 : *N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %50. e.n. 289-290 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ : 10,19 (s, 1H), 7,88 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,72 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,22 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,94 (s, 2H), 6,79 (d, J = 4,6 Hz, 1H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d6) δ : 169,07, 166,31, 145,96, 143,30, 137,59, 136,54, 127,09, 124,84, 124,87, 119,95, 108,50, 107,85. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 408,0319, bulunan 408,0315.

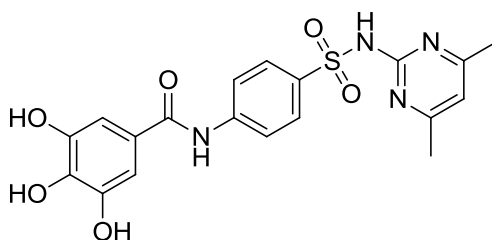
***N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8b).**



Şekil 3.32 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %43. e.n. 244-245 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ : 10,26 (s, 1H), 8,50 (d, J = 4,9 Hz, 2H), 7,96 – 7,89 (m, 4H), 7,04 (t, J = 4,9 Hz, 1H), 6,96 (s, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d6) δ : 166,41, 158,77, 157,36, 145,97, 144,06, 137,67, 134,25, 128,98, 124,77, 119,72, 116,21, 107,89. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 403,0707, bulunan 403,0707.

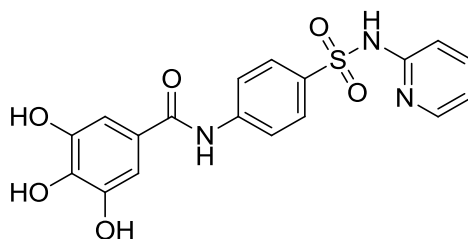
***N*-(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8c).**



Şekil 3.33 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %35. e.n. 270.5-271.5 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ : 10,23 (s, 1H), 7,96 – 7,89 (m, 4H), 6,96 (s, 2H), 6,75 (s, 1H), 2,25 (s, 6H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d6) δ : 167,47, 166,02, 156,29, 145,63, 143,43, 137,30, 134,30, 129,07, 124,45, 119,03, 113,68, 107,52, 22,99. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 431,1020, bulunan 431,1026.

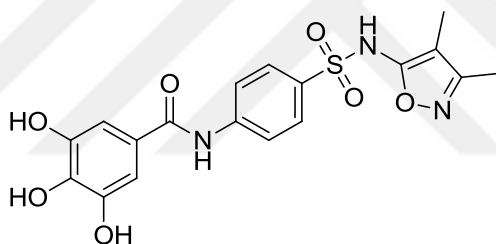
***N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8d).**



Şekil 3.34 : *N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %48. e.n. 268-269 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,21 (s, 1H), 8,04 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 7,92 – 7,88 (m, 2H), 7,85 – 7,80 (m, 2H), 7,71 (ddd, $J = 8,9, 7,3, 1,9$ Hz, 1H), 7,15 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 6,96 (s, 2H), 6,91 – 6,86 (m, 1H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 166,35, 153,26, 145,97, 143,53, 140,47, 137,63, 135,73, 129,22, 127,98, 124,83, 119,92, 116,40, 113,86, 107,83. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_1$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 402,0754, bulunan 402,0754.

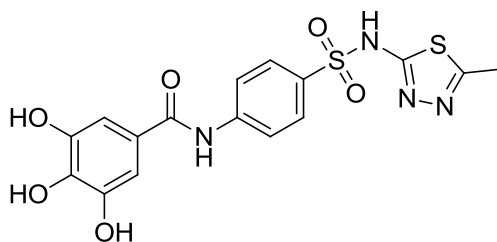
***N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8e).**



Şekil 3.35 : *N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %57. e.n. 252-253 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,93 (s, 1H), 10,32 (s, 1H), 7,98 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 7,71 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H), 6,99 (s, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,66 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 166,45, 161,84, 156,01, 145,98, 144,48, 137,75, 133,90, 128,07, 124,68, 120,15, 107,85, 105,49, 10,77, 6,32. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7\text{SNa}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: teorik 442,0679, bulunan 442,0675.

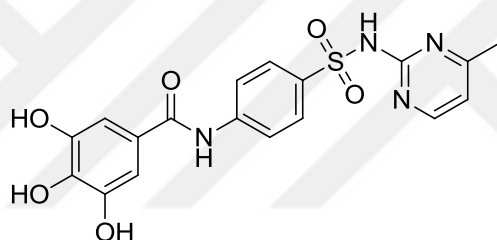
***N*-(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8f).**



Şekil 3.36 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Kirli beyaz katı , verim %62. e.n. 177-178 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,23 (s, 1H), 7,92 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 7,73 (d, J = 8,9 Hz, 2H), 6,96 (s, 2H), 2,46 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 167,82, 165,98, 154,49, 145,57, 143,26, 137,27, 135,69, 126,71, 124,40, 119,69, 107,41, 16,13. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}^+$]: teorik 445,0247, bulunan 445,0249.

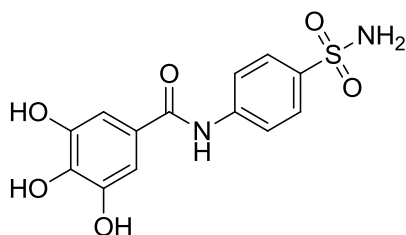
***N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8g).**



Şekil 3.37 : *N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %54. e.n. 214-215 °C. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 10,24 (s, 1H), 8,31 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,92 (s, 4H), 6,97 (s, 2H), 6,89 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 2,31 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168,39, 166,09, 157,63, 156,66, 145,67, 143,63, 137,36, 134,09, 128,89, 124,46, 119,28, 114,99, 107,58, 23,40. HRMS (ESI $^+$): m/z $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_1$ [$\text{M}+\text{H}^+$]: teorik 417,0863, bulunan 417,0862.

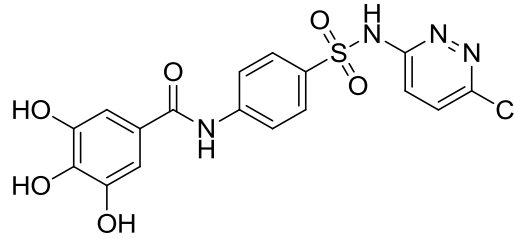
***N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8h).**



Şekil 3.38 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Beyaz katı , verim %40. e.n. 307-308 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,22 (s, 1H), 7,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,77 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,25 (s, 2H), 6,99 (s, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 166,00, 145,63, 142,69, 138,22, 137,27, 126,52, 124,53, 119,66, 107,48. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₃H₁₃N₂O₆S₁ [M+H⁺]: teorik 325,0489, bulunan 325,0477.

***N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid (8i):**



Şekil 3.39 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid.

Sarımtırak katı, verim %40, e.n. 175-176 °C. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,27 (s, 1H), 8,90 (s, 1H), 7,94 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,86 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 7,78 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H), 6,95 (s, 2H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 166,37, 154,62, 146,00, 145,13, 137,65, 131,36, 128,40, 124,69, 120,00, 119,50, 107,80. HRMS (ESI⁺): *m/z* C₁₇H₁₃ClN₄O₆SN_a [M+Na⁺]: teorik 459,0137, bulunan 459,0134.

3.5 Enzim Saflaştırma Çalışmaları

3.5.1 CA enzim hemolizatının hazırlanması:

Daha önceden alınarak deneylerde kullanılıncaya kadar +4 °C’de saklanılan taze kan örnekleri 2500 g değerinde 15 dakika boyunca santrifüj edildi ve üst fazdaki plazma ve lökosit tabakası damlalıkla alındı. Santrifüj tüpünün alt kısmında kalan eritrosit peleti 154 mM NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra tekrar yukarıda bahsedildiği gibi santrifüj edildi ve bu yıkama işlemi toplamda üç kere yapıldı. İşlemler sonunda elde edilen eritrositler toplam hacimlerinin yaklaşık beş katı kadar buzlu su ile hemoliz edildi. +4 °C’de 20.000 g değerinde otuz dakika santrifüj yapılarak hemolizat içindeki eritrosit hücre zarları uzaklaştırıldı. Hemolizatın üst bölümü dikkatli bir şekilde alınarak çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı [27].

3.5.2 CA enziminin afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılması

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

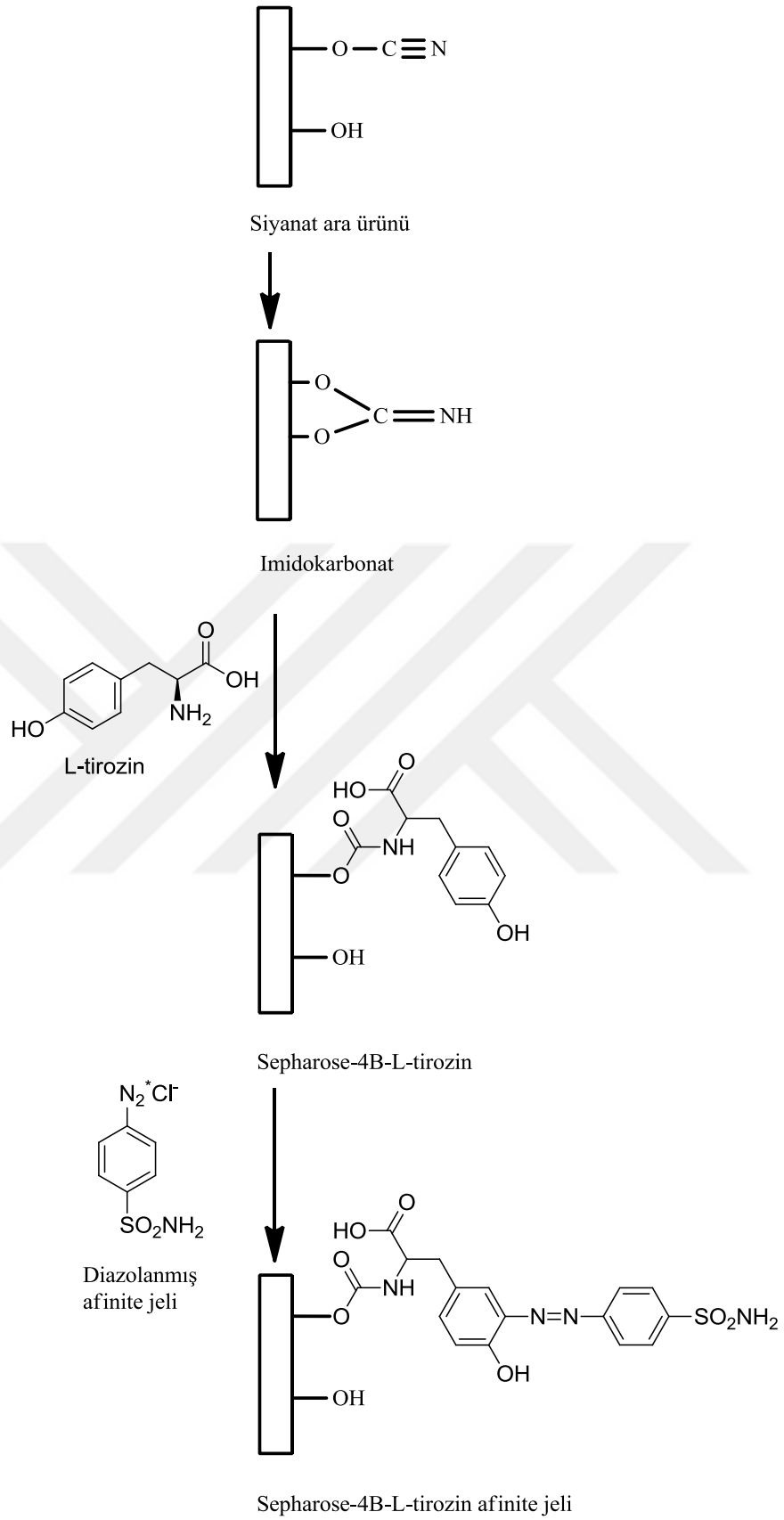
Siyanür bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B matriksine L-tirozin kovalent bağ ile bağlandıktan sonra sülfanilamid diazollama işlemiyle tirozine kenetlendi. Burada yapılan işlem afinite jelinin uzantı kolu olan L-tirozine bağlı karbonik anhidrazın spesifik inhibitörü olan sülfanilamid ile enzimi kolon içerisinde tutarak ve sonrasında çözeltiler vasıtasıyla elüe edilerek yüksek oranda saflaştırmaktır.

3.5.2.2 CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye tirozin bağlanması

Sepharose-4B 250 mL soğuk 0,1 M sodyum bikarbonat NaHCO_3 tamponu (pH 10) ile yıkanarak bir behere alındı. 20 mL aynı tampon çözeltisi kullanılarak içerisinde 80 mg L-tirozin çözünmüş bir diğer çözelti de behere eklenerek yaklaşık 90 saniye cam baget yardımıyla karıştırıldı ve elde edilen süspansiyon manyetik karıştırıcı yardımıyla $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2 saat karıştırıldıktan sonra 16 saat $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildi. Daha sonra reaksiyona girmeyen tirozinin uzaklaştırılması için su ile yıkama işlemi yapıldı, yıkama işlemine yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. Daha sonra 100 mL 0,2 M NaHCO_3 tamponu (pH 8,8) ile elüsyon yapılarak tirozin takılı jel, 40 mL tampon (aynı tampon) içerisine alındı.

3.5.2.3 Sülfanilamidin tirozine kenetlendirilmesi

$0\text{ }^\circ\text{C}$ 'deki 10 mL 1 M HCl çözeltisi içerisinde 25 mg sülfanilamid çözöldü ve üzerine damla damla $0\text{ }^\circ\text{C}$ 'deki 5 mL içerisinde 75 mg NaNO_2 bulunduran çözelti eklendi. 10 dakikalık reaksiyon süresiyle diazolanmış sülfanilamid, yukarıda elde ettiğimiz 40 mL Sepharose-4B-L-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. 1 M sodyum hidroksit çözeltisi yardımıyla pH 9,5 seviyesine çıkarılıp sabit tutuldu ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonrasında bir litre saf su ve 200 mL 50 mM Tris- SO_4 tamponuyla (pH 7,4) yıkandıktan sonra üzerine aynı tampondan eklenerek saklandı [27]. Şekil 3.40'da tüm basamaklar açıkça gösterilmiştir.



Şekil 3.40 : Sepharose-4B-L tirozin afinite jelinin hazırlanma basamakları.

3.5.2.4 Afinite kolonunun paketlenmesi

Tris-HCl (pH 7,8) dengeleme tamponu içerisinde alınarak süspanse edilen jelin su trombu kullanılarak vakumla havası alındı. Süspanse edilen jel, 1x10 cm'lik kapalı sistemden oluşan soğutmalı kolona paketlenmiştir. Çöken jel daha sonra peristaltik pompa yardımıyla yıkama ve dengeleme tamponuyla yıkandı. Kolonun dengeye geldiği 280 nm dalga boyunda eluat ile tamponun absorbanslarının ve her ikisinin pH değerlerinin eşitlenmesinden anlaşılmıştır.

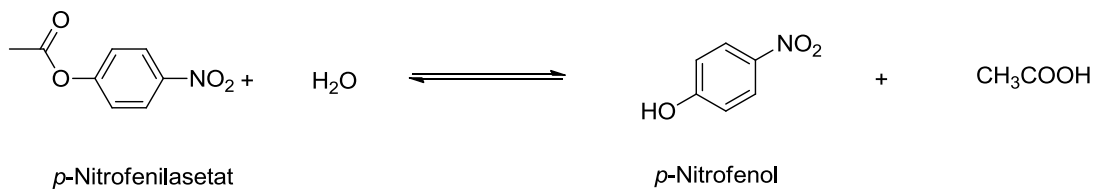
3.5.2.5 Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüe edilmesi

Katı Tris kullanılarak pH 8,7'ye ayarlanan hemolizatın kolona uygulanması sonrasında 400 mL 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ (pH 8,7) çözeltisi kullanılarak kolon yıkandı ve böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutturulup, safsızlıklar yıkama ile uzaklaştırıldı. Sonrasında hCA I enzimini elüe etmek için 1 M NaCl / 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,3), hCA II enzimini elüe etmek için ise 100 mM NaCH₃COO⁻ / 0,5 M NaClO₄ (pH 5,6) kullanıldı. Akış hızı 20 mL/saat'e ayarlanan peristaltik pompa ile elüatlar 5'er mL halinde tüplere alınarak 280 nm dalga boyundaki absorbanslarına bakıldı.

3.5.3 CA enzim aktivitesi tayini

Karbonik anhidraz enzim aktivitesi için metotlardan biri esteraz aktivitesi bir diğeri ise hidrataz aktivitesidir. Hidrataz aktivitesi yöntemi karbondioksitin (CO₂) hidrasyonu ile açığa çıkan H⁺ iyonu sonucu oluşan pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip arada geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanır.

Bu çalışmada da kullanılan esteraz aktivitesinde ise *p*-nitrofenil asetatın karbonik anhidraz enzimi ile 348 nm dalga boyunda absorpsiyon veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolata hidrolizi (Şekil 3.41) yöntemine dayanmaktadır.



Şekil 3.41 : *p*-Nitrofenil asetatın *p*-nitrofenole dönüşüm mekanizması.

Fenol grubundaki proton iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir çünkü *p*-nitrofenolat ve *p*-nitrofenol'ün her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir [27]. 348 nm'de *p*-nitrofenilasetatın çok az absorbansı olduğundan kör olarak kullanılmaktadır.

Kullanılan kuvarz küvetlerin hacmine göre aşağıdaki tablolarda verilen miktarlarda karışımlar hazırlandı.

Çizelge 3.1 : 3 mL'lik kuvarz küvet için karışım oranları.

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (μL)	Numune Tüpü (μL)
0,5 M Tris-SO ₄ (pH 7,4)	1400	1400
<i>p</i> -Nitrofenil asetat	1000	1000
Saf su	600	500
Enzim Çözeltilisi	-	100
Toplam Hacim	3000	3000

Çizelge 3.2 : 1 mL'lik kuvarz küvet için karışım oranları.

Kullanılan Maddeler	Kontrol Tüpü (Kör) (μL)	Numune Tüpü (μL)
0,5 M Tris-SO ₄ (pH 7,4)	467	467
<i>p</i> -Nitrofenolasetat	333	333
Saf su	200	167
Enzim Çözeltilisi	-	33
Toplam Hacim	1000	1000

Tablodaki reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra her 15 saniyede bir 25 °C'de 348 nm dalga boyundaki absorbans ölçümleri yapıldı ve 3 dakika sonundaki absorbans değeri belirlenerek farkı alındı. İçerisinde enzim yerine saf su bulunduran karışımın (kör örnek) 3 dakika sonundaki absorbansı ile spektrofotometre sıfırlandı.

Bu deneylerde kullanılan *p*-nitrofenilasetat çözeltisi günlük olarak 27,2 mg esterin 1 mL aseton içerisinde çözüldükten sonra hızlıca karışmakta olan 49 mL su içerisine yavaş yavaş ilave edilmesiyle hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu 3 mM olup, esterin çözünürlüğü dolayısıyla daha derişğini hazırlamak mümkün değildir. Aseton, diğer organik çözücülerle karşılaştırıldığında hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğundan tercih edilmiştir [27].

3.5.4 Protein tayini

3.5.4.1 Kalitatif protein tayini

Proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozin 280 nm’de maksimum absorbands gösterir ve kalitatif protein tayini bu esasa dayanmaktadır [27]. Kromatografi işlemlerinde fraksiyon toplayıcısı yardımıyla eşit miktarda alınan bütün fraksiyonlara bu yöntemin uygulanması ile kalitatif protein tayini yapıldı. Elde edilen fraksiyonlar kuvarz küvetlere konularak, kör numuneye karşı absorbandsları belirlendi.

3.5.4.2 Kantitatif protein tayini

Bu yöntem, proteine Coomassie Brilliant Blue G-250’nin bağlanması sonucu oluşan kompleksin 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermesi temeline dayanır. Afinite kromatografi yöntemiyle saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve hemolizattaki protein miktarları bu yöntem kullanılarak belirlendi. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır [27].

Tayin işlemlerinde 1 mL içerisinde 1 mg protein bulunduran standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20 ,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ve 100 µL alındı. Saf su kullanılarak tüplerin hacmi 100 µL’ye tamamlandı ve üzerine 5 mL renklendirme reaktifi ilave edilerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. 10 dakika sonra 3 mL’lik kuvarz küvetlere konularak köre karşı 595 nm’deki absorbandsları belirlendi.

Kör olarak 100 µL aynı tampon ve 5 mL renklendirme reaktifinden oluşan karışım kullanılarak absorbands değerlerine karşılık gelen µg protein değerlerinin grafiği oluşturuldu. Protein tayini yapılacak numunelerde de aynı yöntem kullanılarak daha önceden elde edilen grafik yardımıyla miktar tayini yapıldı.

3.5.5 Karbonik anhidraz enzimi için yapılan kinetik çalışmalar

3.5.5.1 Enzim için K_m ve V_{max} değerlerinin bulunması ile ilgili çalışmalar

İnsan kanındaki eritrosit hücrelerinden saflaştırılarak elde edilen karbonik anhidraz enzimlerinin (hCA I ve hCA II) K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için beş farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak optimum şartlarda aktivite ölçümleri yapıldı.

Elde edilen değerlerden Lineweaver-Burk grafiği çizilerek elde edilen grafikten K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır.

3.5.5.2 SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü

Enzimin saflaştırılmasından sonra SDS-PAGE tekniği kullanılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [27]. Örnekler jele yüklenmeden önce %1 SDS ve %10'luk 2-merkaptoetanol ile etkileşime girdirilerek beş dakika kaynar su banyosunda bekletilmiş ve numunenin %20 ayırma jelinde elektroforezinden sonra boyama yapılarak bantlar tespit edilmiştir [27].



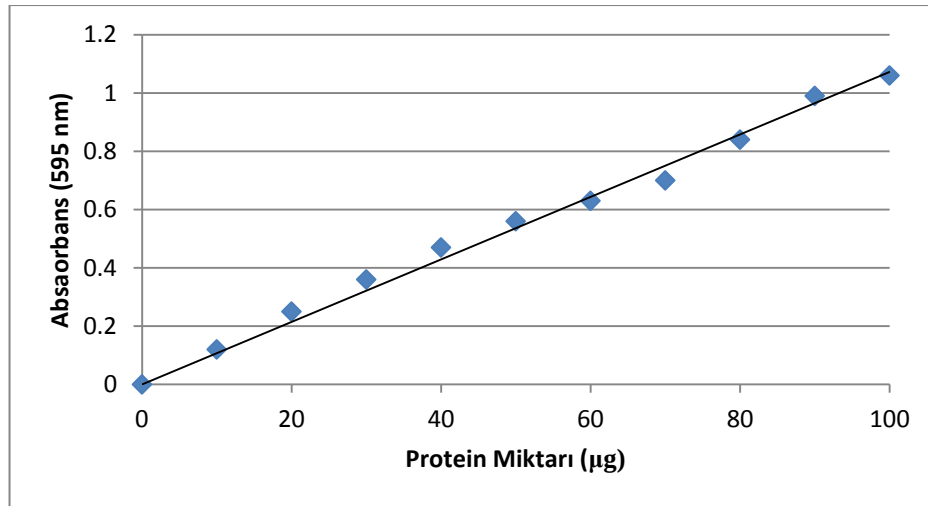


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen sekonder sülfonamid bileşiklerinin hücre dışında yapılan karbonik anhidraz inhibisyon aktivite çalışmaları bu bölümde verilmiştir.

Aktivite değerleri genelde K_i veya IC_{50} değerleri ile belirtilir, burada K_i değerindeki “i” inhibisyonu ifade etmektedir ve K_i değeri molekülün inhibisyon katsayısıdır. IC_{50} değeri ise ilgili enzimin %50’sini inhibe etmek için gerekli olan molekül miktarının konsantrasyon değeridir.

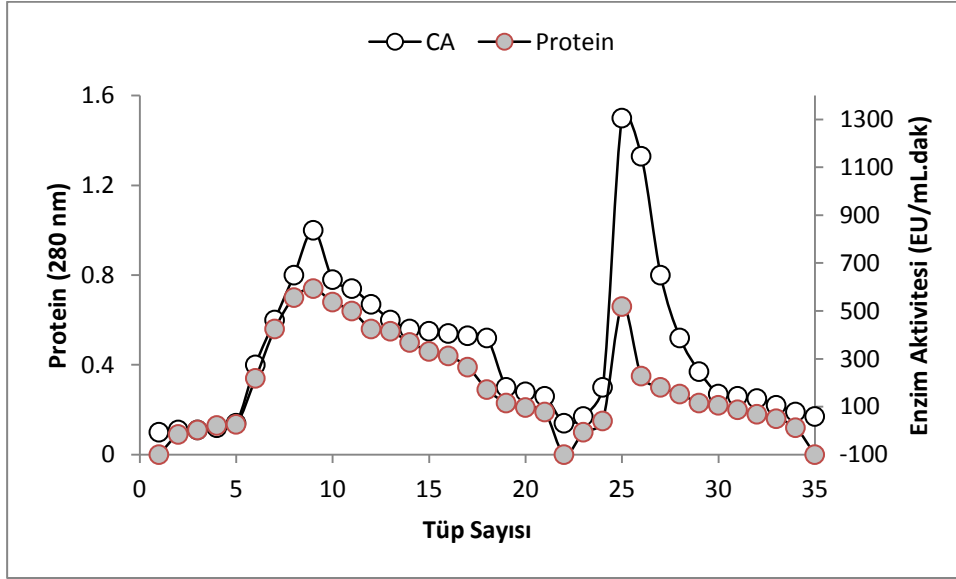
Protein miktarını hesap edilebilmesi için Bradford metodu olarak da bilinen Coomassie Brilliant Blue yöntemi kullanılmıştır, bunun için protein miktarına karşılık spektroskopik yöntemle 595 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeri grafiğe geçirilerek standart eğri hazırlanmıştır (Şekil 4.1). Buradan elde edilen denklemden, insan kanıyla hazırlanan hemolizat ve saflaştırılan enzim çözeltisindeki kantitatif protein miktarları hesaplanmıştır (R^2 : 0,992)



Şekil 4.1 : Bradford yöntemiyle protein tayininde kullanılan standart grafik.

İnsan kanındaki eritrositlerden elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflaştırma işlemleri Sepharose-4B-L tirozin afinite jel kolonu kullanılarak, bölüm 3.5.2.3’de anlatıldığı şekilde her bir izoenzim için ayrı ayrı olacak şekilde yapılmıştır. Fraksiyonlar, fraksiyon toplayıcı yardımıyla tüplere 3'er mL olacak

şekilde toplanmıştır ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerlerine bakılmıştır. Absorbans gösteren fraksiyonların CO₂ hidrataz aktivitesine bakılmıştır. Örnek bir aktivite-absorbans grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2).



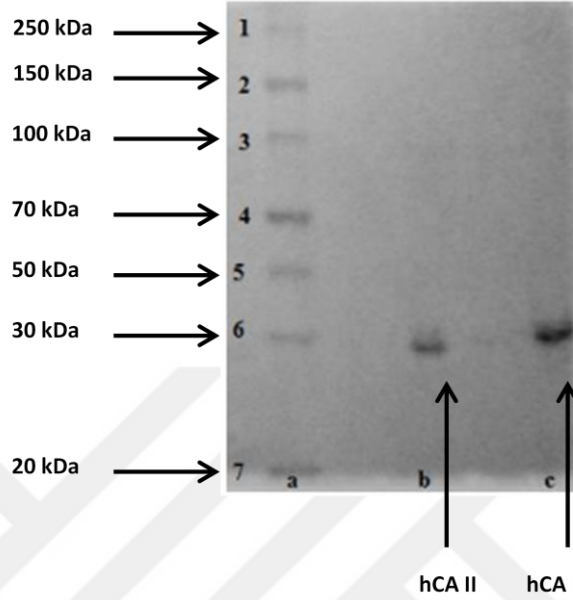
Şekil 4.2: Karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırma işlemi sonrası yapılan aktivite-absorbans ölçümlerinin grafiği.

İnsan kanından elde edilen hemolizattan ve saf enzimden alınan 1'er mL örnekle CO₂ hidrataz aktivitesi ve Coomassie Brilliant Blue yöntemiyle protein miktarı tayini yapılmış ve afinite kolonu uygulaması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplanmıştır, bu işleme ait sonuçlar aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 : Afinite kolonu uygulaması sonucu saflaştırma katsayısı.

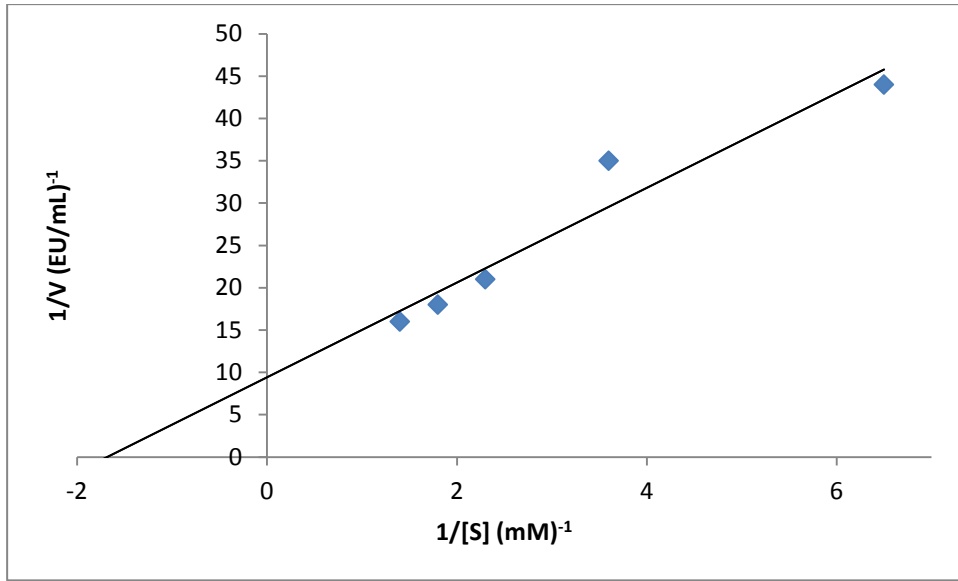
Numune Türü	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Hacim	Protein (mg/mL)	Toplam Protein	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (EÜ/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Hemolizat	1453	26	41	1077	37775	35	100	1
Sepharose-4B-L tirozin sülfanilamid	CA I 1552	10	0,18	1,80	15518	8621	41	246
afinite kolon kromatografisi	CA II 3211	6	0,14	0,84	19265	22935	51	654

Saflaştırılan hCA I ve hCA II izoenzimlerinin saflığı bölüm 3.5.5.2’de anlatıldığı gibi SDS-poliakrilamit jel elektrofezi yöntemiyle, işaretleyici olarak molekül ağırlığı belirli protein standartları kullanılarak kontrol edilmiştir. Protein bantlarının fotoğrafı aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3).

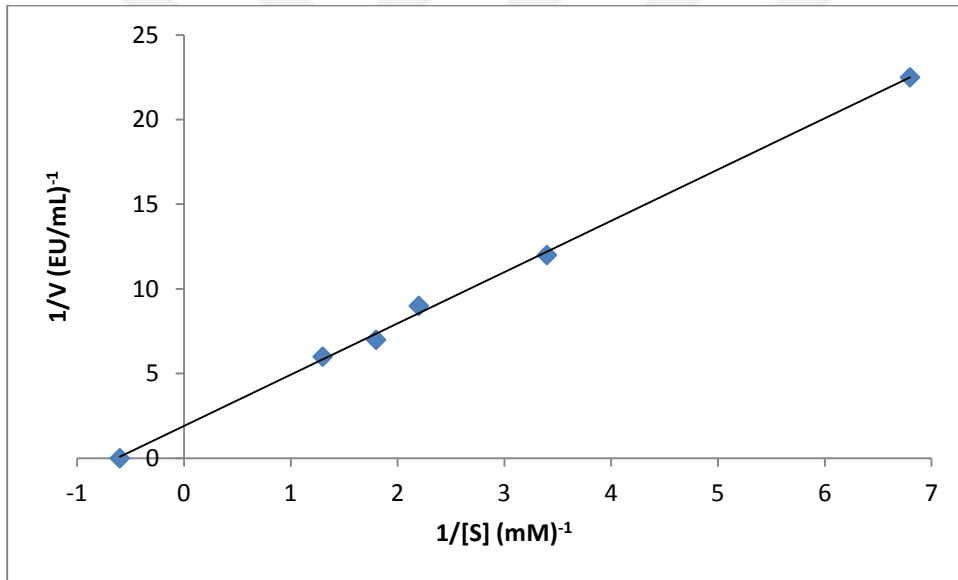


Şekil 4.3 : SDS-poliakrilamit jel elektrofezi fotoğrafı. (a): Standart proteinler; (b): hCA II; (c): hCA I.

Optimum koşullarda 5 farklı substrat konsantrasyonu kullanılarak CA izoenzimleri için aktivite ölçümleri yapılmış ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek hCA I ve hCA II izoenzimleri için K_m (Michaelis sabiti) ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. CA izoenzimlerine ait Lineweaver-Burk grafikleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4 : Afinite kromatografisi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA I izoenzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.5 : Afinite kromatografisi ile insan eritrositlerinden saflaştırılan hCA II izoenzimine ait Lineweaver-Burk grafiği.

Sentezlediğimiz tüm maddeler ve başlangıç ürünleri için hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon aktiviteleri esteraz aktivite tayin yöntemiyle yapılmıştır ve aktivite (%)-[I] ve K_i grafikleri çizilmiştir, çizilen grafiklerden her bir madde için K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 : Sentezlenen maddelerin hCA I ve hCA II aktivite sonuçları.

Bileşik Adı	IC ₅₀ (nM)				K _i (nM)		
	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II	hCA II/ hCA I	hCA I OH/Ac	hCA II OH/Ac
Sülfatiazol (4a)	77	77	137	118	0.87		
<i>N</i> -Sülfatiazol- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5a)	18	16	13	9	0.70	2.20	5.84
<i>N</i> -Sülfatiazol-3,4,5-triasetoksibenzamid (6a)	22	11	12	9	0.75	2.16	7.11
<i>N</i> -Sülfatiazol- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7a)	32	50	28	52	1.85		
<i>N</i> -Sülfatiazol-3,4,5-trihidroksibenzamid (8a)	36	43	26	65	2.46		
Sülfadiazin (4b)	77	87	47	107	2.29		
<i>N</i> -Sülfadiazin- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5b)	8	41	6	39	6.38	4.44	1.74
<i>N</i> -Sülfadiazin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6b)	16	10	12	7	0.62	5.31	19.99
<i>N</i> -Sülfadiazin- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7b)	41	63	27	69	2.50		
<i>N</i> -Sülfadiazin-3,4,5-trihidroksibenzamid (8b)	50	63	63	147	2.34		
Sülfametazin (4c)	36	116	23	134	5.85		
<i>N</i> -Sülfametazin- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5c)	9	48	7	138	19.68	1.34	0.12
<i>N</i> -Sülfametazin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6c)	12	9	12	6	0.46	2.19	7.80
<i>N</i> -Sülfametazin- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7c)	11	44	9	17	1.80		
<i>N</i> -Sülfametazin-3,4,5-trihidroksibenzamid (8c)	28	50	27	45	1.65		
Sülfapiridin (4d)	35	20	24	15	0.61		
<i>N</i> -Sülfapiridin- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5d)	12	53	7	19	2.56	0.35	1.97
<i>N</i> -Sülfapiridin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6d)	18	10	16	8	0.53	0.44	4.39
<i>N</i> -Sülfapiridin- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7d)	8	43	3	38	14.39		
<i>N</i> -Sülfapiridin-3,4,5-trihidroksibenzamid (8d)	9	41	7	36	5.28		
Sülfisoksazol (4e)	58	77	60	211	3.50		
<i>N</i> -Sülfisoksazol- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5e)	7	40	5	25	5.22	1.53	3.08

Çizelge 4.2 (devam) : Sentezlenen maddelerin hCA I ve hCA II aktivite sonuçları.

Bileşik Adı	IC ₅₀ (nM)				K _i (nM)		
	hCA I	hCA II	hCA I	hCA II	hCA II/ hCA I	hCA I OH/Ac	hCA II OH/Ac
<i>N</i> -Sülfisoksazol-3,4,5-triasetoksibenzamid (6e)	24	8	15	10	0.69	0.39	3.85
<i>N</i> -Sülfisoksazol- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7e)	10	48	7	77	10.51		
<i>N</i> -Sülfisoksazol-3,4,5-trihidroksibenzamid (8e)	5	41	6	39	6.85		
Sülfametizol (4f)	17	87	19	31	1.65		
<i>N</i> -Sülfametizol- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5f)	9	24	9	30	3.22	0.84	2.35
<i>N</i> -Sülfametizol-3,4,5-triasetoksibenzamid (6f)	7	50	3	23	8.22	1.71	3.44
<i>N</i> -Sülfametizol- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7f)	10	34	8	70	8.98		
<i>N</i> -Sülfametizol-3,4,5-trihidroksibenzamid (8f)	7	30	5	78	16.60		
Sülfamerazin (4g)	18	14	11	27	2.38		
<i>N</i> -Sülfamerazin- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5g)	13	39	14	65	4.57	0.42	0.29
<i>N</i> -Sülfamerazin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6g)	5	21	4	17	4.73	3.07	2.58
<i>N</i> -Sülfamerazin- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7g)	14	21	6	19	3.16		
<i>N</i> -Sülfamerazin-3,4,5-trihidroksibenzamid (8g)	8	36	11	45	3.98		
Sülfanilamid (4h)	25	101	21	120	5.79		
<i>N</i> -Sülfanilamid- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5h)	13	17	14	34	2.50	0.30	1.53
<i>N</i> -Sülfanilamid-3,4,5-triasetoksibenzamid (6h)	12	12	12	15	1.28	1.17	0.56
<i>N</i> -Sülfanilamid- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7h)	7	53	4	52	12.84		
<i>N</i> -Sülfanilamid-3,4,5-trihidroksibenzamid (8h)	12	13	6	16	2.51		
Sülfakloropiridazin (4i)	1253	751	5259	361	0.07		
<i>N</i> -Sülfakloropiridazin- <i>p</i> -asetoksibenzamid (5i)	10	47	8	87	11.14	7.13	0.56
<i>N</i> -Sülfakloropiridazin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6i)	16	52	8	65	8.03	2.48	0.15

Çizelge 4.2 (devam) : Sentezlenen maddelerin hCA I ve hCA II aktivite sonuçları.

Bileşik Adı	IC ₅₀ (nM)				K _i (nM)		
	hCA	hCA	hCA	hCA	hCA II/	hCA I	hCA II
	I	II	I	II	hCA I	OH/Ac	OH/Ac
<i>N</i> -Sülfakloropiridazin- <i>p</i> -hidroksibenzamid (7i)	35	50	56	49	0.87		
<i>N</i> -Sülfakloropiridazin-3,4,5-trihidroksibenzamid (8i)	9	37	9	47	5.25		
Sülfasetamid (4j)	1563	1471	1820	2040	1.12		
<i>N</i> -sülfasetamid-3,4,5-triasetoksibenzamid (6j)	28	11	21	7	0.34		
Sülfadimetoksin (4k)	63	139	76	107	1.40		
<i>N</i> -sülfadimetoksin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6k)	14	10	14	8	0.62		
<i>p</i> -Asetoksibenzoik asit (2a)	53	32	39	41	1.06		
3,4,5-Triasetoksibenzoik asit (2b)	46	99	58	105	1.81		
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit (1a)	46	58	36	38	1.06		
3,4,5-Trihidroksibenzoik asit (1b)	58	32	32	38	1.19		
AZA*	22	15	20	10	0.49		

*: Asetazolamid



5. SONUÇLAR

Yapılan çalışmada tıp dünyasında ayrıcalıklı gruplar içerisinde kabul edilen “SO₂” grubu içeren ve insanlarda kemoterapik tedavi çağını açan sülfonamidlerle, çoğu bitkide doğal olarak oluşan ve birçok gıda ve içeceklerde bulunan, gerek bitkilerdeki fizyolojik önemi gerek yapılan çalışmalarla insan sağlığına faydalı etkileri ortaya konulmuş polifenolik bileşiklerden *p*-hidroksibenzoik asit ve 3,4,5-trihidroksi benzoik asit tek bir molekülde birleştirilmiştir. Yapılan sentezlerle 4 farklı grupta tiyazol, pirimidin, piridin, izosakzazol, tiyadiazol, kloropiridazin molekülleri içeren yeni sekonder sülfonamid bileşikleri elde edilmiştir. Bu bileşiklerin insan kanındaki eritrositlerden Sepharose-4B-L-tirozin afinite kromatografisi ile saflaştırılarak elde edilen hCA I ve hCA II izoenzimlerinin *in vitro* inhibisyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Sentez şemasındaki son üründen bir önceki basamakta yer alan asetil grubu içeren bileşiklerin de (5a-i ve 6a-k) aktivite çalışması yapılmıştır. Tıp dünyasında hidroksi gruplarının asetillenerek korunması, ilacın biyoemilimini artırarak kan dolaşımındaki konsantrasyonunun artırılması farmasötik endüstride yaygın olarak başvurulmuş bir durumdur, bu tür ilaçlara ön-ilaç denmektedir. Bu ön-ilaçlar kan dolaşımına girdikten sonra karboksilesteraz enzimleriyle asetil grubunu kaybederek hidroksil haline dönmektedir.

Bölüm 4’de verilen maddelere ait K_i tablosu incelendiğinde sentezlenen maddelerin nM seviyede etkili olduğu, dolayısıyla iyi birer hCA I ve hCA II inhibitörü olduğu söylenebilir. Ürünlerin yapı-aktivite ilişkisine bakacak olursak, elde edilen sonuçlardan moleküllerdeki fonksiyonel gruplarla aktivite arasında herhangi bir ilişki gözlenmemiştir. Yeni sentezlenen maddeler başlangıç primer sülfonamid molekülleriyle karşılaştırıldığında genellikle daha iyi inhibisyon aktivitesi göstermişlerdir. Ürünleri hidroksi grubu ve asetoksi grubuna göre değerlendirecek olursak burada da herhangi bir yapı-aktivite eğilimi gözlenmemiştir. Ürünlerden bazıları klinik olarak karbonik anhidraz inhibitörü amacıyla kullanılan asetazolamid bileşiğinden daha iyi inhibisyon aktivitesi göstermiştir. En iyi hCA I inhibitörü olarak *N*-sülfapiridin-*p*-hidroksibenzamid (7d) bileşiği (2,62 nM), en iyi hCA II inhibitörü olarak da *N*-sülfapiridin-3,4,5-triasetoksibenzamid (6c) bileşiği (5,74 nM)

öne çıkmaktadır. İnsanlarda 15 adet karbonik anhidraz izoenzimi bulunduğundan bunların seçimli olarak inhibe edilmesi önem arz etmektedir, aksi halde bunlar ilaç yan etkisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Burada çalışılan izoenzimler hCA I ve hCA II laboratuvar şartlarında kararlı oldukları ve kolay çalışılabilirdiklerinden dolayı bu aşamada sadece bunların inhibisyon çalışmaları yapılabilmektedir. Sentezlenen yeni moleküllerin kanserle ilişkili olan izoenzimlerden hCA IX ve hCA XII inhibisyon aktiviteleri bu aşamada incelenememiştir ama burada elde ettiğimiz nM seviyedeki sonuçlar bizim için birer umut ışığı olmuştur. Sentezlemiş olduğumuz ürünler aynı zamanda Wang ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmadaki ürünlerle yapısal benzerlik göstermektedir [129] bu da bu moleküllerin aynı zamanda iyi birer HIV-1 integras inhibitörü de olabileceğini göstermektedir.

Sentezlediğimiz ürünlerin, enzim-molekül kompleksine ait kristal yapısı çalışmaları yapılmadığı için şu aşamada bölüm 2.1.3'de bahsetmiş olduğumuz inhibisyon mekanizmalarından hangisi ile inhibe ettiklerine dair elimizde bilgi bulunmamaktadır. Sentezlediğimiz sülfonamidler primer değil sekonder olduklarından bölüm 2.1.3'de bahsettiğimiz ilk grup olan sülfonamidlere uymamaktadır, hidroksil grubu içeren moleküllerin fenollerle benzer bir yol izlemesi mümkün ama asetil grubuyla korunanlarda bu da mümkün gözükmemektedir, bu durumda elimizde kumarinlerdeki gibi enzimin aktif bölgesini kapatarak inhibe etme şıkkı veya henüz bu konuda yapılan çalışma olmadığı için inhibisyon mekanizması bilinmeyenler grubuna dahil olmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] **Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M.** (1993). *Principles of Biochemistry*. New York, NY.: Worth Publishers.
- [2] **Şehitoğlu, M. H.** (2012). *Bazı fenolik doğal bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi*. (Doktora Tezi). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [3] **Roughton, F. J. W., Booth, V. H.** (1946). The effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem J.*, 40, 319-330.
- [4] **Saito, R., Sato, T., Ikai, A., Tanaka, N.** (2004). Structure of bovine carbonic anhydrase II at 1.95 Å resolution. *Acta Cryst., D60*, 792-795.
- [5] **Supuran, C. T., De Simone, G.** (2015). *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts*. Waltham, MA.: Elsevier.
- [6] **Supuran, C. T.** (2011). Carbonic anhydrase inhibitors and activators for novel therapeutic applications. *Future Med. Chem.*, 3(9), 1165-1180.
- [7] **Supuran, C. T.** (2016). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 345-360.
- [8] **Supuran, C. T.** (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 168-181.
- [9] **Neri, D., Supuran, C. T.** (2011). Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 767-777.
- [10] **Capasso, C., Supuran, C. T.** (2015). An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria?. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30, 325-332.
- [11] **Supuran, C. T., Capasso, C.** (2015). The η-class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert Opin Ther Targets*, 19, 551-563.
- [12] **Supuran, C. T.** (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27, 759-772.
- [13] **Supuran, C. T.** (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 20, 3467-3474.
- [14] **Pasterokova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran, C. T.** (2004). Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 19, 199-229.

- [15] **Vullo, D., De Luca, V., Del Prete, S., Carnigale, V., Scozzafava, A., Capasso, C., Supuran, C. T.** (2015). Sulfonamide inhibition studies of the γ -carbonic anhydrase from the Antarctic cyanobacterium *Nostoc commune*. *Bioorg Med Chem*, 23, 1728-1734.
- [16] **Del Prete, S., Vullo, D., De Luca, V., Supuran, C. T. & Capasso, C.** (2014). Biochemical characterization of the δ -carbonic anhydases from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*, TweCA. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 29, 906-911.
- [17] **Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., De Simoe, G.** (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *Chem Rev*, 112, 4421-4468.
- [18] **Innocenti, A., Supuran, C. T.** (2010). Paraoxon, 4-nitrophenyl phosphate and acetate are substrates of α - but not of β -, γ -, and ζ -carbonic anhydases. *Bioorg Med Chem Lett*, 20, 6208-6212.
- [19] **De Simoe, G., Alterio, V., Supuran, C. T.** (2013). Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*, 8, 793-810.
- [20] **Nocentini, A., Ferraroni, M., Carta, F., Ceruso, M., Gratteri, P., Lanzi, C., Masini, E., Supuran, C. T.** (2016). Benzenesulfonamides incorporating flexible triazole moieties are highly effective carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and kinetic, crystallographic, computational, and intraocular pressure lowering investigations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, 10692-10704.
- [21] **Smith, K. S., Jakubzick, C., Whittam, T. S., Ferry, J. G.** (1999). Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 15184-15189.
- [22] **Alterio, V., Langella, E., Viparelli, F., Vullo, D., Ascione, G., Dathan, N. A. et al.** (2012). Structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CdCA1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie*, 94, 1232-1241.
- [23] **Xu, Y., Feng, L., Jeffrey, P. D., Shi, Y., Morel, F. M.** (2008). Structure and metal exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature*, 452, 56-61.
- [24] **Gümüş, M.** (2008). *Yeni karbonik anhidraz inhibitörleri sentezi ve in Vitro inhibitör aktivitelerinin incelenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- [25] **Iverson, T. M., Alber, B. E., Kisker, C., Ferry, J. G., Rees, D. C.** (2000). A closer look at the active site of gamma-class carbonic anhydases: high resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcinothermophila*. *Biochemistry*, 39, 9222-9231.
- [26] **Carta, F., Maresca, A., Suarez Covarrubias, A., Mowbray, S. L., Jones, T. A., Supuran, C. T.** (2009). Carbonic anhydrase inhibitors. Characterization and inhibition studies of the most active β -carbonic

anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg med Chem Lett*, 19, 6649-6654.

- [27] **Öztürk Sarıkaya, S. B.** (2009). *Bazı fenolik asitlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerine etkilerinin incelenmesi*. (Doktora Tezi). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [28] **Boztaş, M., Çetinkaya, Y., Topal, M., Gülçin, İ, Menzek, A., Şahin, E., Tanc, M., Supuran, C. T.** (2015). Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxybromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 640-650.
- [29] **Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, GN., Waheed, A., Hamli, P., Hänninen, M., Hämäläinen, JM., Vihinen, M., Sly, WS., Parkkila, S.** (2005). Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 392, 83-92.
- [30] **Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., Eds.** (2004). Carbonic anhydrase: Its inhibitors and activators. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- [31] **Gambhir, K. K., Ornasir, J., Headings, V., Bonar, A.** (2007). Decreased total carbonic anhydrase esterase activity and decreased levels of carbonic anhydrase 1 isozyme in erythrocytes of type II diabetic patients. *Biochem Genet*, 45, 431-439.
- [32] **Gao, B. B., Clermont, A., Rook, S.** (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med*, 13, 181-188.
- [33] **Supuran, C. T., Scozzafava, A.** (2000). Carbonic anhydrase I and their therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets*, 10, 575-600.
- [34] **Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M. et al.** (2012). Carbonic anhydrase I as a new plasma biomarker for prostate cancer. *ISRN Oncol*, 2012, ID 768190. doi:10.5402/2012/768190.
- [35] **Chang, X., Zheng, Y., Yang, Q.** (2012). Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*, 14, 176. doi: 10.1186/ar3929.
- [36] **Chang, X., Han, J., Zhao, Y., Yan, X., Sun, S., Cui, Y.** (2010). Increased expression of carbonic anhydrase I in the synovium of patients with ankylosing spondylitis. *BMC Musculoskelet Disord*, 11, 279. doi: 10.1186/1471-2474-11-279
- [37] **Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A.** (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 23, 146-189.
- [38] **De Simone, G., Supuran, C.T.** (2012). (In)organic anions as carbonic anhydrase inhibitors. *J Inorg Biochem*, 111, 117-129.
- [39] **Supuran, C. T., Scozzafava, A.** (2007). Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem*, 15, 4336-4350.

- [40] **Supuran, C. T.** (2013). Carbonic anhydrases from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnologic use for CO₂ capture. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28, 229-230.
- [41] **Supuran, C. T.** (2013). Carbonic anhydrase inhibitors: an editorial. *Expert Opin Ther Pat*, 23, 677-679.
- [42] **McKenna, R., Frost, S.** (2014). Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. 75. Heidelberg.: Springer Verlag.
- [43] **Kinsey, V. E.** (1949). Comparative chemistry of aqueous humor in posterior and anterior chambers of rabbit eye. *Arch Ophthalmol*, 32, 189-202.
- [44] **Wistrand, P. J.** (1951). Carbonic anhydrase in the anterior uvea of the rabbit. *Acta Physiol Scand*, 24, 144-148.
- [45] **Maren, T. H.** (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiol Rev*, 47, 595-781.
- [46] **Maren, T. H.** (1979). Effect of varying CO₂ equilibria on rates of HCO₃⁻ formation in cerebrospinal fluid. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 47, 471-477.
- [47] **Maren, T. H., Conroy, C. W., Wynns, G. C., Godman, D. R.** (1997). Renal and cerebrospinal fluid formation pharmacology of a high molecular weight carbonic anhydrase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 98-104.
- [48] **Lynch, C. J., Fox, H., Hazen, S. A., Stanley, B. A., Dodgson, S. J., Lanoue, K. F.** (1995). Role of hepatic carbonic anhydrase in de novo lipogenesis. *Biochem J*, 310, 197-202.
- [49] **Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., Spencer, I. M.** (2000). The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. In W.R. Chegwidden, Y. Edwards, N. Carter (Eds.), *The carbonic anhydrases-new horizons* (pp. 343-363). Basel.: Birkhäuser Verlag.
- [50] **Scozzafava, A., Supuran, C. T., Carta, F.** (2013). Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors: a literature and patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 23, 725-735.
- [51] **Hall, T. J., Higgins, W., Tardif, C., Chambers, T. J.** (1991). A comparison of the effects of inhibitors of carbonic anhydrase on osteoclastic bone resorption and purified carbonic anhydrase isozyme II. *Calcif Tissue Int*, 49, 328-332.
- [52] **Masini, E., Carta, F., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2013). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 23, 705-716.
- [53] **Carta, F., Supuran, C. T., Scozzafava, A.** (2012). Novel therapies for glaucoma: a patent review 2007-2011. *Expert Opin Ther Pat*, 22, 79-88.
- [54] **Mincione, F., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2009). Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors as ophthalmologic drugs. In C. T. Supuran, J-Y

Winum (Eds.), *Drug design of zinc-enzyme inhibitors: functional, structural, and disease applicaitons* (pp. 139-154). Hoboken: Wiley.

- [55] **Carta, F., Supuran, C. T.** (2013). Diuretics with carbonic anhydrase inhibitory action: a patent and literature review (2005-2013). *Expert Opin Ther Pat*, 23, 681-691.
- [56] **Supuran, C. T., Scozzafava, A.** (2002). Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Expert Opin Ther Pat*, 12, 217-242.
- [57] **Supuran, C. T.** (2008). Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr Pharm Des*, 14, 641-648.
- [58] **Thiry, A., Dogne, J. M., Supuran, C. T., Masereel, B.** (2008). Anticonvulsant sulfonamides/sulfamates/sulfamides with carbonic anhydrase inhibitory activity: drug design and mechanism of action. *Curr Pharm Des*, 14, 661-671.
- [59] **De Simone, G., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2009). Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates? *Chem Biol Drug Des*, 74, 317-321.
- [60] **Aggarwal, M., Kondeti, B., McKenna, R.** (2013). Anticonvulsant/antiepileptic carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 23, 717-724.
- [61] **Hynninen, P., Parkkila, S., Huhtala, S., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A. et al.** (2012). Carbonic anhydrase isozymes II, IX, and XII in uterine tumors. *APMIS*, 120, 117-129.
- [62] **Nordfors, K., Haapasalo, J., Korja, M., Niemelä, A., Laine, J., Parkkila, A. K. et al.** (2010). The tumour-associated carbonic anhydrases CA II, CA IX and CA XII in a group of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumours: an association of CA IX with poor prognosis. *BMC Cancer*, 10, 148.
- [63] **Parkkila, S., Lasota, J., Fletcher, J. A., Ou, W. B., Kivela, A. J., Nuorva, K., et al.** (2010). Carbonic anhydrase II. A novel biomarker for gastrointestinal stromal tumours. *Mod Pathol*, 23, 743-750.
- [64] **Monti, S. M., Supuran, C. T., De Simone, G.** (2013). Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008-2013). *Expert Opin Ther Pat*, 23, 737-749.
- [65] **Parkkila, S., Innocenti, A., Kallio, H., Hilvo, M., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2009). The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian α -carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 4102-4106.
- [66] **Kayser, B., Dumont, L., Lysakowski, C., Combescure, C., Haller, G., Tramèr, M. R.** (2012). Reappraisal of acetazolamide for the prevention of acute mountain sickness: a systematic review and meta-analysis. *High Alt Med Biol*, 13, 782-792.

- [67] **Kayser, B., Hulsebosch, R., Bosch, F.** (2008). Low-dose acetylsalicylic acid and acetazolamide for prevention of acute mountain sickness. *High Alt Med Biol*, 9, 15-23.
- [68] **Oksala, N., Levula, M., Pelto-Huikko, M., Kytömäki, L., Soini, J. T., Salenius, J., et al.** (2010). Carbonic anhydrases II and XII are up-regulated in osteoclast-like cells in advanced human atherosclerotic plaques-Tampere vascular study. *Ann Med*, 42, 360-370.
- [69] **Kenny, A. D.** (1985). Role of carbonic anhydrase in bone: plasma acetazolamide concentrations associated with inhibition of bone loss. *Pharmacology*, 31, 97-107.
- [70] **Pierce, W. M. Jr, Nardin, G. F., Fuqua, M. F., Sabah-Maren, E., Stern, S. H.** (1991). Effect of chronic carbonic anhydrase inhibitor therapy on bone mineral density in white women. *J Bone Miner Res*, 6, 347-354.
- [71] **Detre, J. A., Samuels, O. B., Alsop, D. C., Gonzalez-AT, J. B., Kasner, S. E., Raps, E. C.** (1999). Non-invasive magnetic resonance imaging evaluation of cerebral blood flow with acetazolamide challenge in patients with cerebrovascular stenosis. *J Magn Reson Imaging*, 10, 870-875.
- [72] **Takeuchi, R., Matsuda, H., Yonekura, Y., Sakahara, H., Konishi, J.** (1997). Non-invasive quantitative measurements of cerebral blood flow using technetium-99m-L-L-ECD SPECT activated with acetazolamide: quantification analysis by equal-volume-split ^{99m}Tc-ECD consecutive SPECT method. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17, 1020-1032.
- [73] **Pan, J., Lau, J., Mesak, F., Hundal, N., Pourghiasian, M., Liu, Z., et al.** (2014). Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labelled carbonic anhydrase IX inhibitors for imaging with positron emission tomography. *J Enzyme Inhib Med*, 29, 249-255.
- [74] **Ercisson, A. E., Jones, T. A., Liljas, A.** (1988). Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins*, 4, 274-282.
- [75] **Liljas, A., Kannan, K. K., Bergstén, P. C., Waara, I., Fridborg, K., Strandberg, B., et al.** (1972). Crystal structure of human carbonic anhydrase C. *Nat New Biol*, 235, 131-137.
- [76] **Supuran, C. T.** (2011). Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Front Pharmacol*, 2, 1-6.
- [77] **Bertucci, A., Moya, A., Tambuttè, S., Allemand, D., Supuran, C. T., Zoccola, D.** (2013). Carbonic anhydrases in anthozoan corals-a review. *Bioorg Med Chem*, 21, 1437-1450.
- [78] **De Luca, V., Vullo, D., Scozzafava, A., Carnigale, V., Rossi, M., Supuran, C. T., et al.** (2013). An alpha-carbonic anhydrase from the thermophilic bacterium *Sulphurihydrogenibium azorense* is the fastest enzyme known for the CO₂ hydration reaction. *Bioorg Med Chem*, 21, 1465-1469.
- [79] **Del Prete, S., Vullo, D., De Luca, V., Carnigale, V., Scozzafava, A., Supuran, C. T., et al.** (2013). A highly catalytically active gamma-carbonic anhydrase from the pathogenic anaerobe *Porphyromonas*

gingivalis and its inhibition profile with anions and small molecules. *Bioorg Med Chem*, 23, 4067-4071.

- [80] **Mangani, S., Häkansson, K.** (1992). Crystallographic studies of the binding of protonated and unprotonated inhibitors to carbonic anhydrase using hydrogen sulphide and nitrate anions. *Eur J Biochem*, 210, 867-871.
- [81] **Häkansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A., Liljas, A.** (1992). Structure of native and apo carbonic anhydrase II and structure of some of its anion-ligand complexes. *J Mol Biol*, 227, 1192-1204.
- [82] **Jönsson, B. M., Häkansson, K., Liljas, A.** (1993). The structure of human carbonic anhydrase II in complex with bromide and azide. *FEBS Lett*, 322, 186-190.
- [83] **Liljas, A., Häkansson, K., Jonsson, B. H., Xue, Y.** (1994). Inhibition and catalysis of carbonic anhydrase. *Eur J Biochem*, 219, 1-10.
- [84] **Mietzsch, F., Klarer, J.** (1935). U.S. Patent No. 2,022,921. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [85] **Bentley, R.** (2009). Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams). *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 775-786.
- [86] **Anderson, R. J., Groundwater, P. W., Todd, A., Worsley, A. J.** (2012). *Antibacterial Agents*. Chichester, West Sussex: WILEY.
- [87] **(James) Mok, B. L.** (2008). *The Synthesis of Functionalised Sulfonamides*. (Doktora tezi). University College London, Chemistry Department, London.
- [88] **Casini, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C. T.** (2002). Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. *Current Cancer Drug Targets*, 2, 55-75.
- [89] **Mishra, C. B., Kumari, S., Angeli, A., Monti, S. M., Buonanno, M., Tiwari, M., Supuran, C. T.** (2017). Different roads to discovery; Discovery of benzenesulfonamides with potent human carbonic anhydrase inhibitory and effective anticonvulsant action: design, synthesis, and pharmacological assessment. *J Med Chem*, 60, 2456-2469.
- [90] **Carta, F., Birkmann, A., Pfaff, T., Buschmann, H., Schwab, W., Zimmermann, H., Maresca, A., Supuran, C. T.** Lead development of thiazoylsulfonamides with carbonic anhydrase inhibitory action. *J Med Chem*. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00183
- [91] **Bragagni, M., Carta, F., Osman, S. M., AlOthman, Z., Supuran, C. T.** (2017). Synthesis of an acridine orange sulfonamide derivative with potent carbonic anhydrase IX inhibitory action. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32, 701-706.
- [92] **Eldehna, W. M., Al-Ansary, G. H., Bua, S., Nocentini, A., Gratteri, P., Altoukhy, A., Ghabbour, H., Ahmed, H. Y., Supuran, C. T.** (2017). Novel indolin-2-one-based sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors: synthesis, *in vitro* biological evaluation against carbonic anhydrases isoforms I, II, IV, VII and molecular docking studies. *Eur J Med Chem*, 127, 521-530.

- [93] Altug, C., Güneş, H., Nocentini, A., Monti, S. M., Buonanno, M., Supuran, C. T. (2017). Synthesis of isoxazole-containing sulfonamides with potent carbonic anhydrase II and VII inhibitory properties. *Bioorg Med Chem*, 25, 1456-1464.
- [94] Taslimi, P., Sujayev, A., Mamedova, S., Kalın, P., Gülçin, İ., Sadeghian, N., Beydemir, S., Kufrevioglu, O. I., Alwasel, S. H., Farzaliyev, V., Mamedov, S. (2017). Synthesis and bioactivity of several new hetaryl sulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32, 137-145.
- [95] Nocentini, A., Ferraroni, M., Carta, F., Ceruso, M., Gratteri, P., Lanzi, C., Masini, E., Supuran, C. T. (2016). Benzenesulfonamides incorporating flexible triazole moieties are highly effective carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and kinetic, crystallographic, computational, and intraocular pressure lowering investigations. *J Ind Med Chem*, 59, 10692-10704.
- [96] Gieling, R. G., Babur, M., Mamnani, L., Burrows, N., Telfer, B. A., Carta, F., Winum, J. Y., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Williams, K. J. (2012). Antimetastatic effect of sulfamate carbonic anhydrase IX inhibitors in breast carcinoma xenografts. *J Med Chem*, 55(11), 5591-5600.
- [97] Akıncioğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ., Supuran, C. T. (2013). Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isozymes inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 21, 1379-1385.
- [98] Carta, F., Aggarwal, M., Maresca, A., Scozzafava, A., McKenna, R., Supuran, C. T. (2012). Dithiocarbamates: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. Crystallographic and kinetic investigations. *Chem Commun*, 48, 1868-1870.
- [99] Abellán-Flos, M., Tanç, M., Supuran, C. T., Vincent, S. P. (2016). Multimeric xanthates as carbonic anhydrase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6), 946-952.
- [100] Mincione, F., Menabuoni, L., Fabrizio, B., Mincione, G., Scozzafava, A., Supuran, C. T. (1998). Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of isozymes I, II and IV with *N*-hydroxysulfonamides – A novel class of intraocular pressure lowering agents. *J Enzyme Inhibition*, 13, 267-284.
- [101] Di Fiore, A., Maresca, A., Supuran, C. T., De Simone, G. (2012). Hydroxamate represents a versatile zinc binding group for the development of new carbonic anhydrase inhibitors. *Chem Commun*, 48, 8838-8840.
- [102] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenol flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- [103] Pekkarinan, S. S., Heinonen, I. M., Hopia, A. I. (1999). Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 79, 499-506.

- [104] **Burda, P. M., Oleszek, W.** (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
- [105] **Innocenti, A., Gülçin, I., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. Antioxidant polyphenols effectively inhibit mammalian isoforms I-XV. *Bioorg Med Chem Lett*, 20, 5050-5053.
- [106] **Gulcin, I.** (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino Acids*, 32, 431-438.
- [107] **Dall'Armellina, E., Morgan, T. M., Mandapaka, S., Ntim, W., Carr, J. J., Hamilton, C. A., Hoyle, J., Clark, H., Clark, P., Link, K. M., Case, D., Hundley, W. G.** (2008). Prediction of cardiac events in patients with reduced left ventricular ejection fraction with dobutamine cardiovascular magnetic resonance assessment of wall motion score index. *J Am Coll Cardiol*, 52, 279-286.
- [108] **Ak, T., Gulcin, I.** (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact*, 174, 27-37.
- [109] **Mabry, H., Harborne, J. B., Mabry, T. J.** (1975). *The flavonoids*. London: Chapman and Hall.
- [110] **Köksal, E., Gülçin, İ., öztürk Sarıkaya, S. B., Bursal, E. J.** (2009). In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 24, 395-405.
- [111] **Huseini, H. F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliat, T., Raza, M.** (2006). The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytother Res*, 20, 1036-1039.
- [112] **Simonsson, I., Jonsson, B. H., Lindskog, S.** (1982). Phenol, a competitive inhibitor of CO₂ hydration catalyzed by carbonic anhydrase. *Biochem Biophys Res Commun*, 108, 1406-1412.
- [113] **Nair, S. K., Ludwig, P. A., Christianson, D. W.** (2009). Two side binding of phenol in the active site of human carbonic anhydrase II: structural implications for substrate association. *J Am Chem Soc*, 116, 3659-3660.
- [114] **Öztürk Sarıkaya, S. B., Topal, F., Şentürk, M., Gülçin, İ., Supuran, C. T.** (2011). In vitro inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 21, 4259-4262.
- [115] **Salmas, R. E., Mestanoglu, M., Durdagi, S., Sentürk, M., Kaya, A. A., Kaya, E. Ç.** (2016). Kinetic and in *silico* studies of hydroxy-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I and II. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(1), 31-37.

- [116] **Huyut, Z., Beydemir, Ş., Gülçin, İ.** (2016). Inhibitory effects of some phenolic compounds on the activities of carbonic anhydrase: from in vivo to ex vivo. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6), 1234-1240.
- [117] **Yamali, C., Tugrak, M., Gul, H. I., Tanc, M., Supuran, C. T.** (2016). The inhibitory effects of phenolic Mannich bases on carbonic anhydrase I and II isoenzymes. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6), 1678-1681.
- [118] **Scozzafava, A., Supuran, C. T., Carta, C.** (2016). Polyamines and α -carbonic anhydrases. *Molecules*, 21, 1726.
- [119] **Tars, K., Vullo, D., Kazaks, A., Leitans, J., Lends, A., Grandane, A., Zalubovskis, R., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2013). Sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2-dioxides): A class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases. *J Med Chem*, 56, 293-300.
- [120] **Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N. B., Poulsen, S.-A., Scozzafava, A., Quinn, R. J., Supuran, C. T.** (2009). Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: Coumarins are a new class of suicide inhibitors. *J Am Chem Soc*, 131, 3057-3062.
- [121] **Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2012). Novel coumarins and 2-thioxo-coumarins as inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII. *Bioorg Med Chem*, 20, 2266-2273.
- [122] **Davis, R. A., Vullo, D., Maresca, A., Supuran, C. T., Poulsen, S.-A.** (2013). Natural product coumarins that inhibit human carbonic anhydrases. *Bioorg Med Chem*, 21, 1539-1543.
- [123] **Métayer, B., Mingot, A., Vullo, D., Supuran, C. T., Thibaudeau, S.** (2013). New superacid synthesized (fluorinated) tertiary benzenesulfonamides acting as selective hCA IX inhibitors: toward a new mode of carbonic anhydrase inhibition by sulfonamides. *Chem Commun*, 49, 6015-6017.
- [124] **Compaign, G., Martin-Mingot, A., Maresca, A., Thibaudeau, S., Supuran, C. T.** (2013). Superacid synthesis of halogen containing *N*-substituted-4-aminobenzenesulfonamides: new selective tumor-associated carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 21, 1555-1563.
- [125] **Liu, F., Martin-Mingot, A., Lecornué, F., Jouannetaud, M. P., Maresca, A., Thibaudeau, S., Supuran, C. T.** (2012). Carbonic anhydrases inhibitory effects of new benzenesulfonamides synthesized by using superacid chemistry. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 27, 886-891.
- [126] **Moeker, J., Peat, T. S., Bornaghi, L. F., Vullo, D., Supuran, C. T., Poulsen, S.-A.** (2014). Cyclic secondary sulfonamides: usually good inhibitors of cancer related carbonic anhydrase inhibitors. *J Med Chem*, 57, (4), 3522-3531.
- [127] **Petrou, A., Geronihaki, A., Terzi, E., Guler, O. O., Tuccinardi, T., Supuran, C. T.** (2016). Inhibition of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII with secondary sulfonamides incorporating

benzothiazole scaffolds. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6), 1306-1311.

- [128] **Parkkila, S., Innocenti, A., Kallio, H., Hilvo, M., Scozzafava, A., Supuran, C. T.** (2009). The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian α -carbonic anhydrase isoforms. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 4102-4106.
- [129] **Wang, P., Liu, C., Sanches, T., Zhong, Y., Liu, B., Xiong, J., Neamati, N., Zhao, G.** (2009). Design and synthesis of novel nitrogen-containing polyhydroxylated aromatics as HIV-1 integrase inhibitors from caffeic acid phenethyl ester., *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 4574-457.





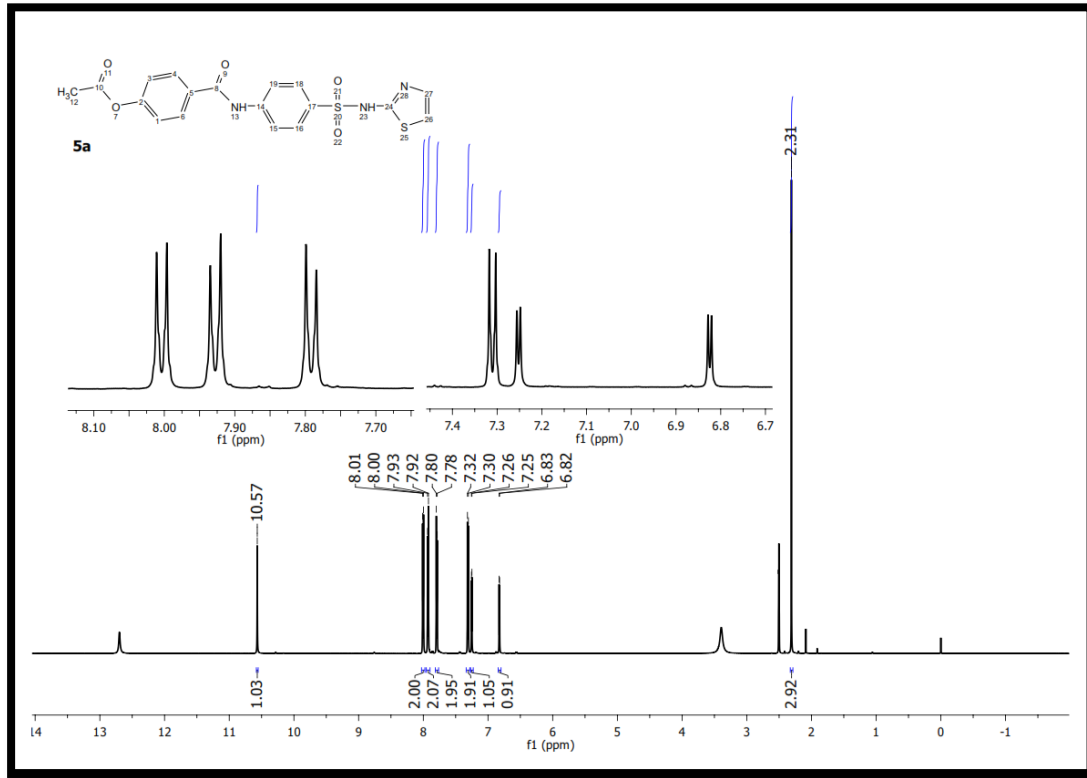
EKLER

EK A: Maddelerin ^1H NMR ve ^{13}C NMR Spektrumları.

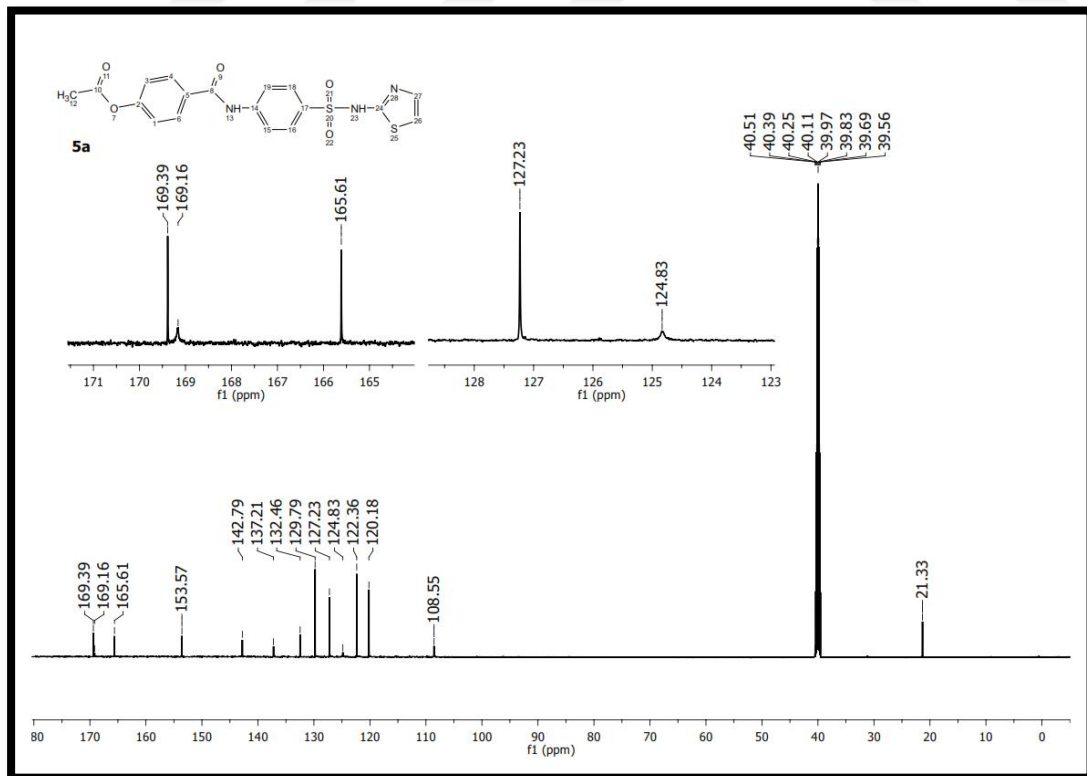
EK B: Maddelerin HRMS Spektrumları.



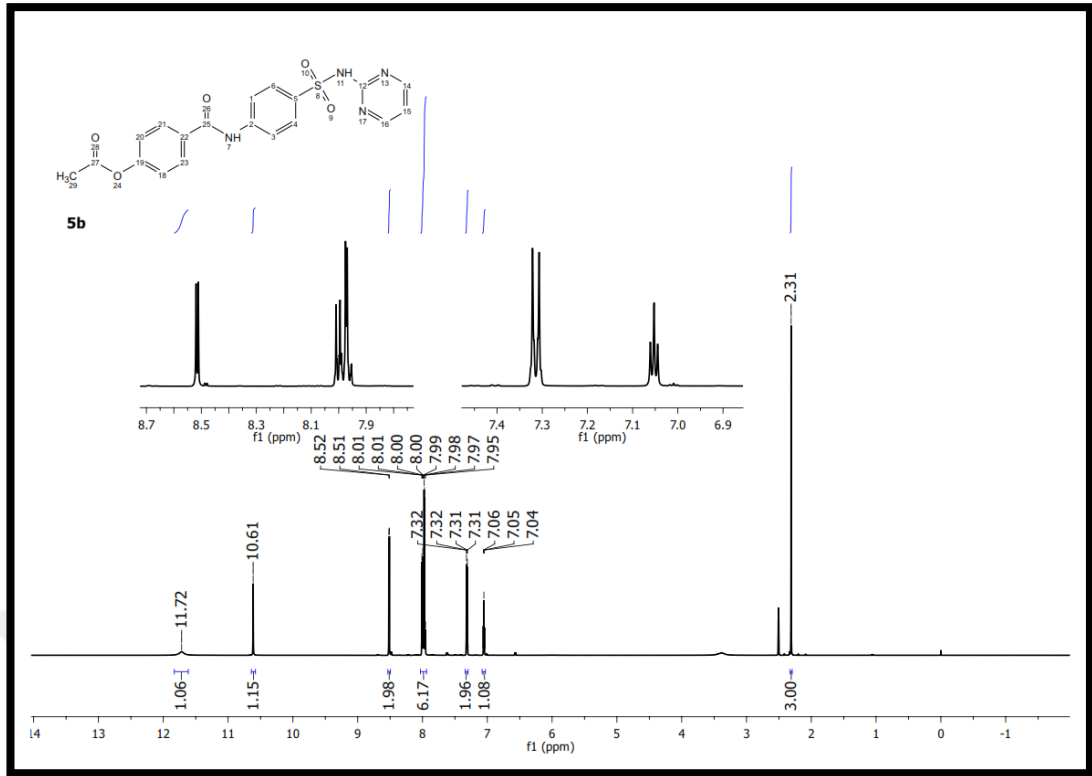
EK A



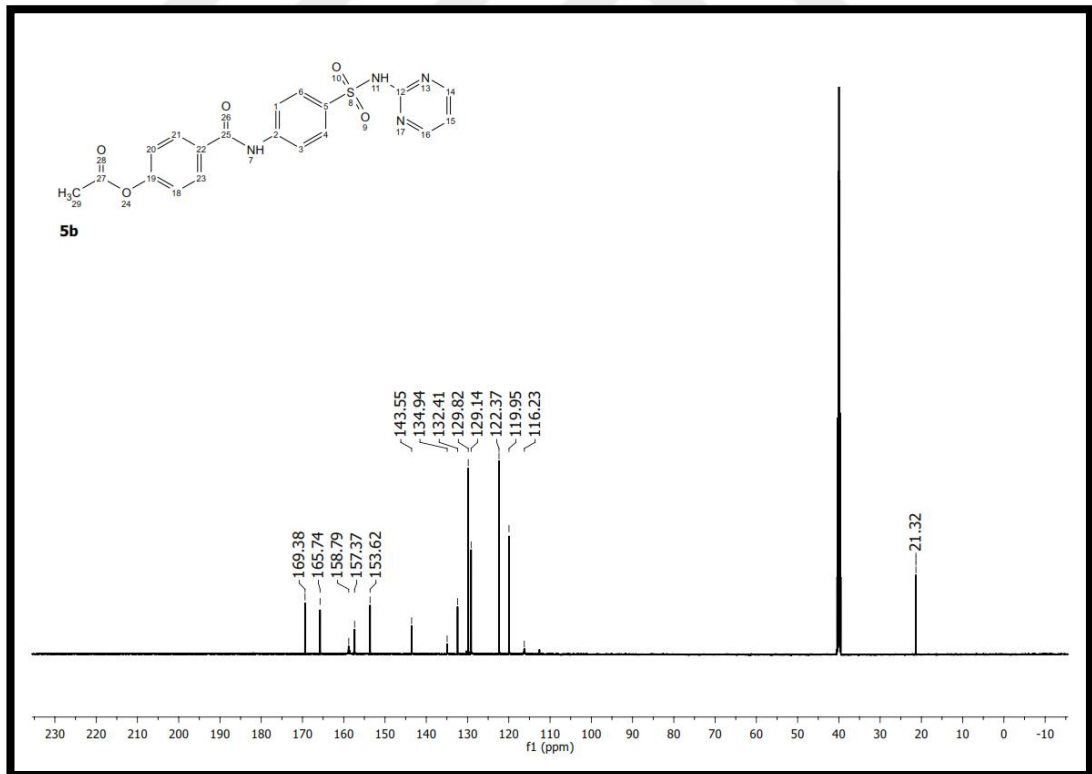
Şekil A.1 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-asetoksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



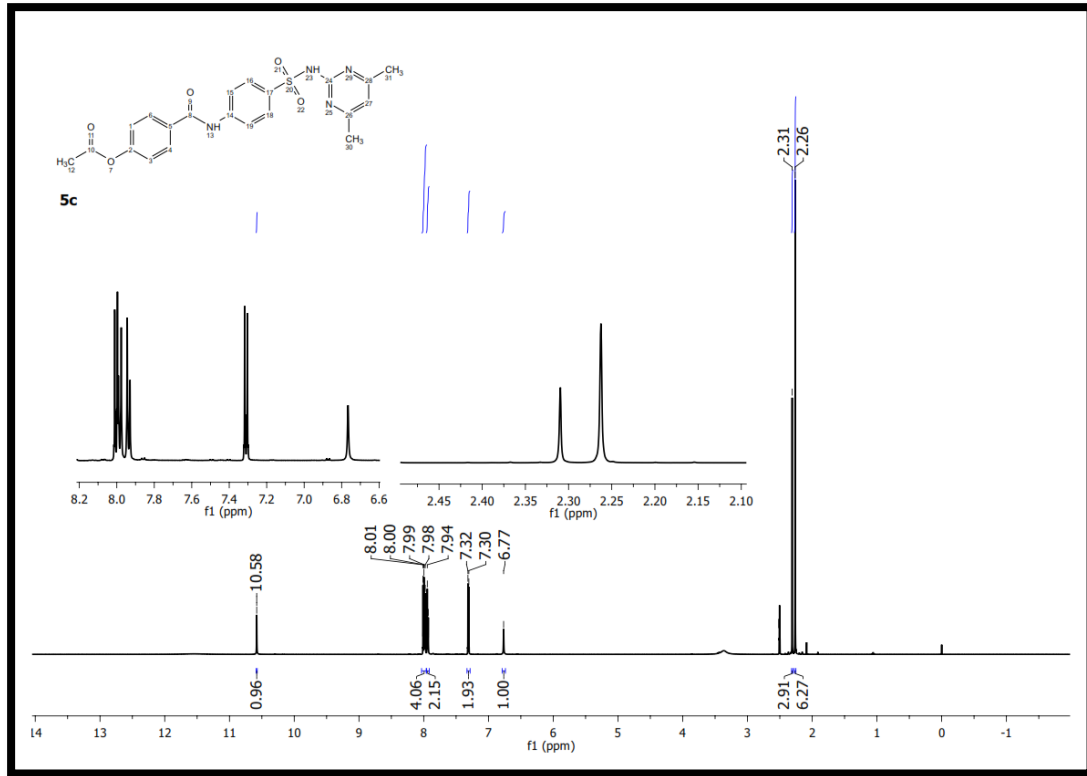
Şekil A.2 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-asetoksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



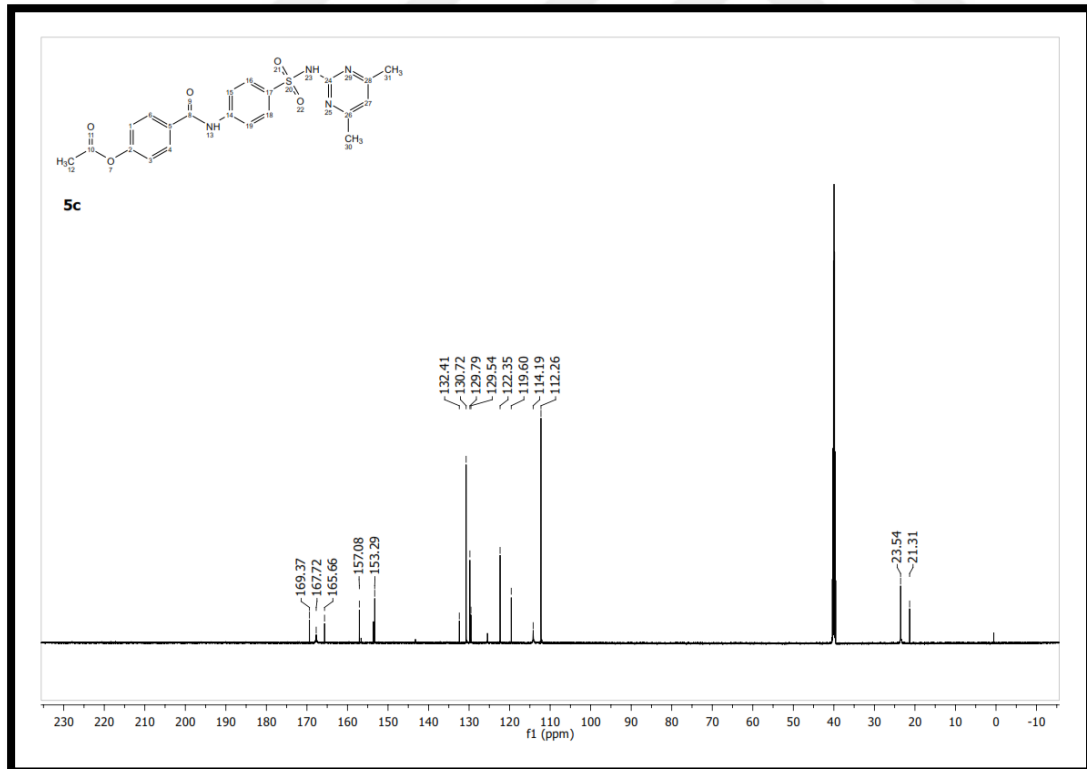
Şekil A.3 : N-(Sülfadiazin)-p-asetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



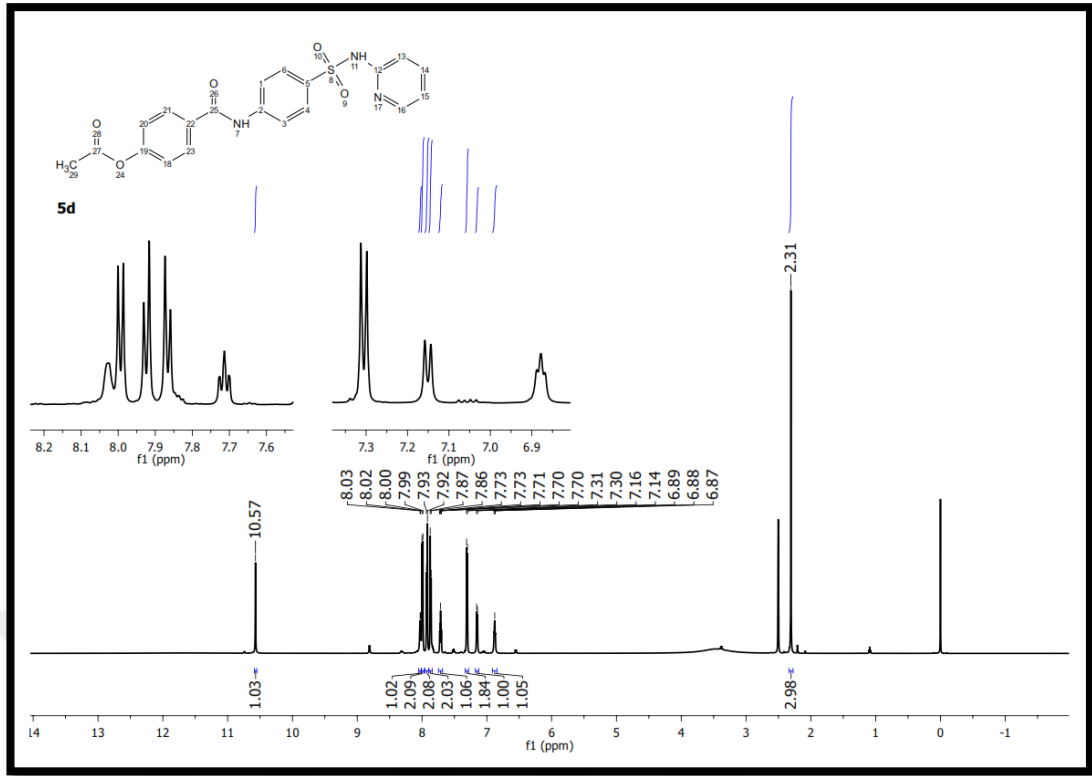
Şekil A.4 : N-(Sülfadiazin)-p-asetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



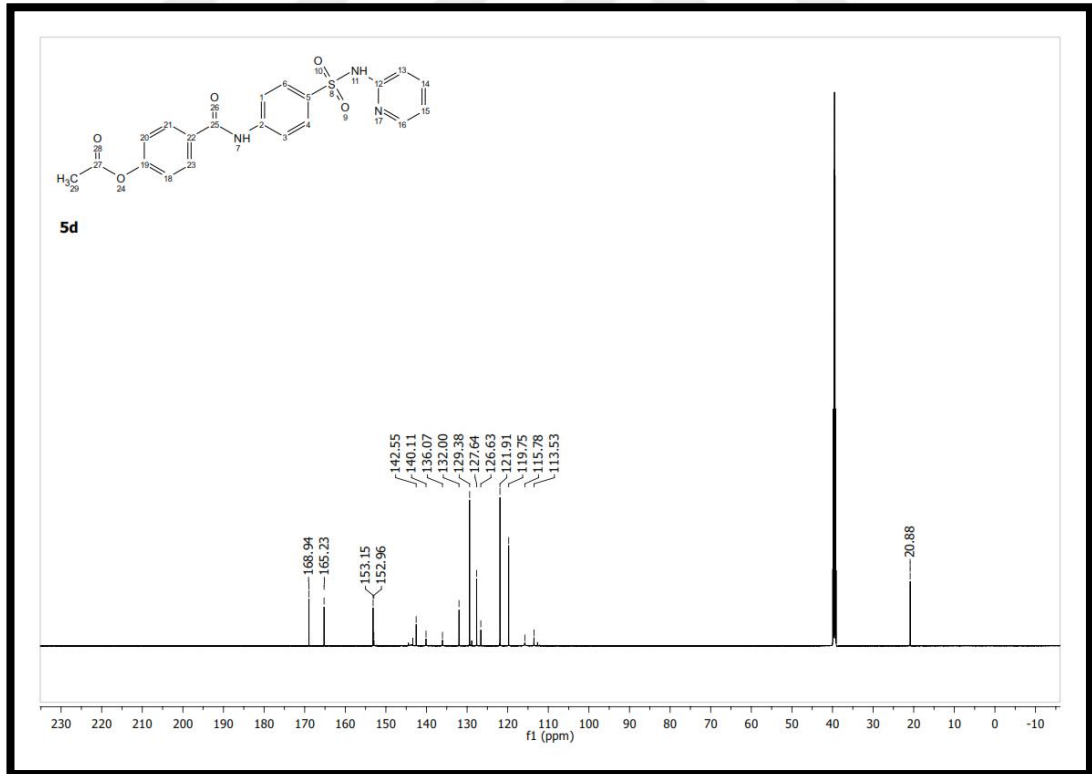
Şekil A.5 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-asetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



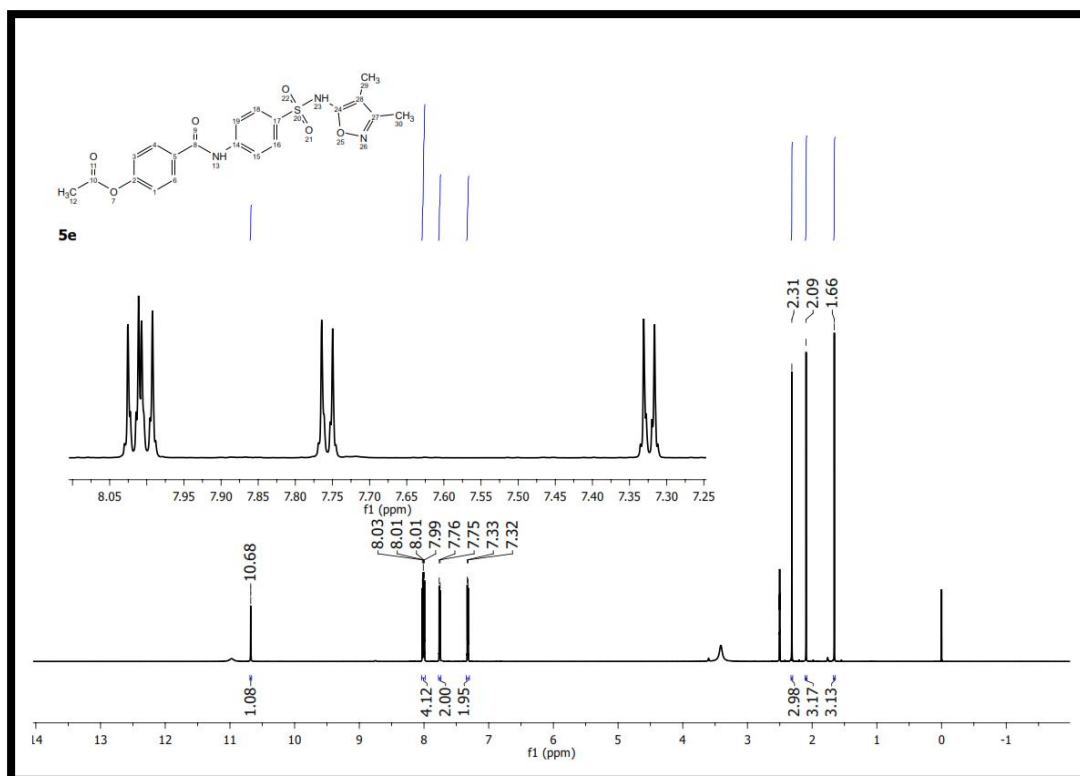
Şekil A.6 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-asetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



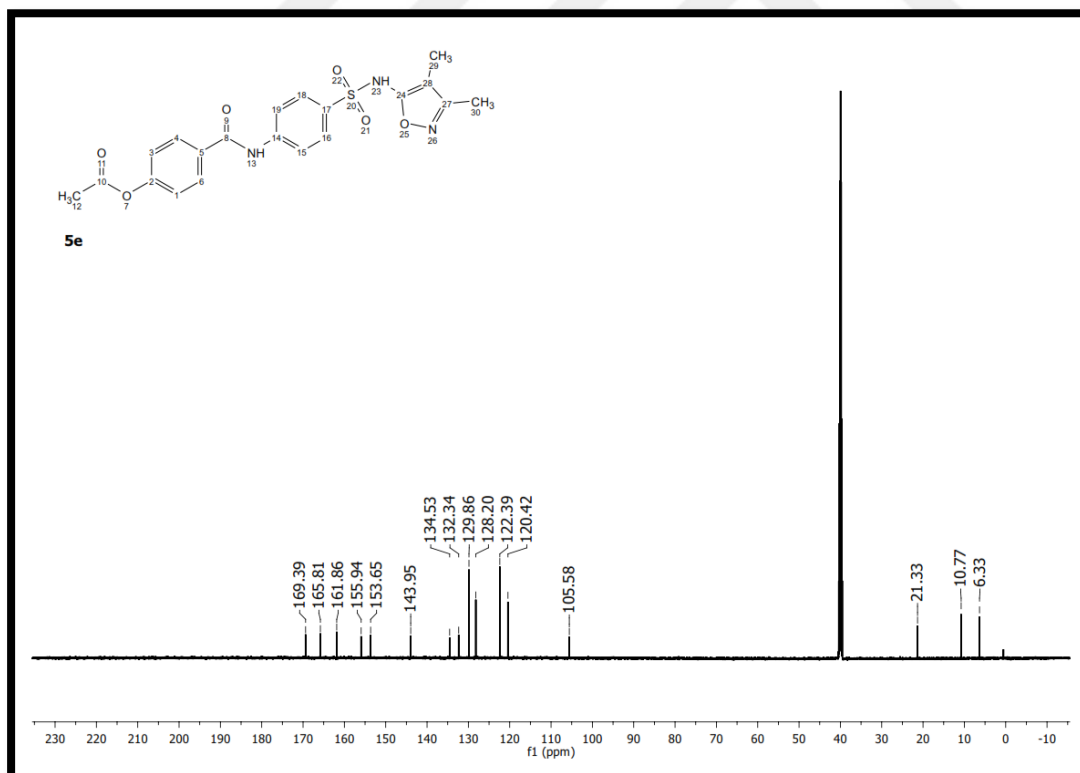
Şekil A.7 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-asetoksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



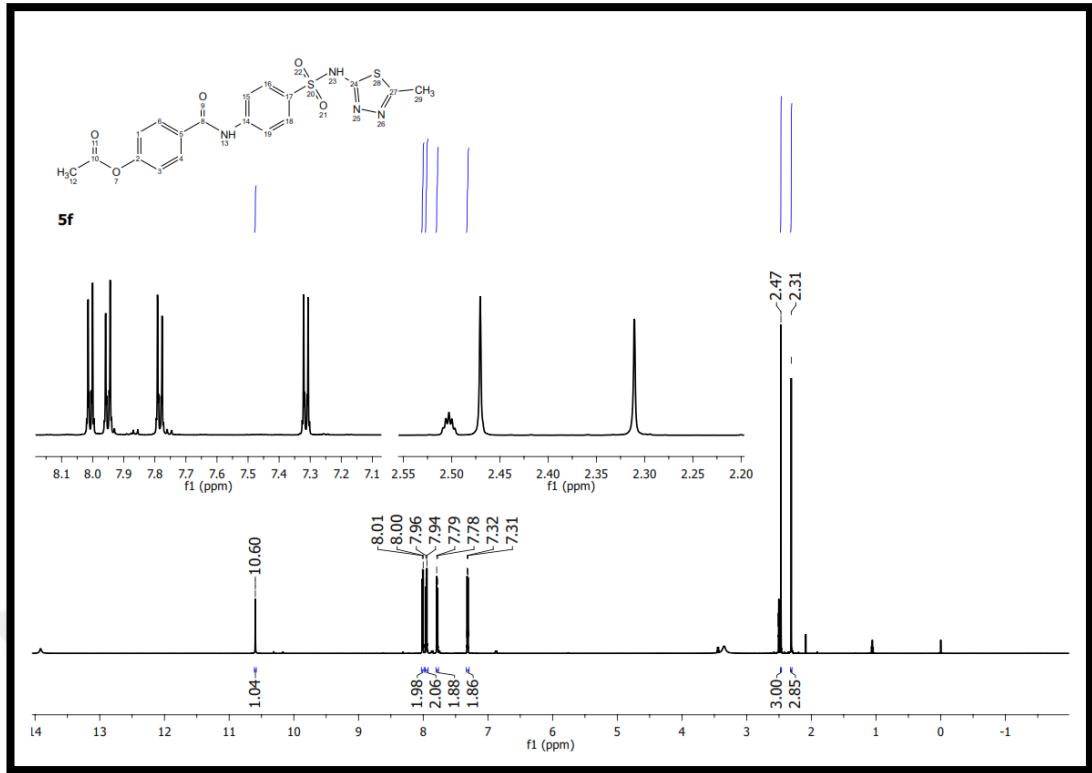
Şekil A.8 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-asetoksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



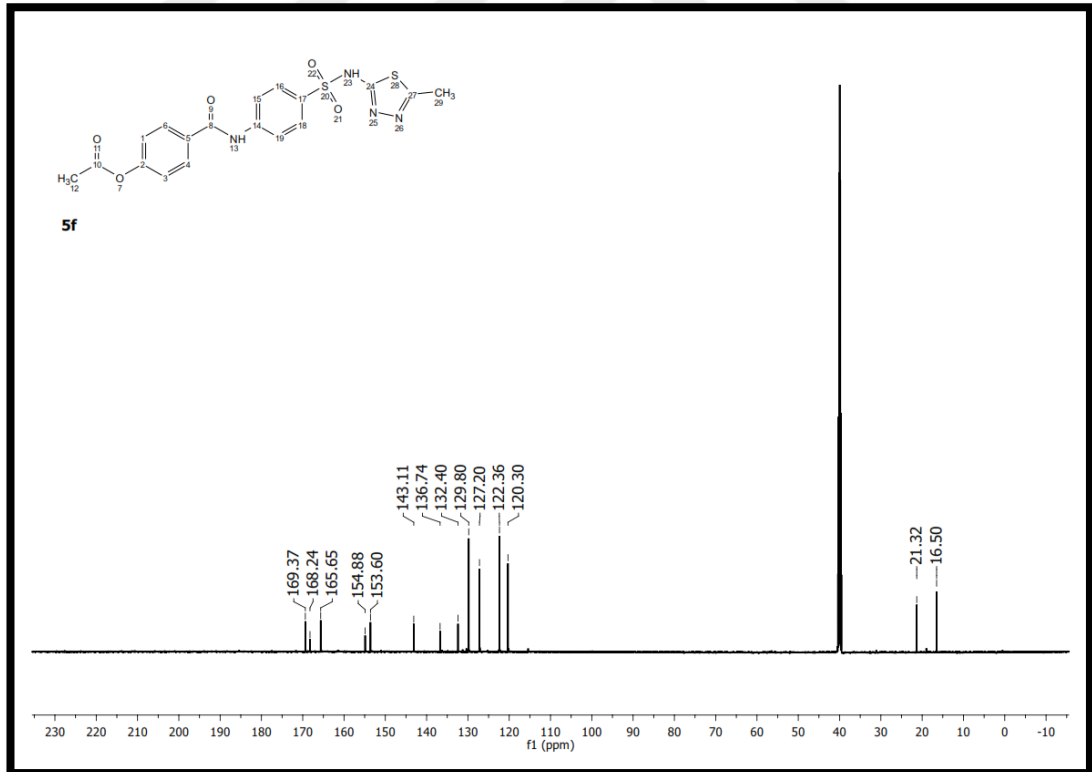
Şekil A. 9 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-asetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



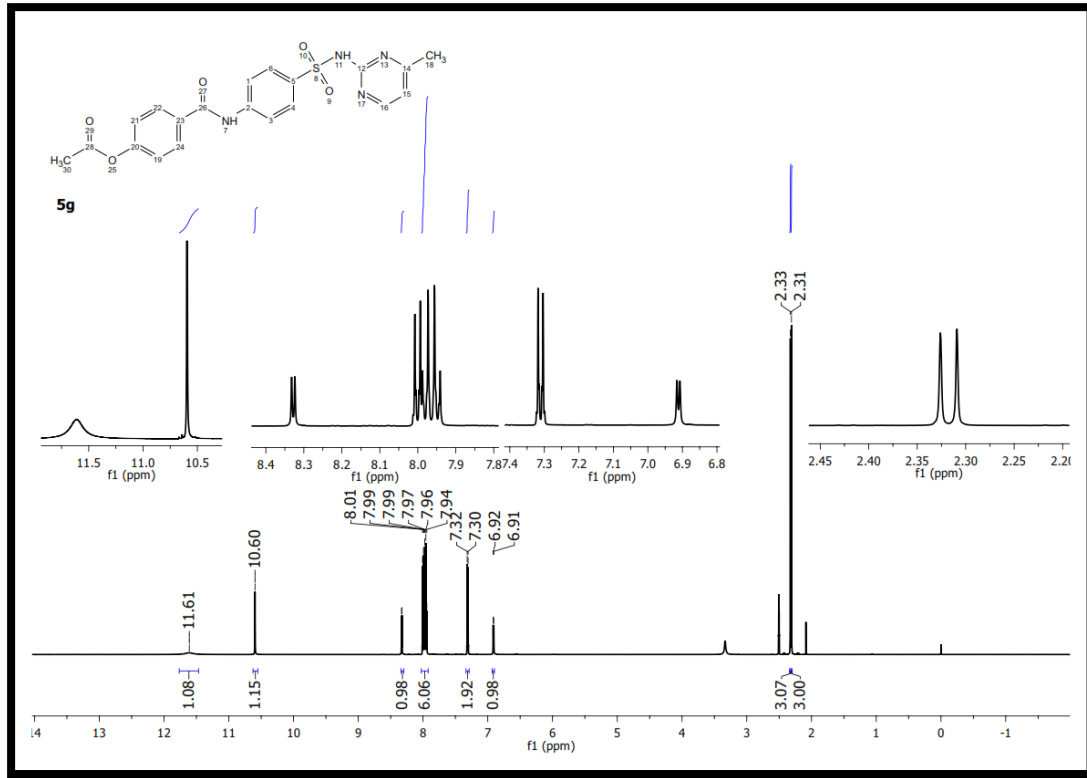
Şekil A.10 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-asetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



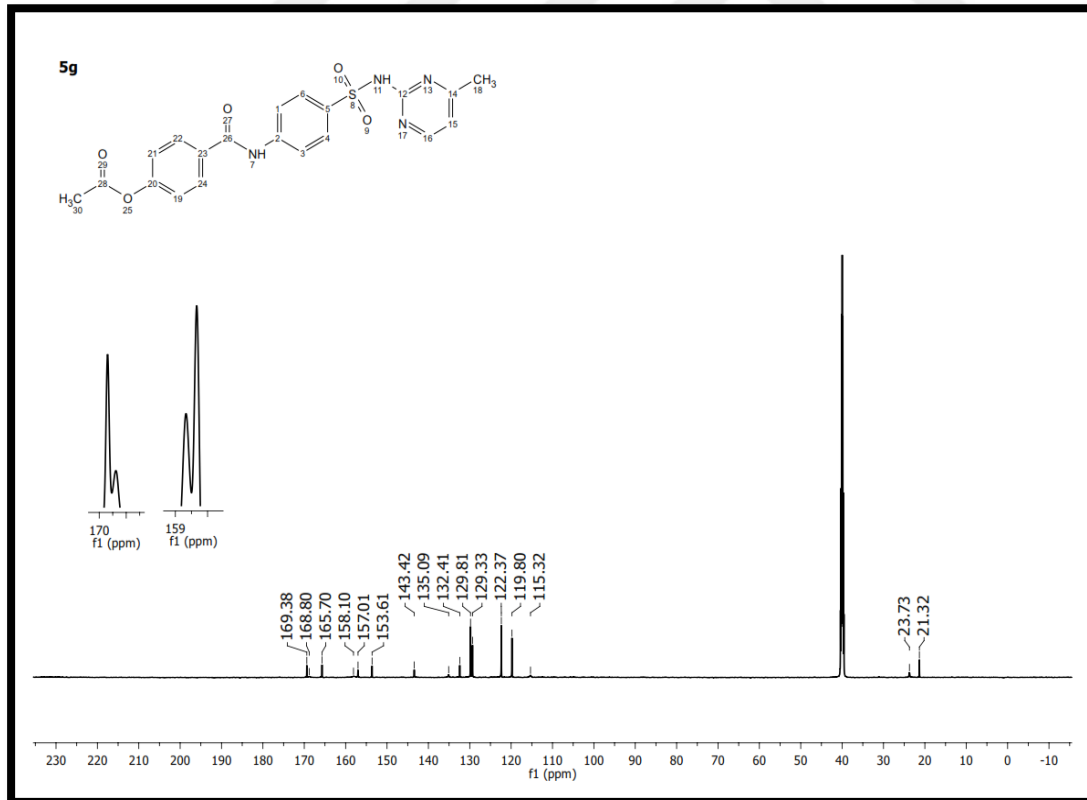
Şekil A.11 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-asetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



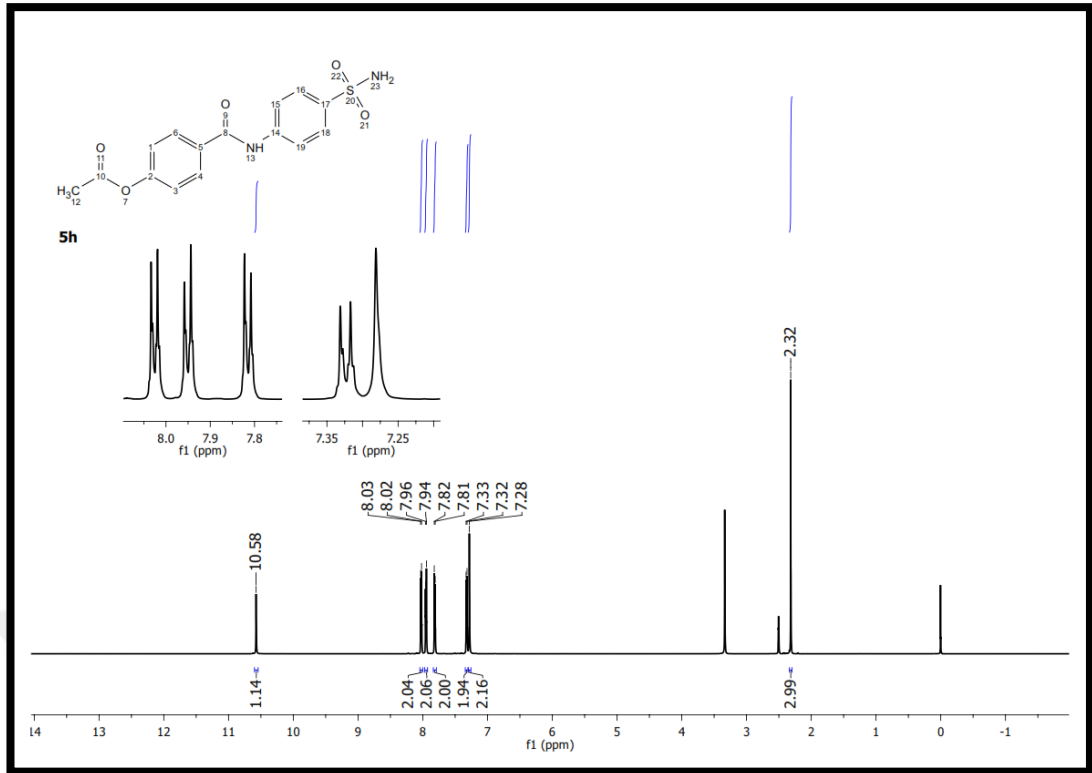
Şekil A.12 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-asetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



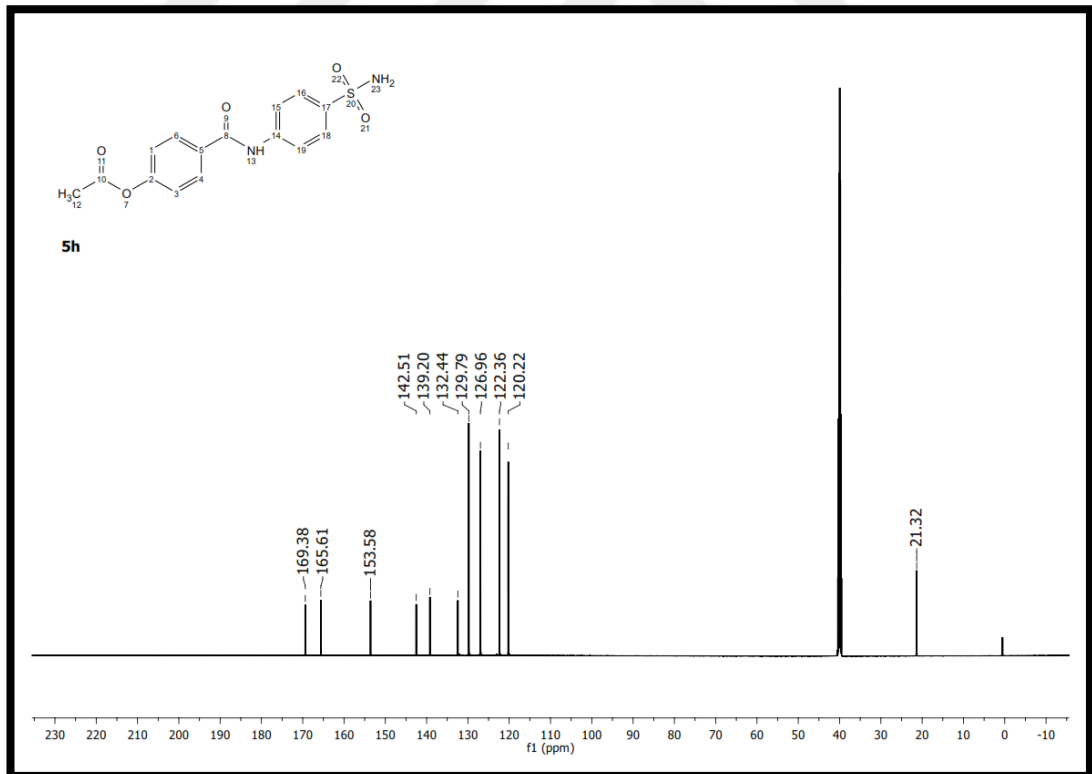
Şekil A.13 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-asetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



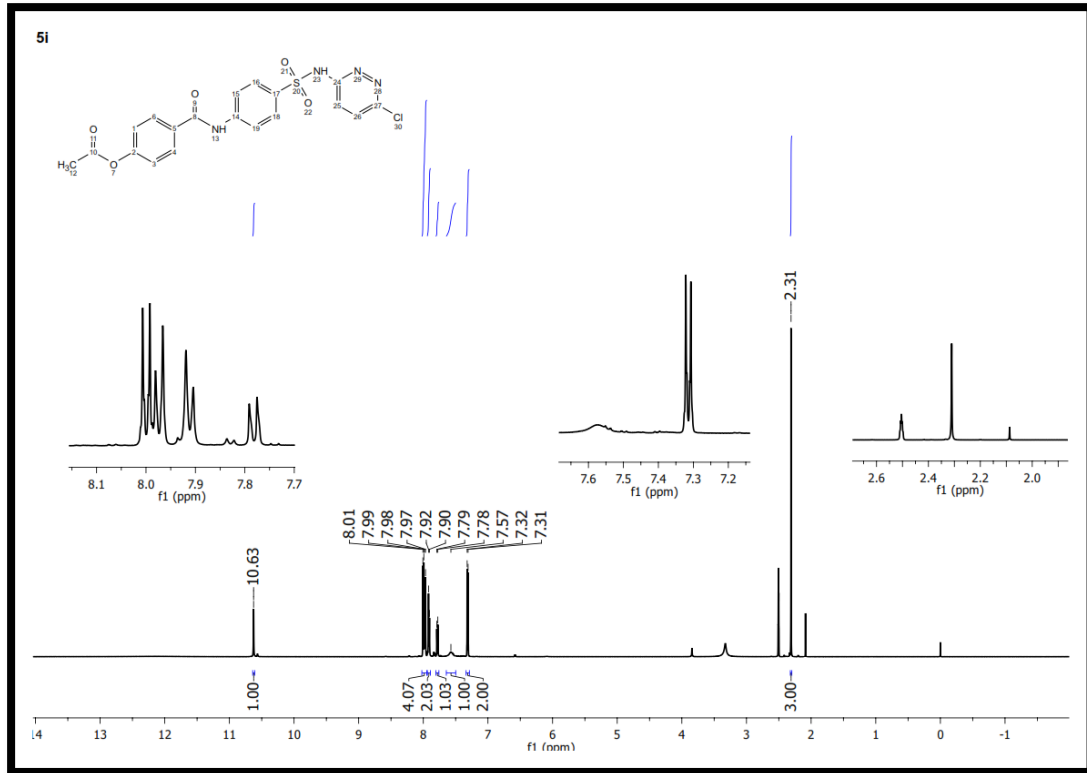
Şekil A.14 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-asetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



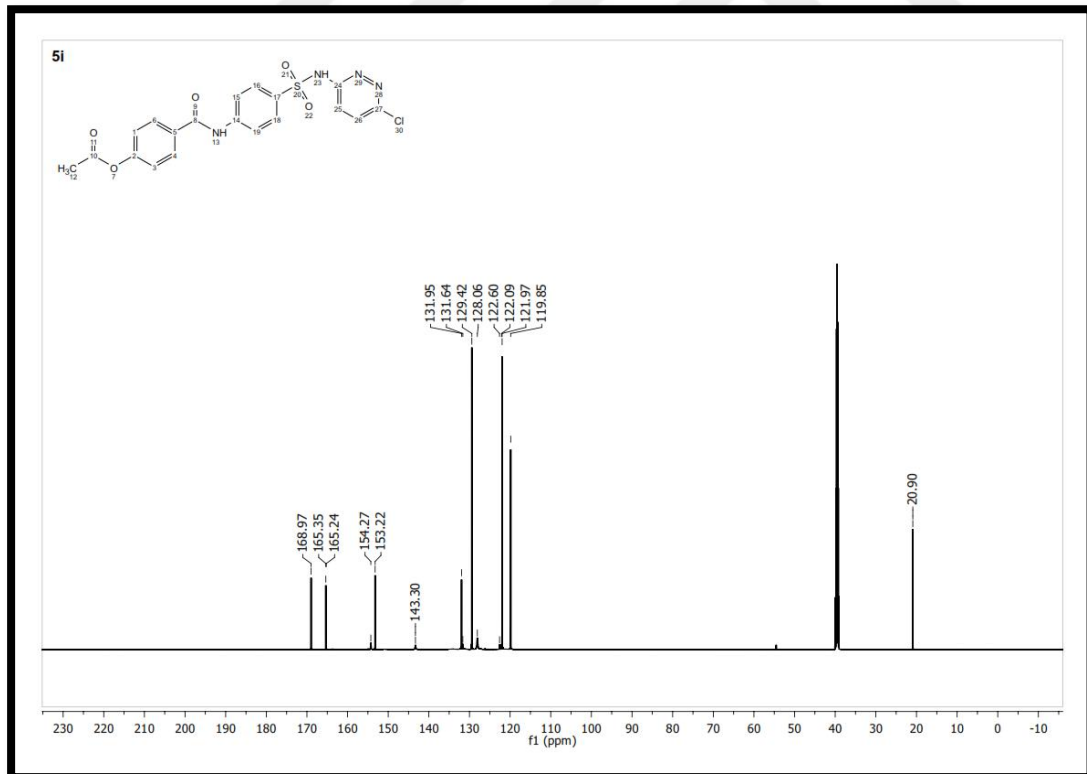
Şekil A.15 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-asetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



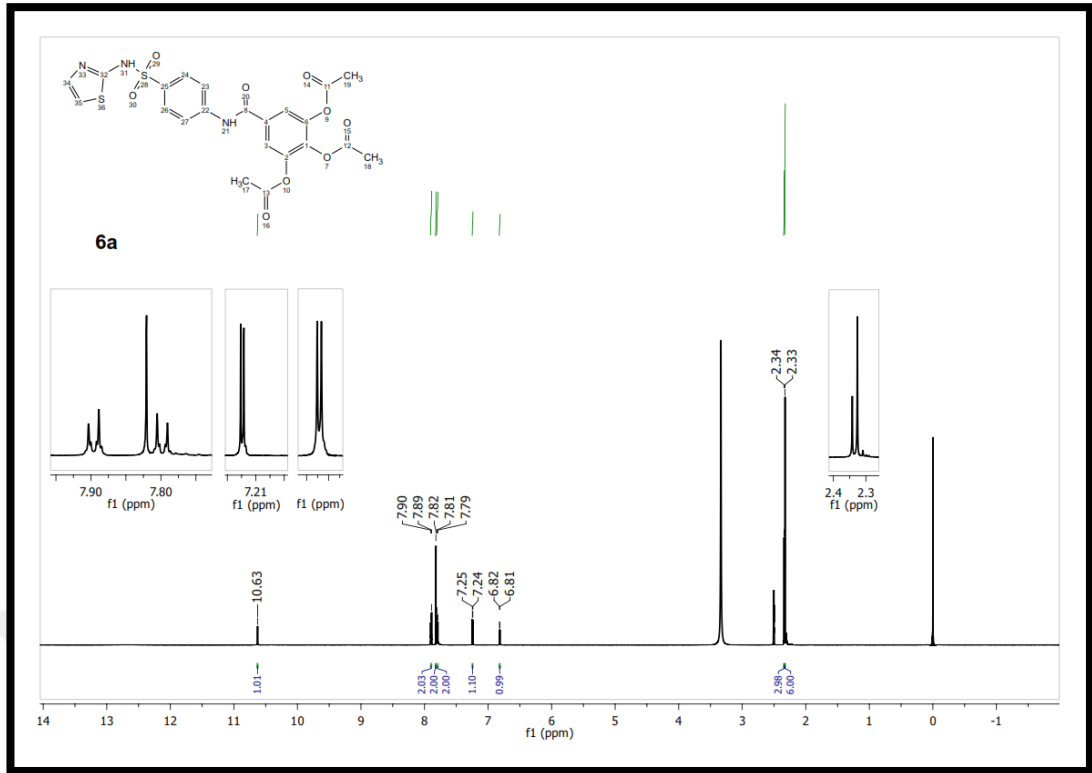
Şekil A.16 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-asetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



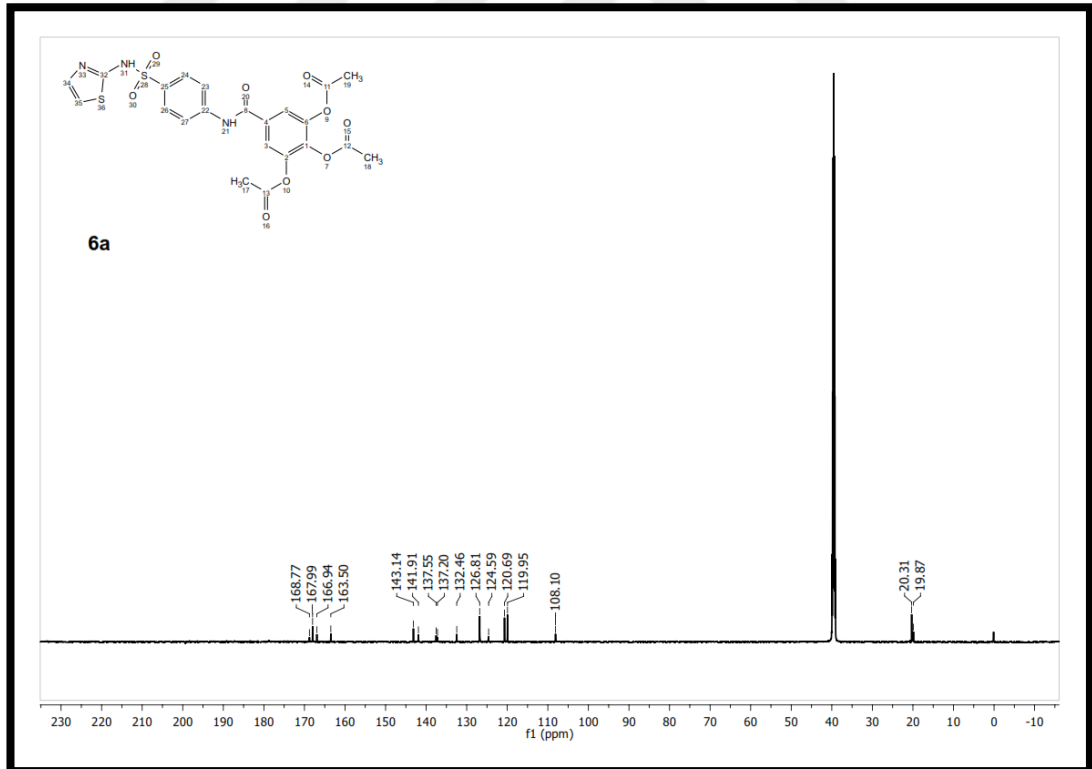
Şekil A.17 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-asetoksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



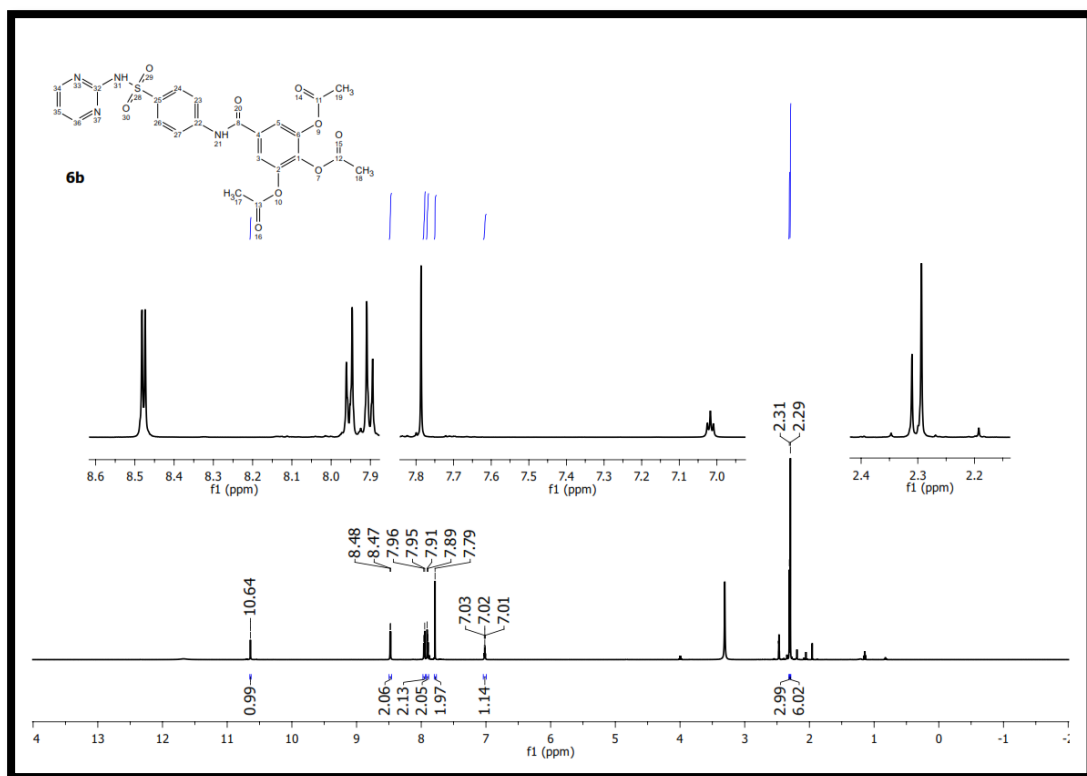
Şekil A.18 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-asetoksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



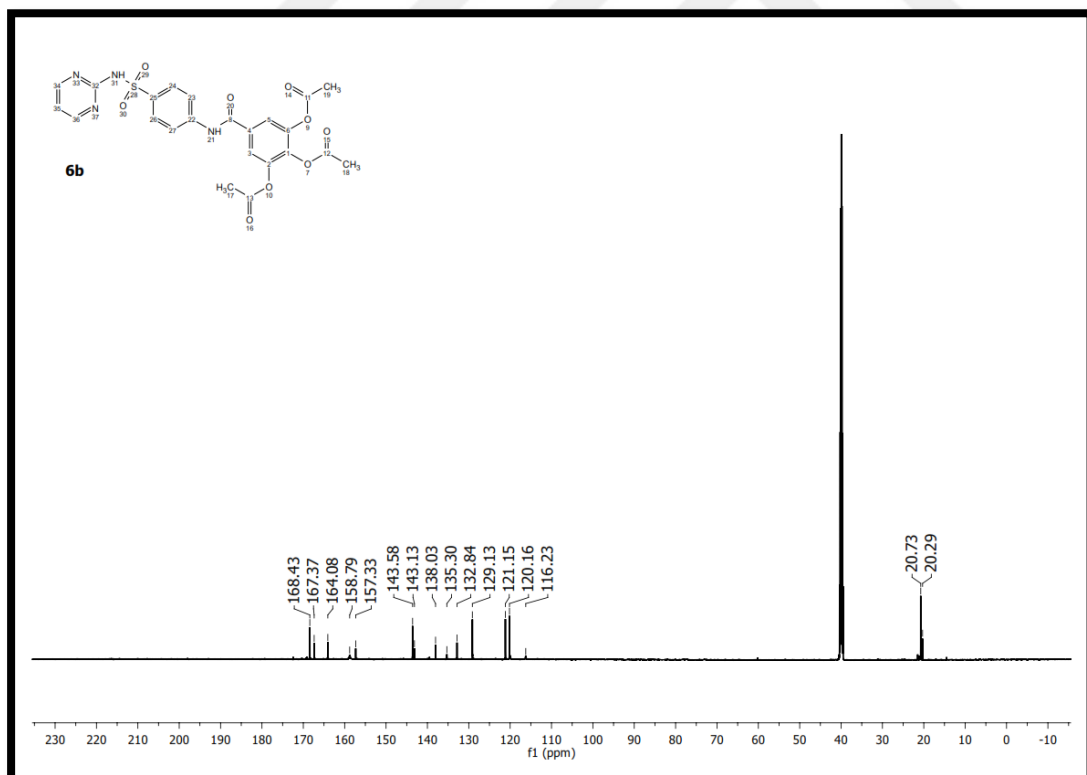
Şekil A.19 : *N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-triaasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



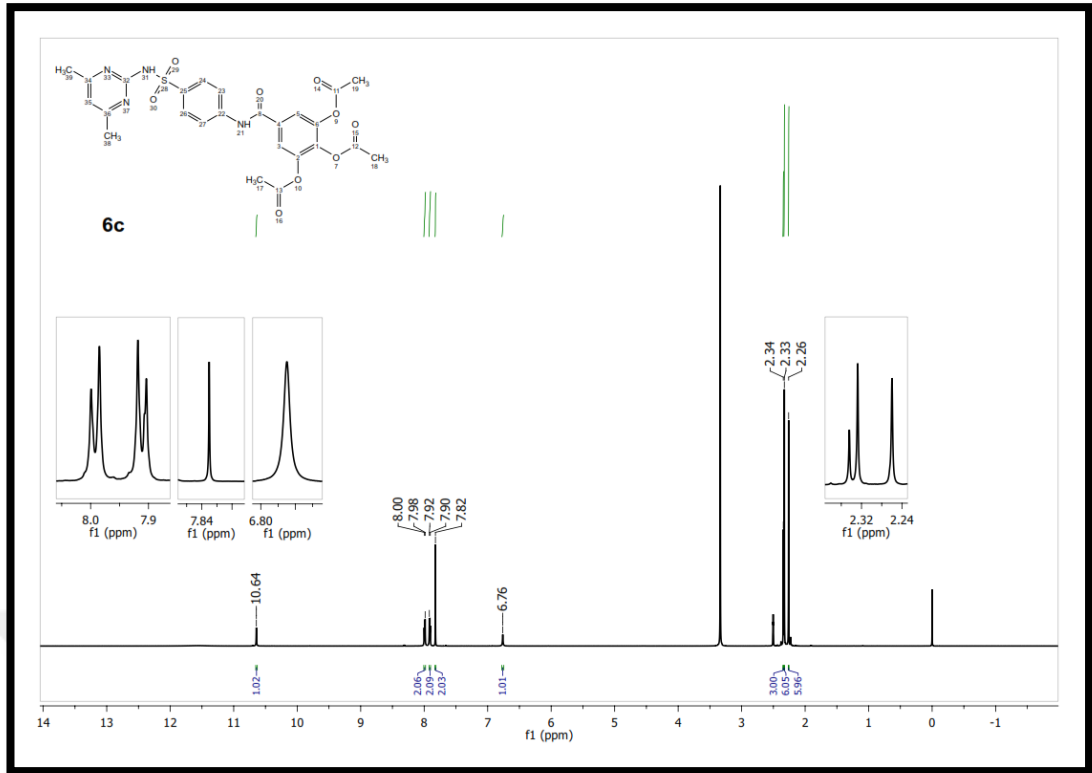
Şekil A.20 : *N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-triaasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



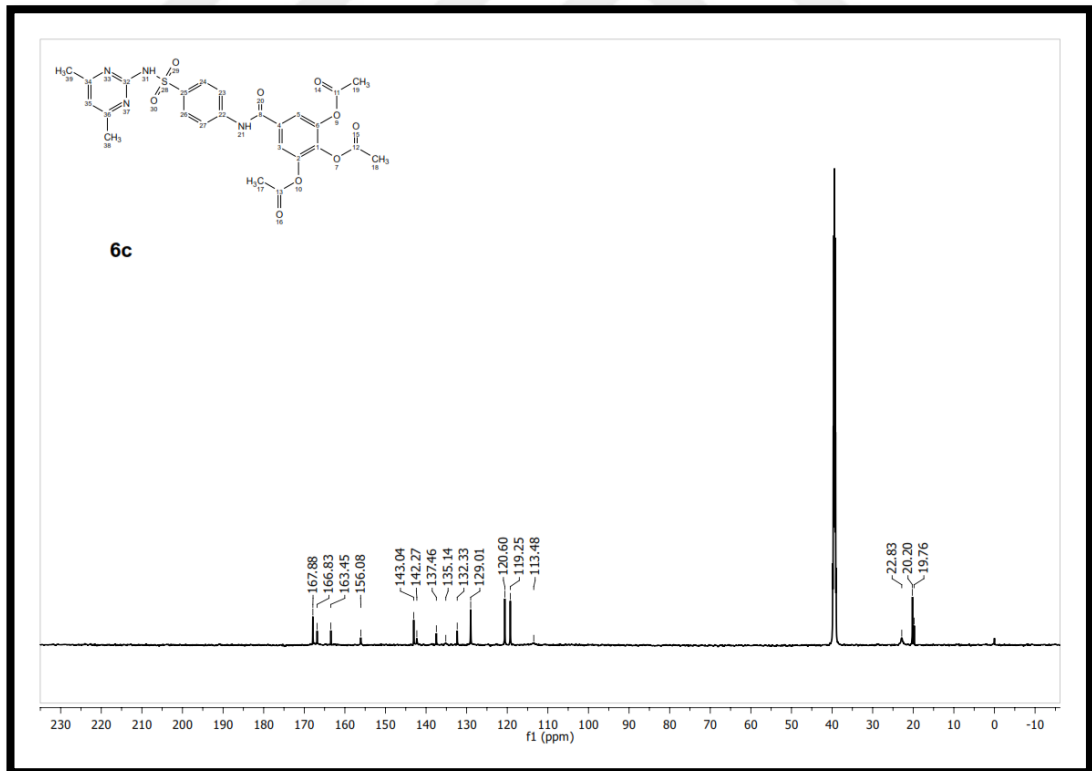
Şekil A.21 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



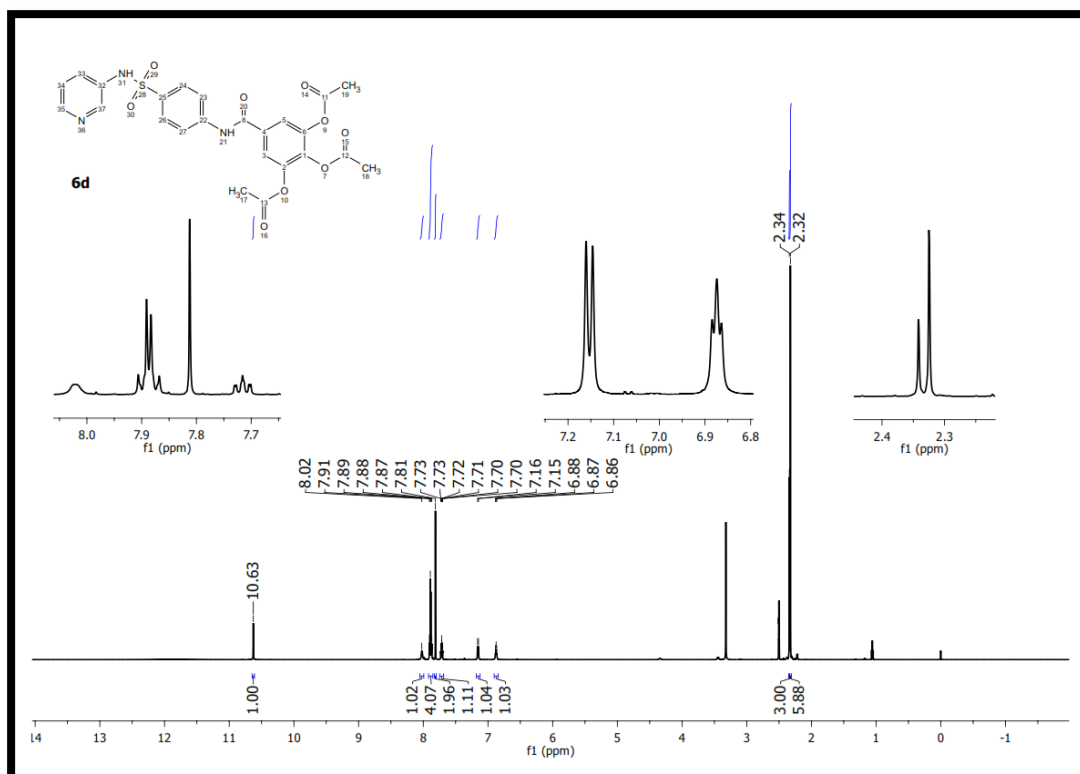
Şekil A.22 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



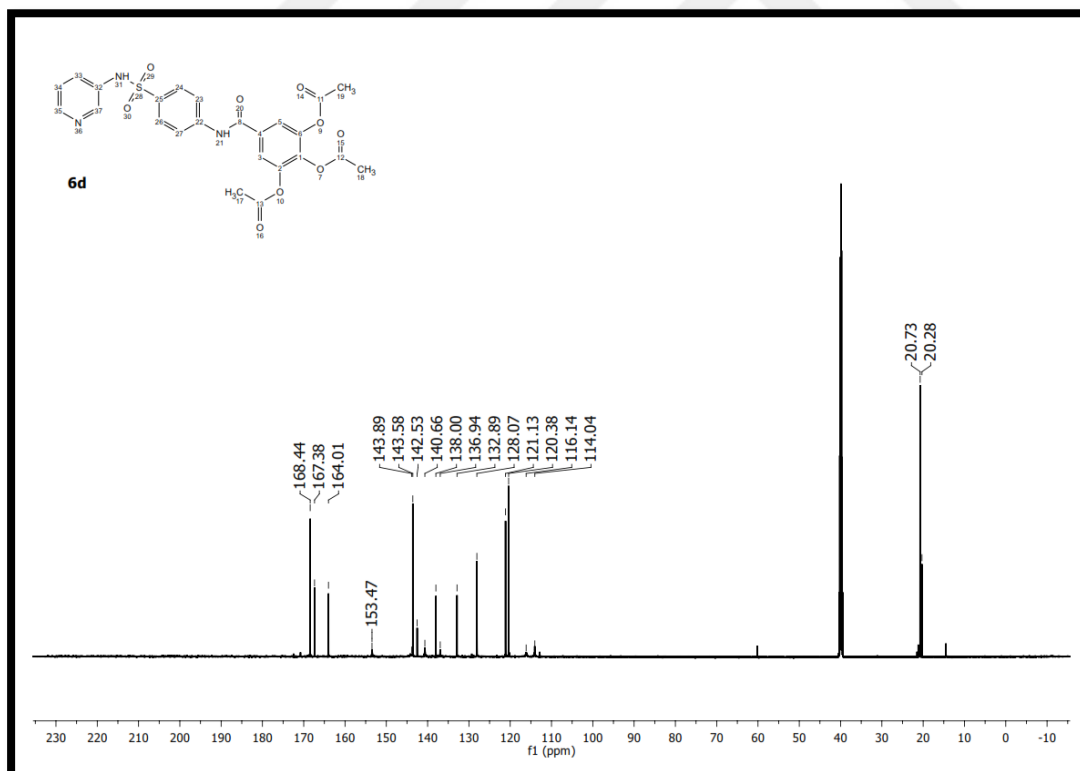
Şekil A.23 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



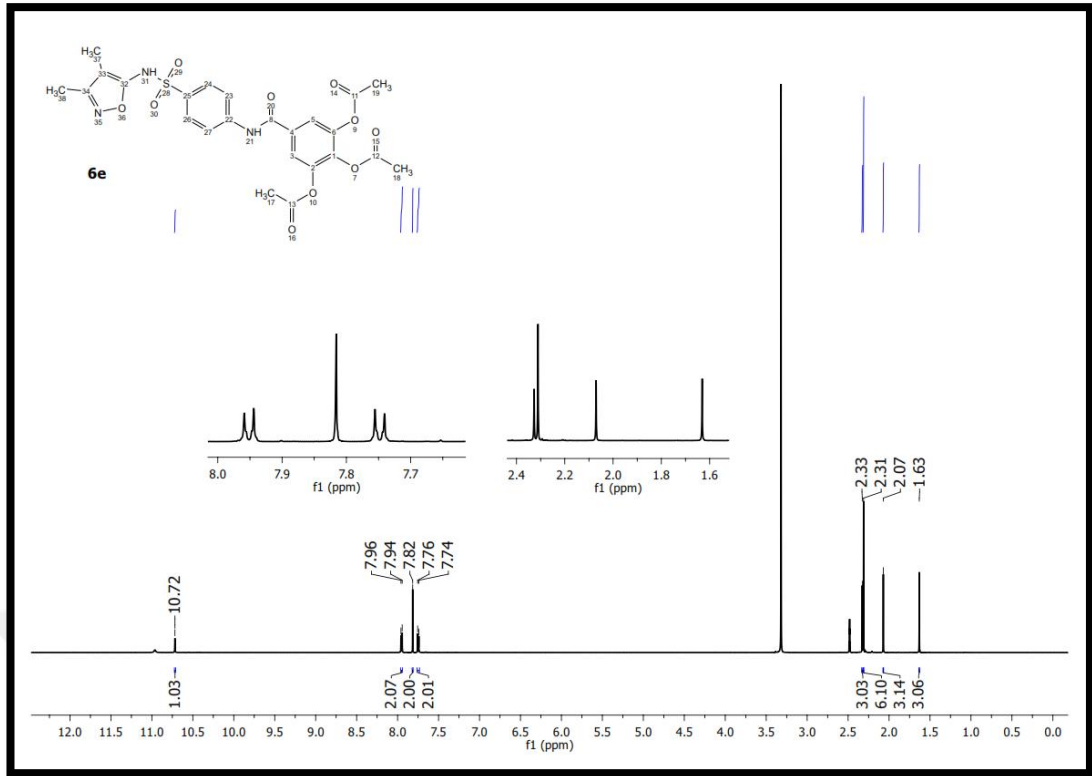
Şekil A.24 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



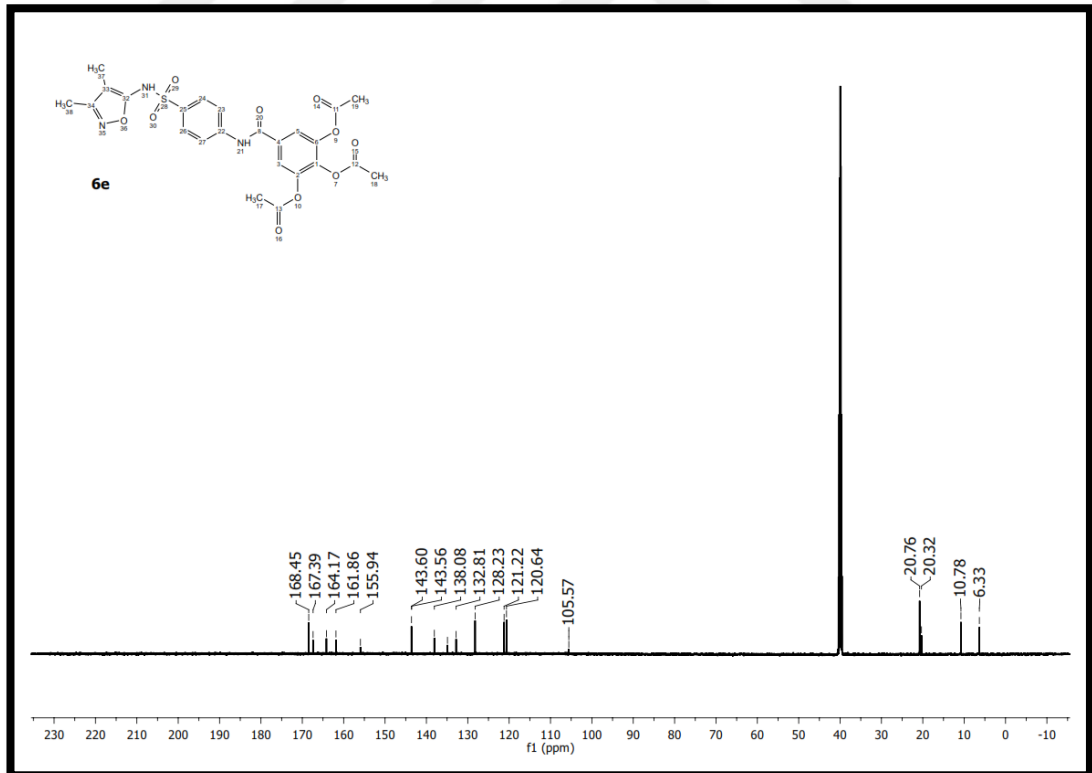
Şekil A.25 : N-(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



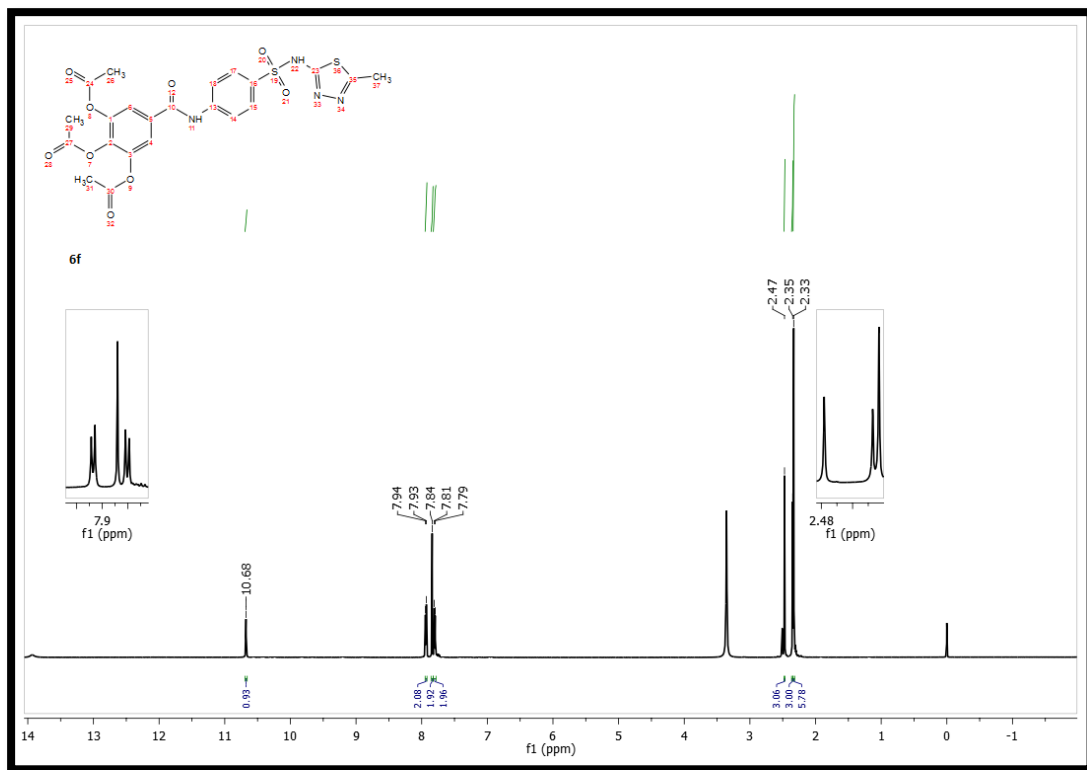
Şekil A.26 : N-(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



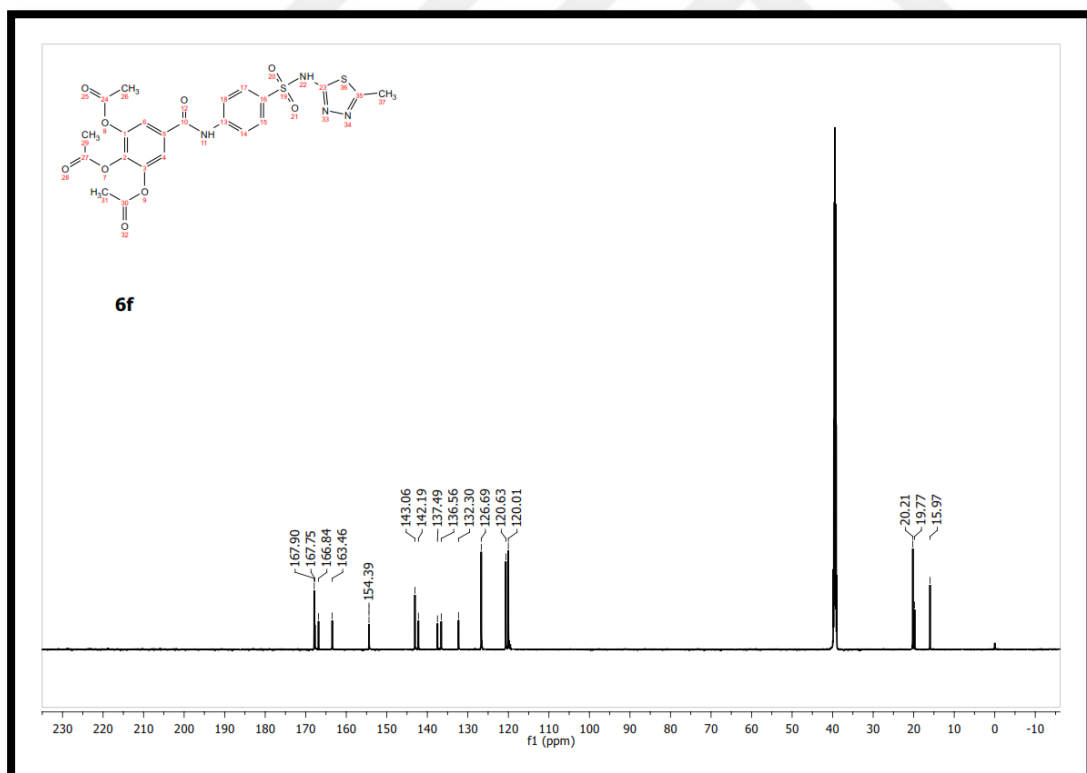
Şekil A.27 : *N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



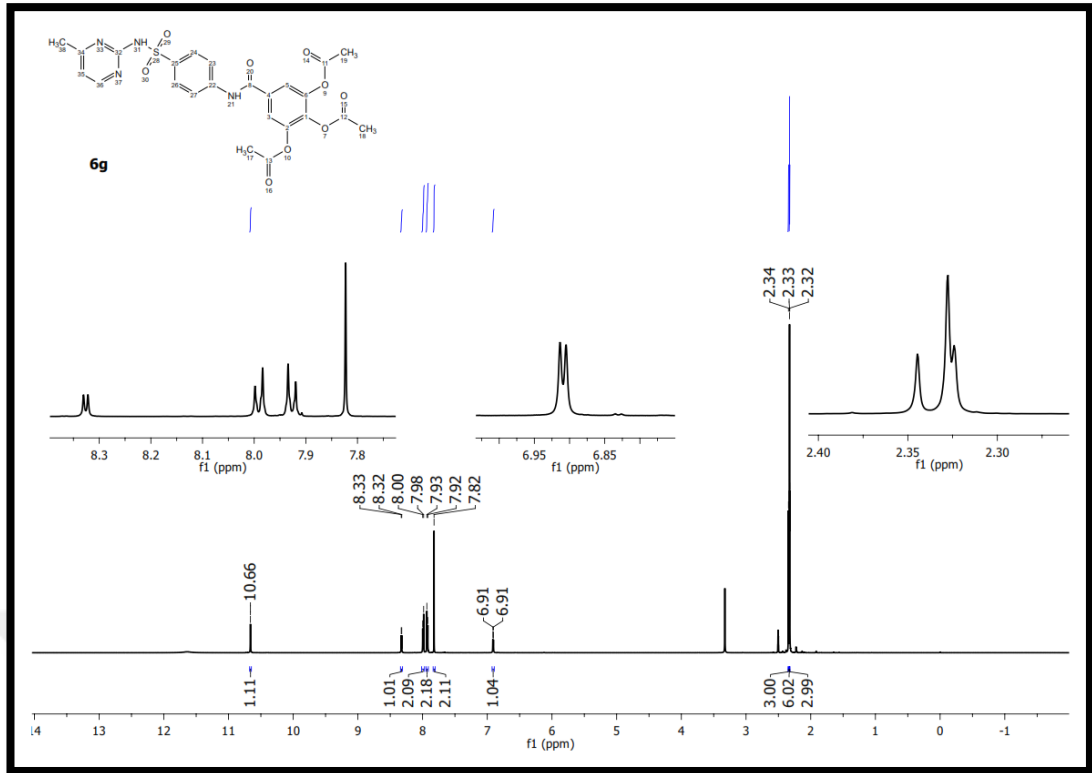
Şekil A.28 : *N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



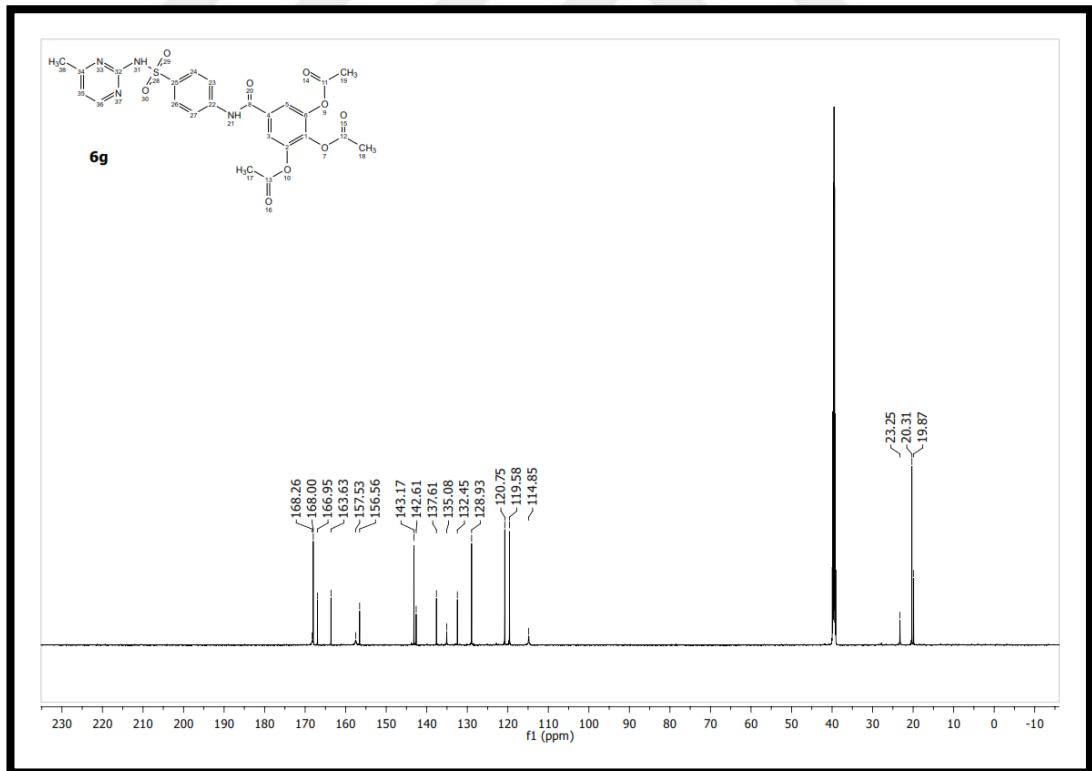
Şekil A.29 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



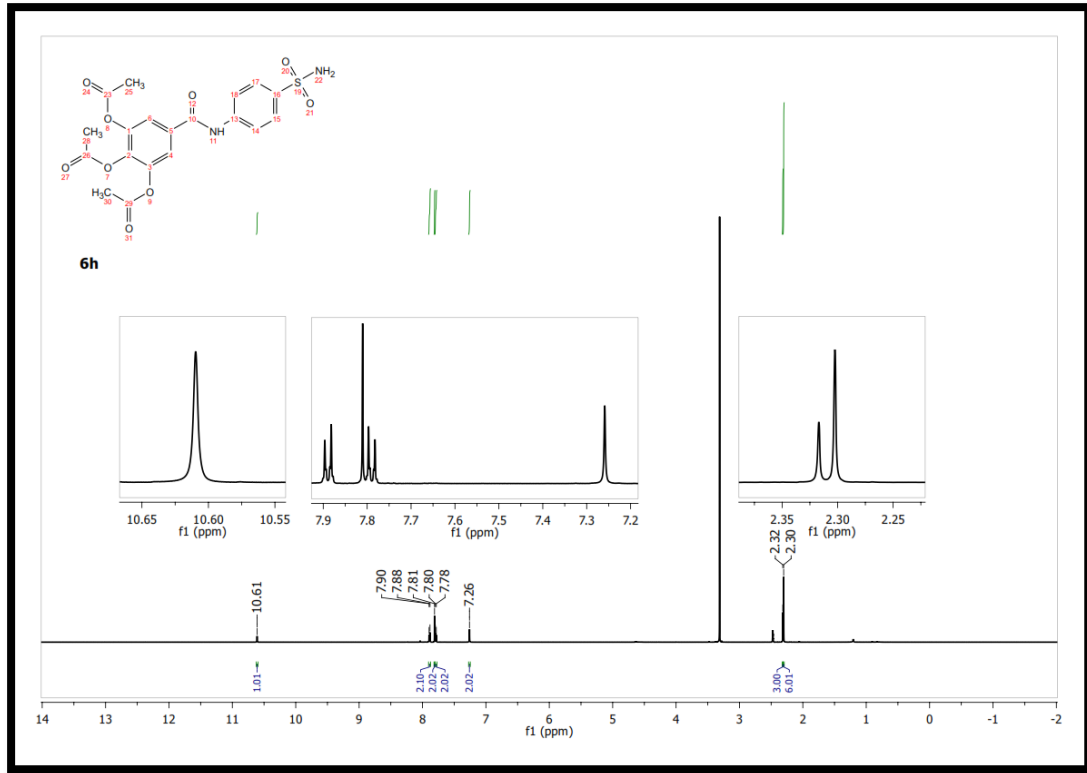
Şekil A.30 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



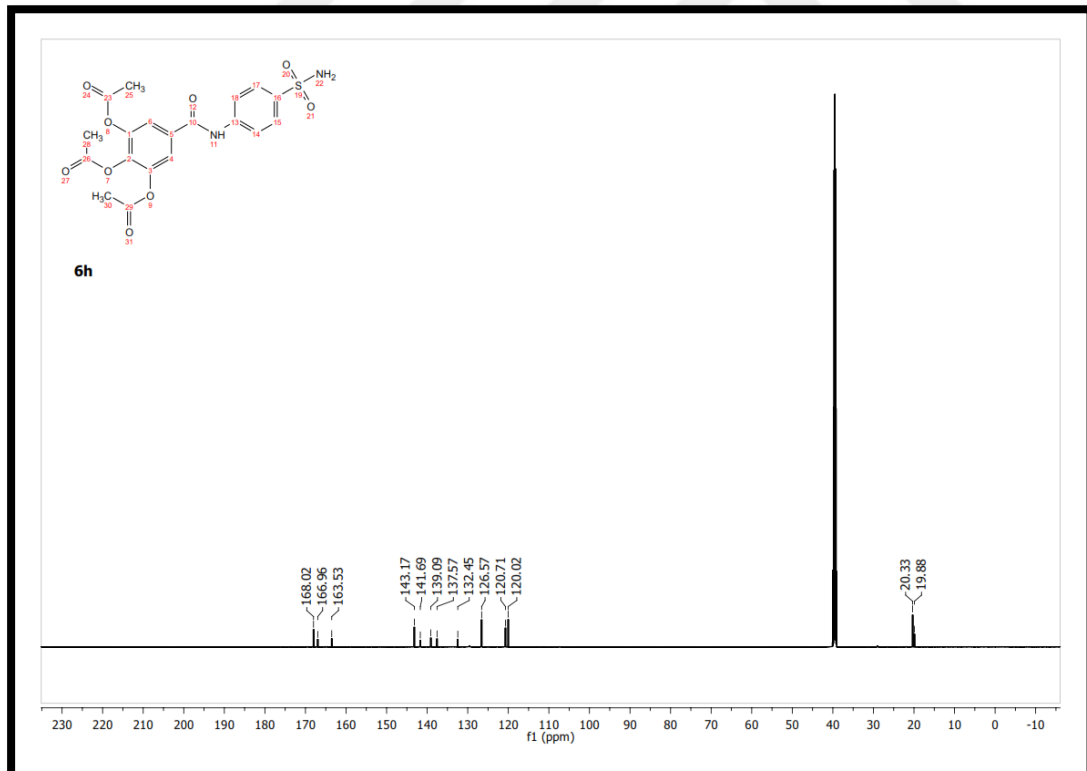
Şekil A.31 : *N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



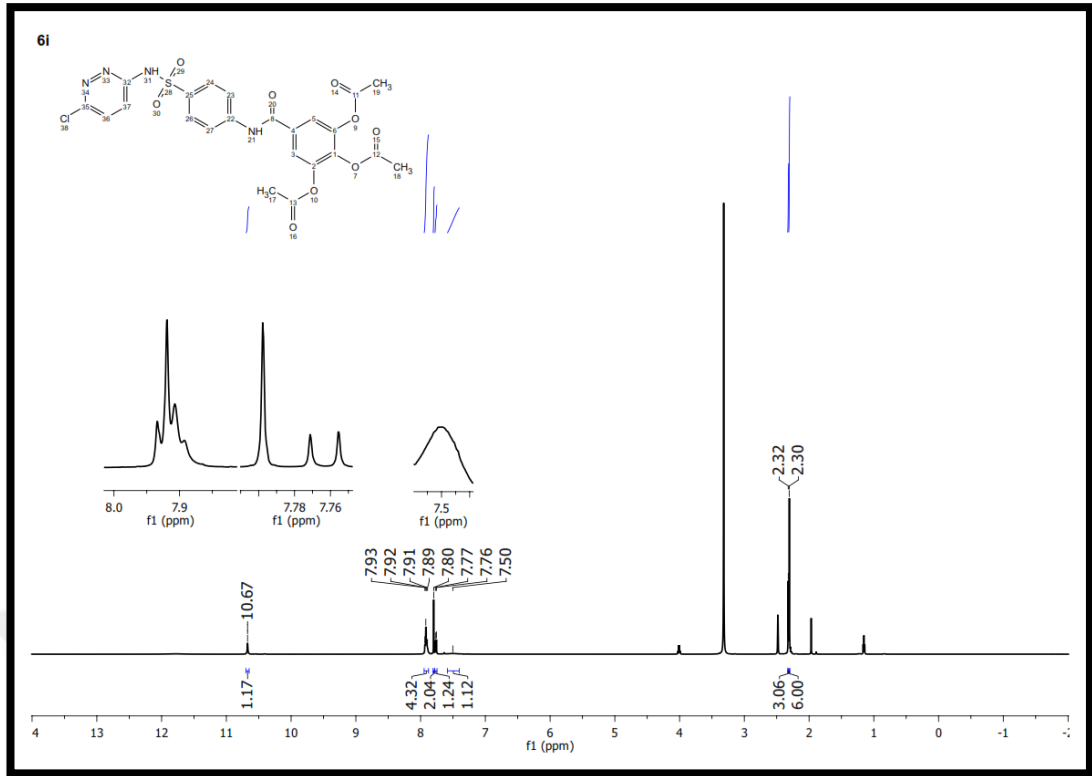
Şekil A.32 : *N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



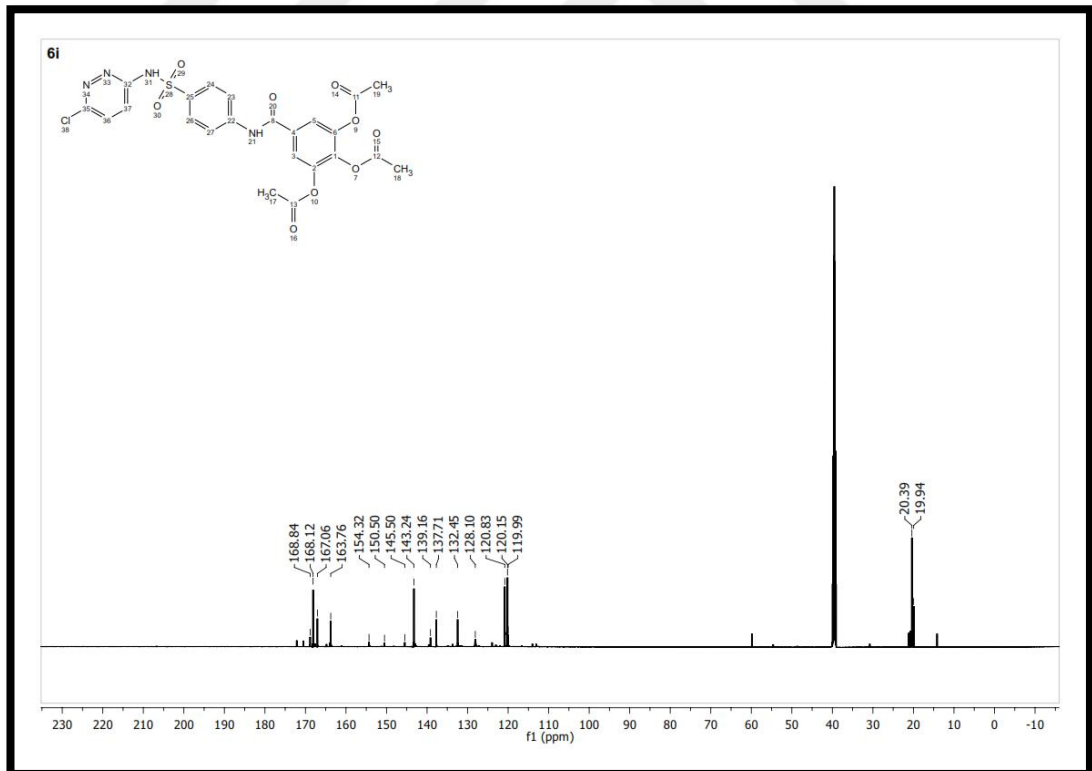
Şekil A.33 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



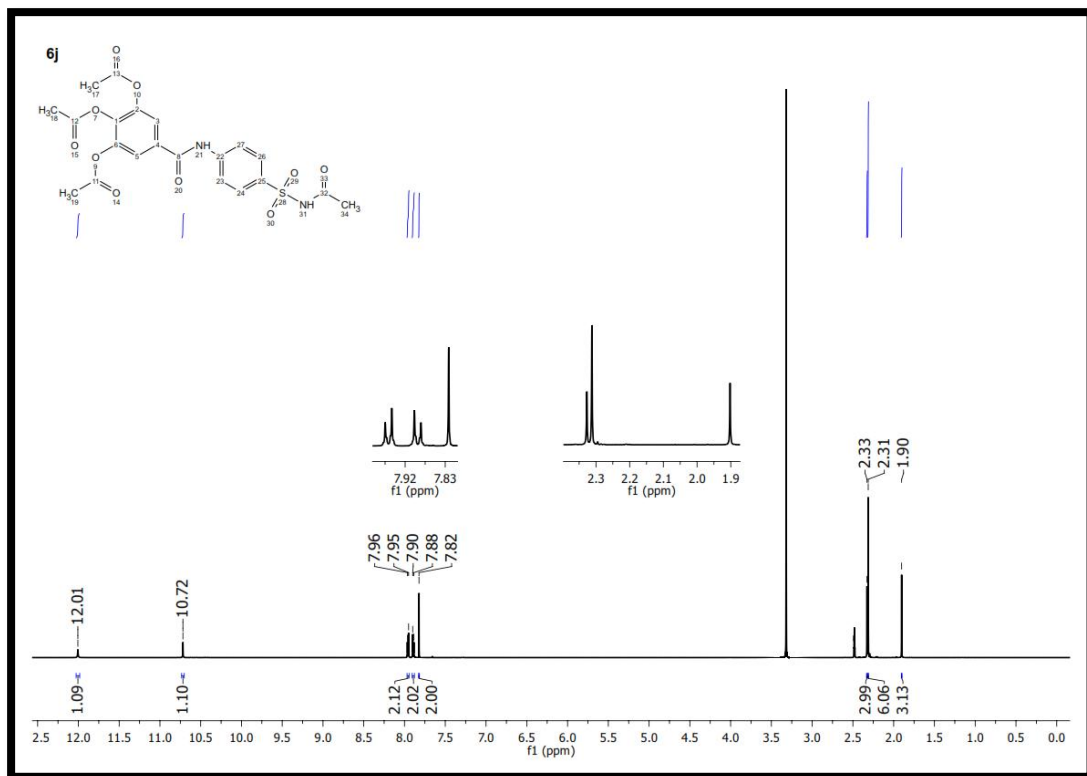
Şekil A.34 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



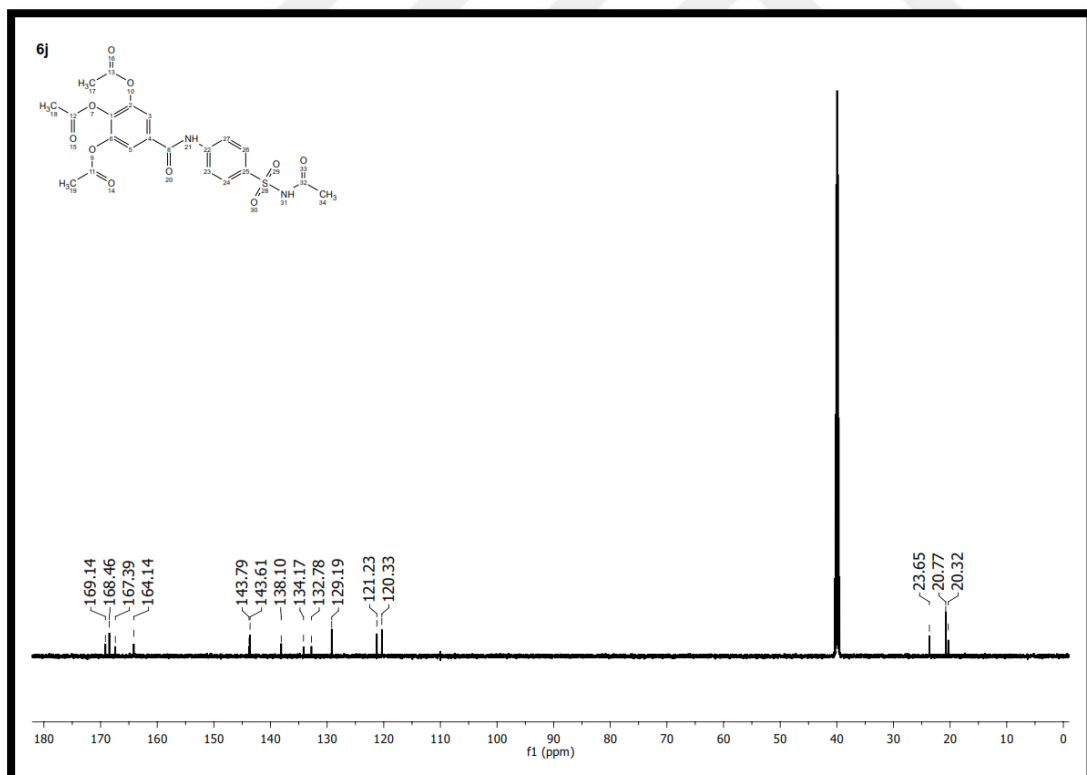
Şekil A.35 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



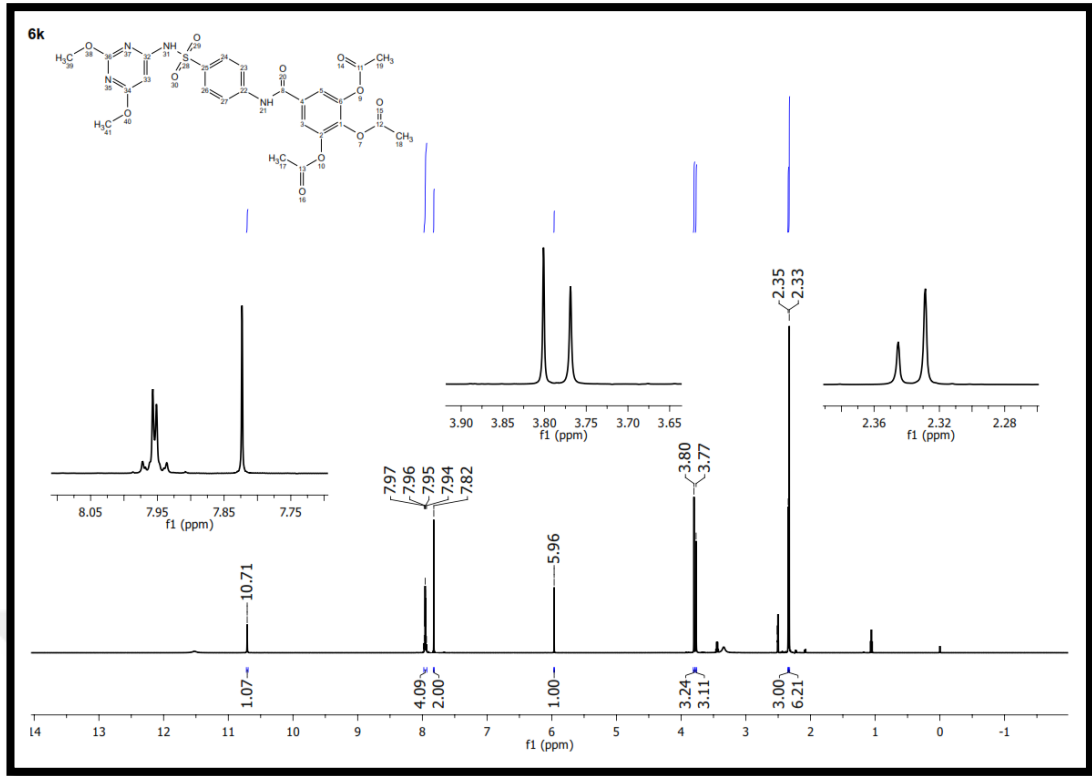
Şekil A.36 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



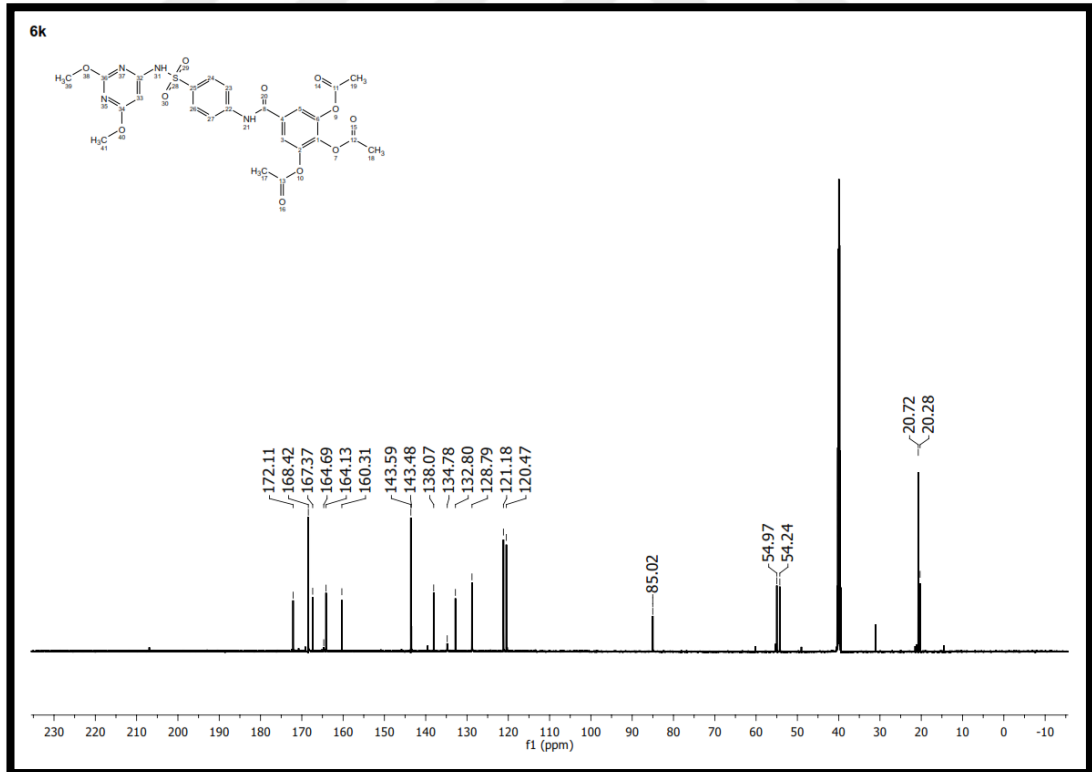
Şekil A.37 : *N*-(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



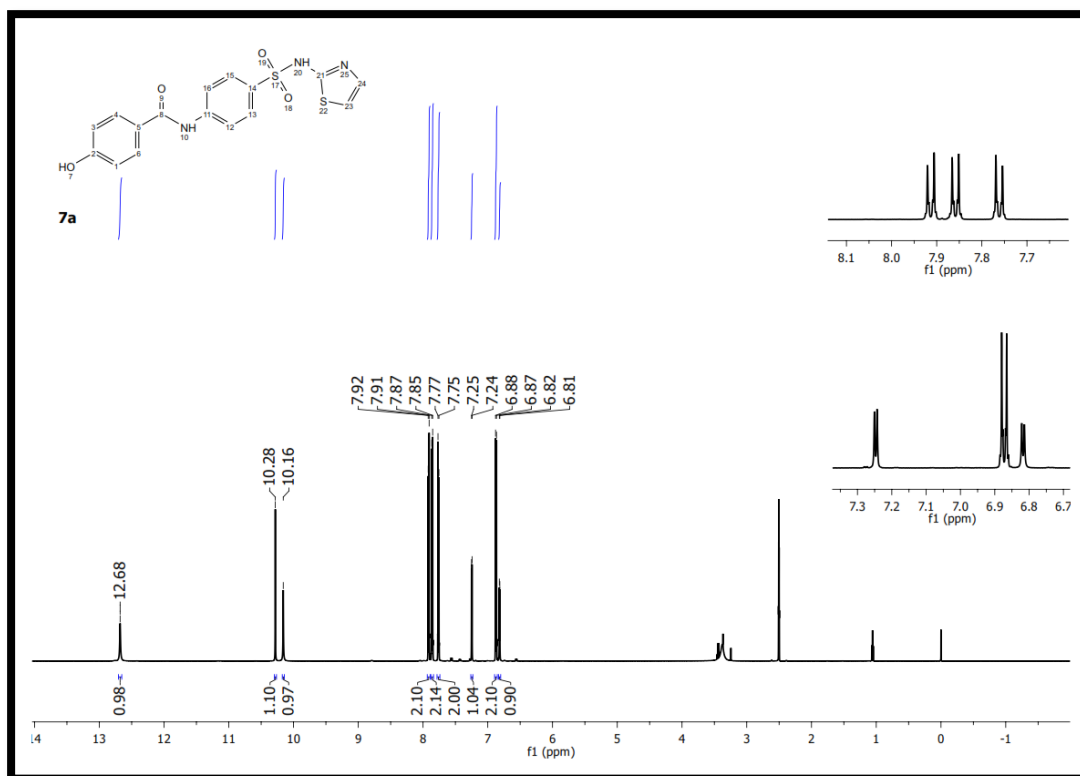
Şekil A.38 : *N*-(Sülfasetamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



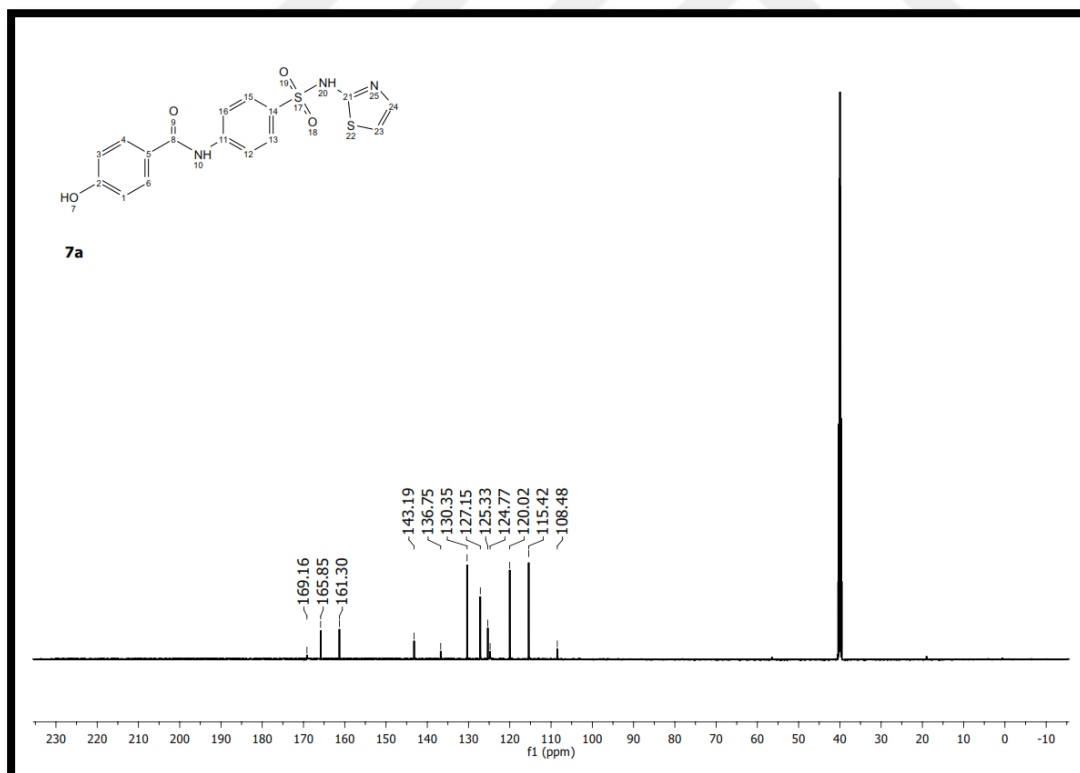
Şekil A.39 : *N*-(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



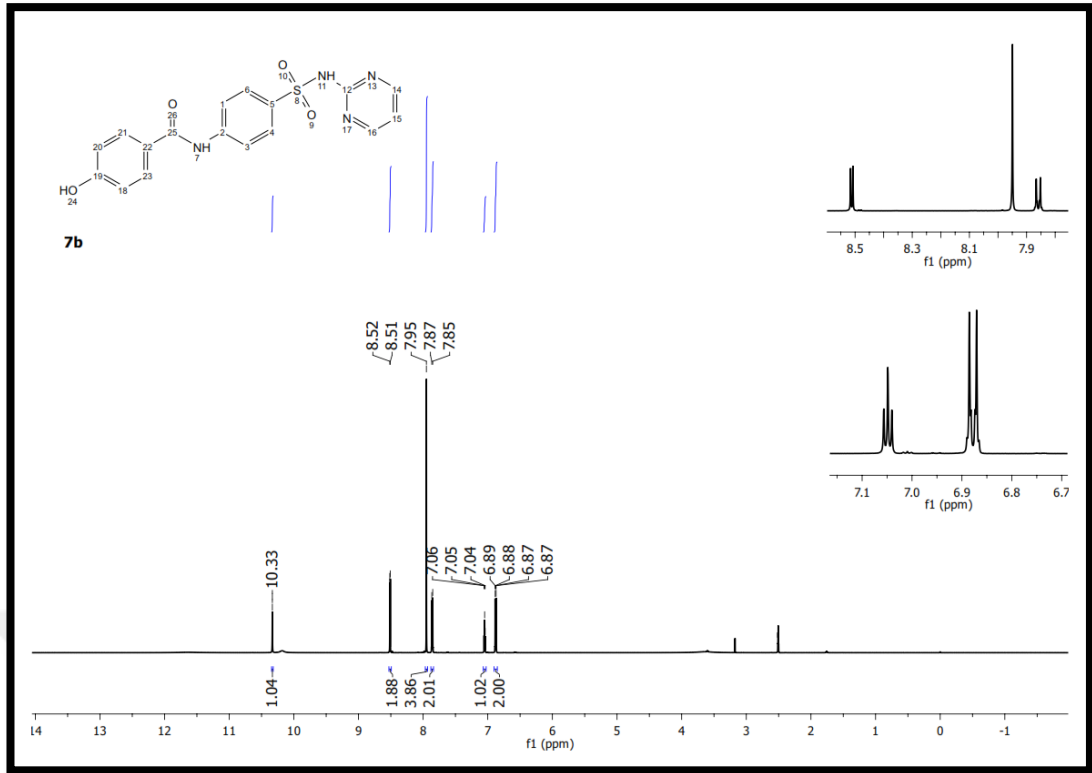
Şekil A.40 : *N*-(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



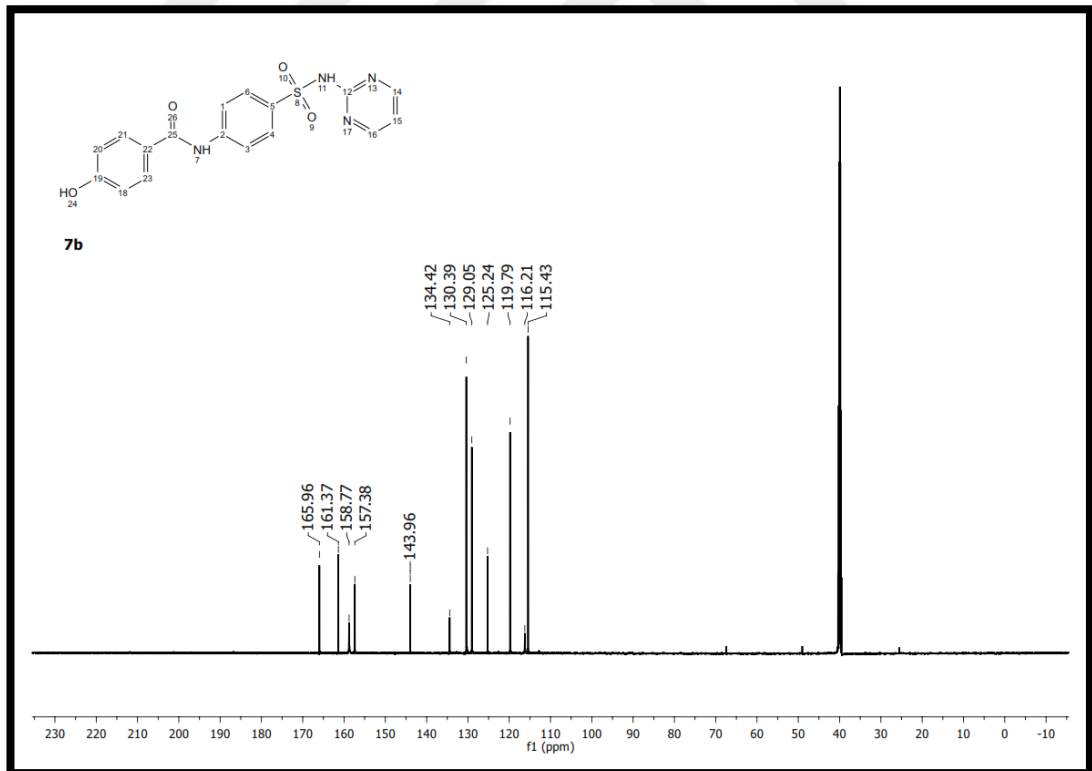
Şekil A.41 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



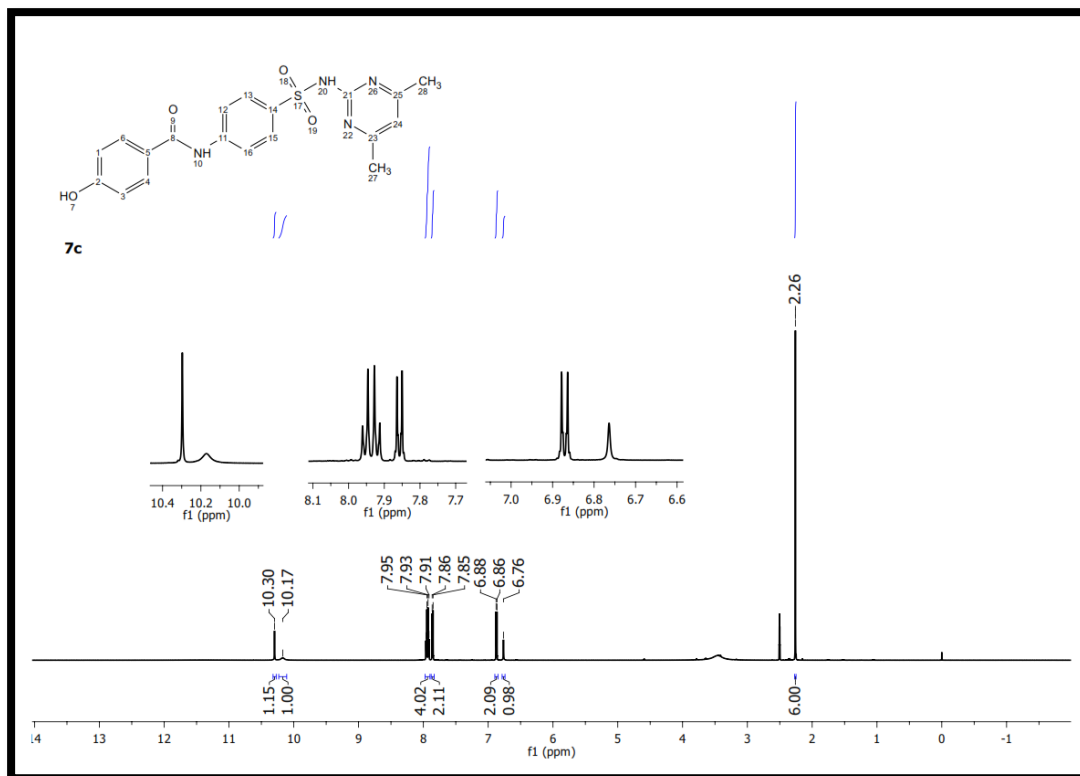
Şekil A.42 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



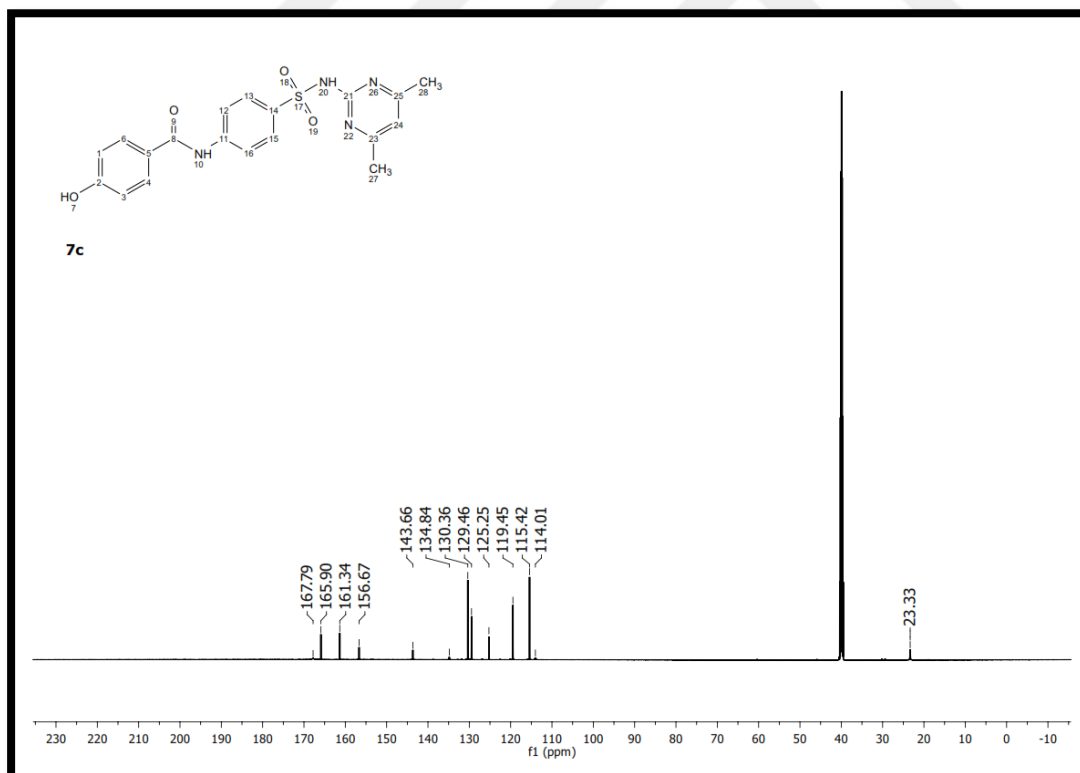
Şekil A.43 : *N*-(Sülfadiazin)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



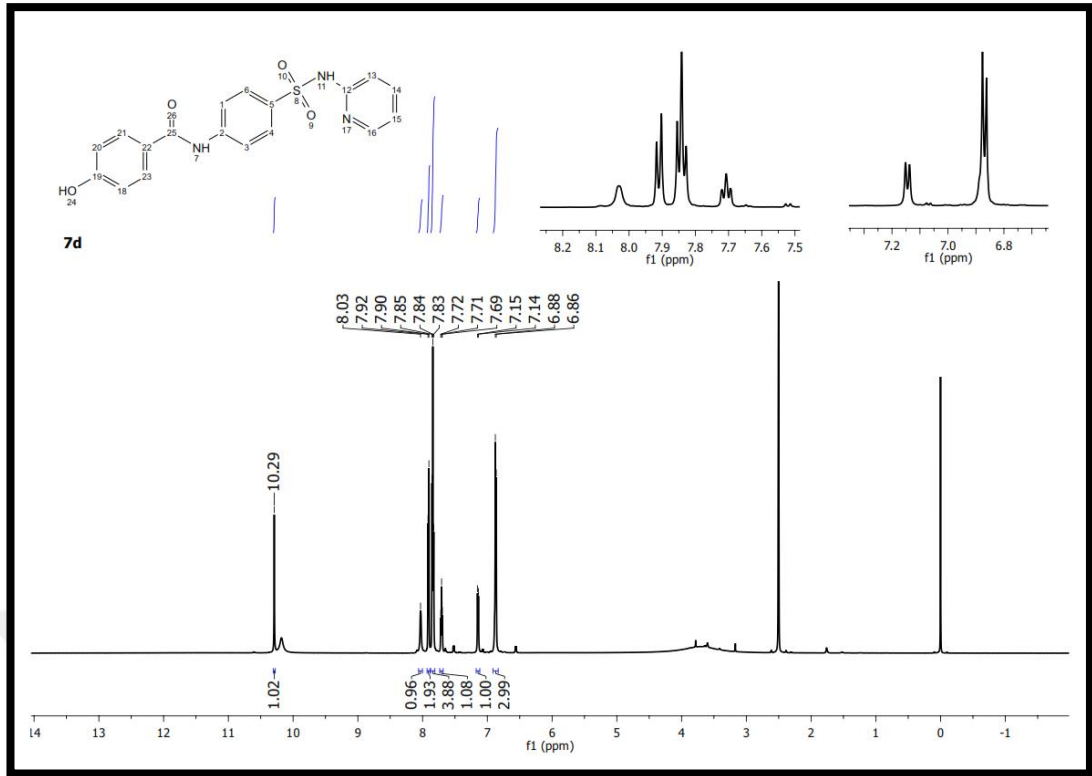
Şekil A.44 : *N*-(Sülfadiazin)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



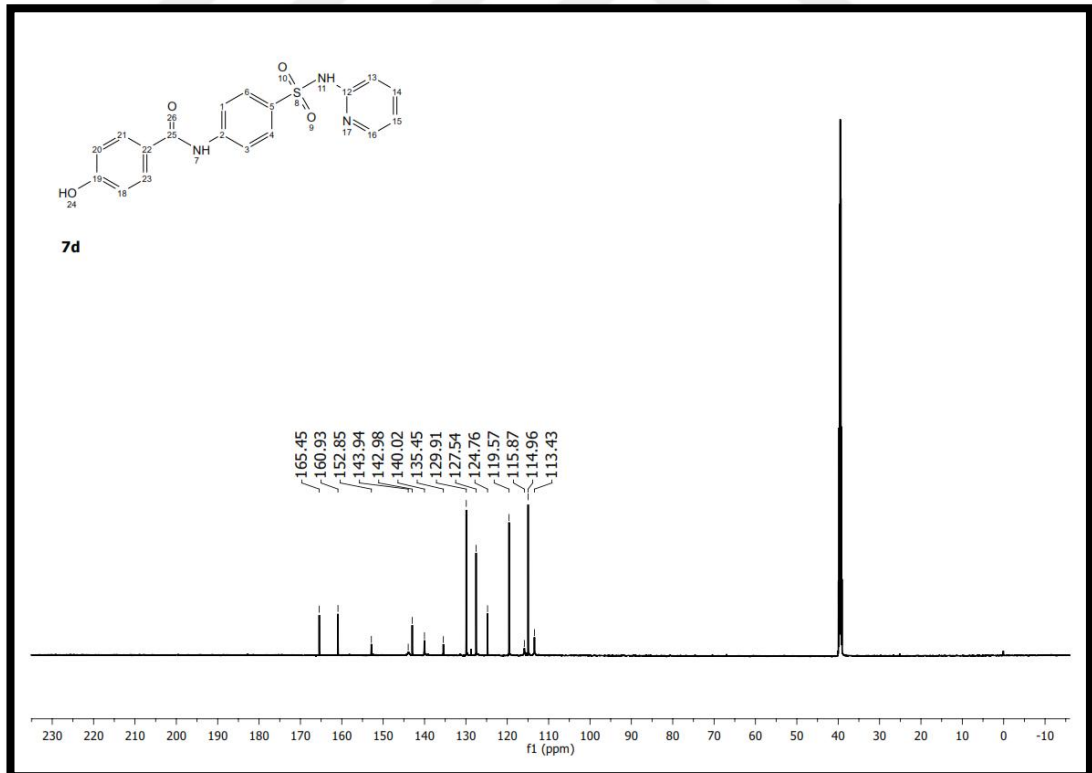
Şekil A.45 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



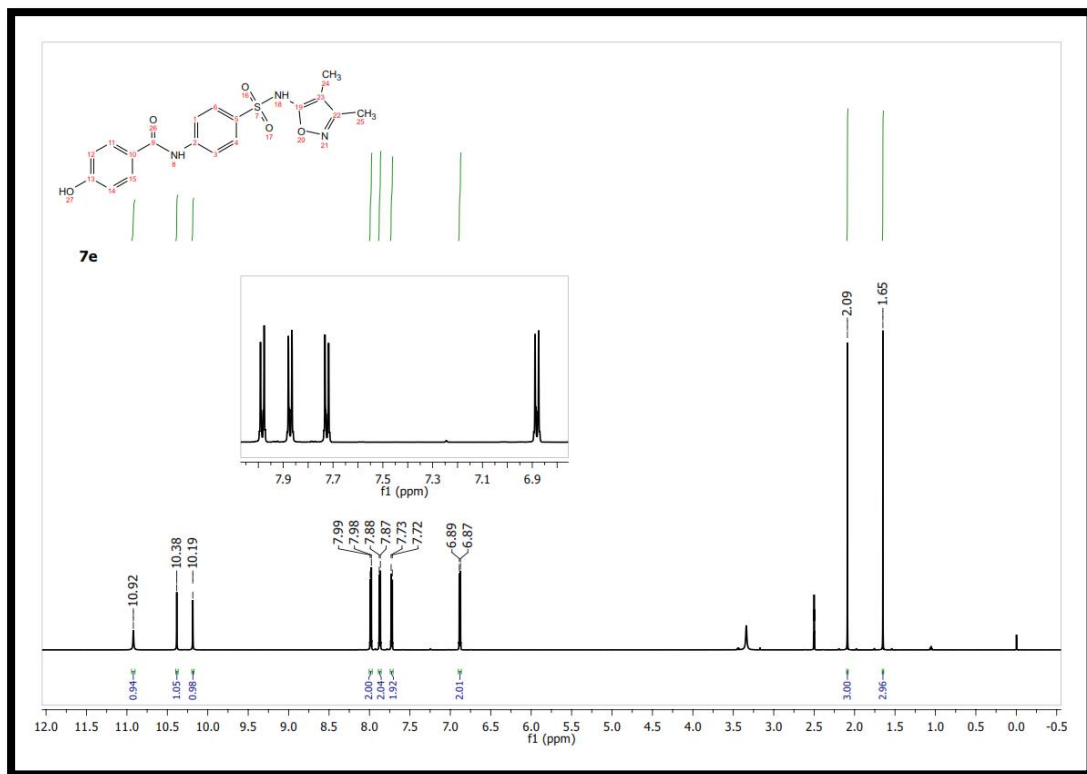
Şekil A.46 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



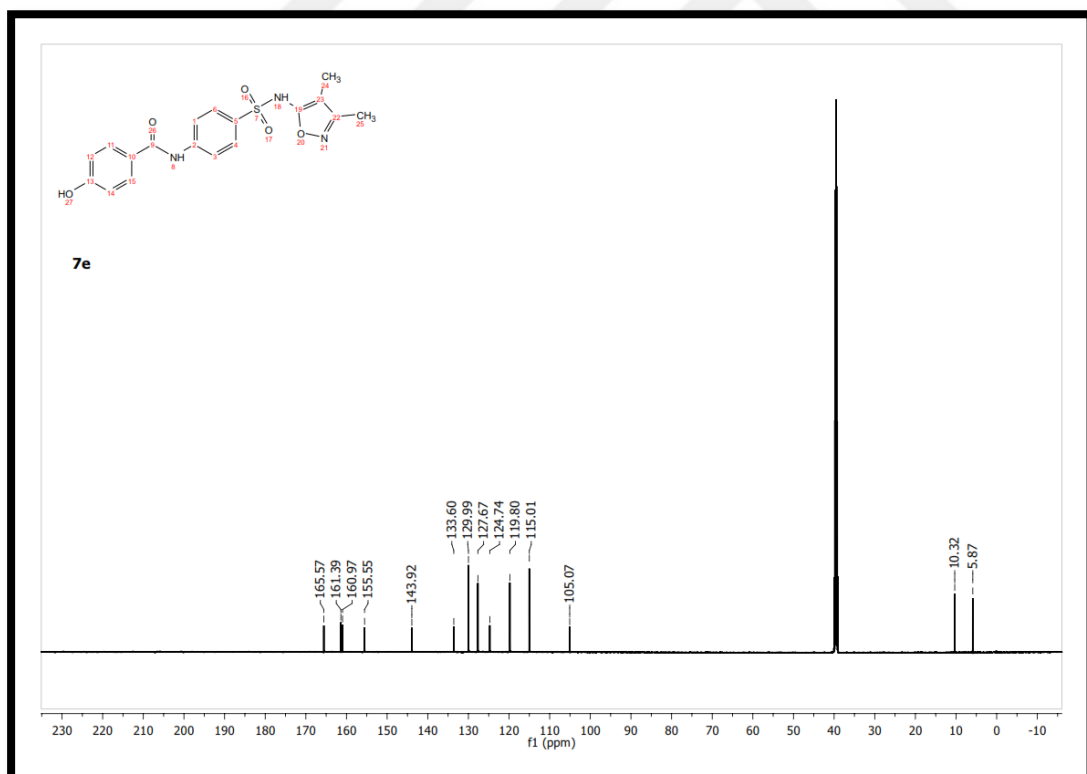
Şekil A.47 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



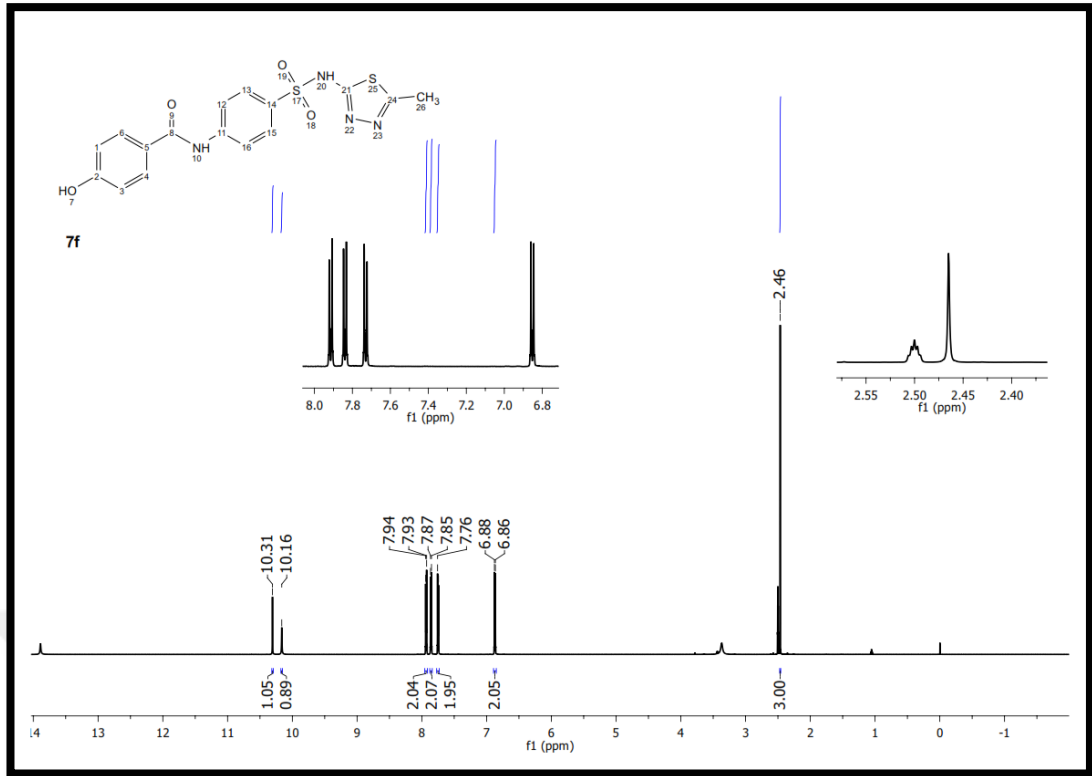
Şekil A.48 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



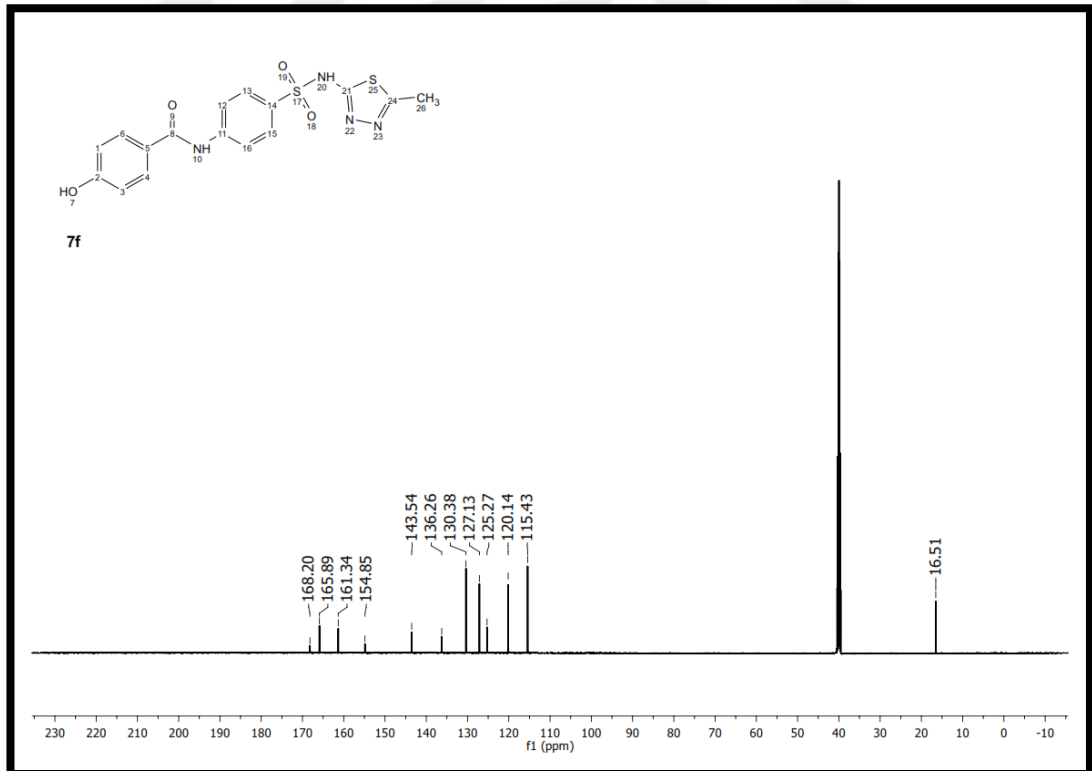
Şekil A.49 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-hidroksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



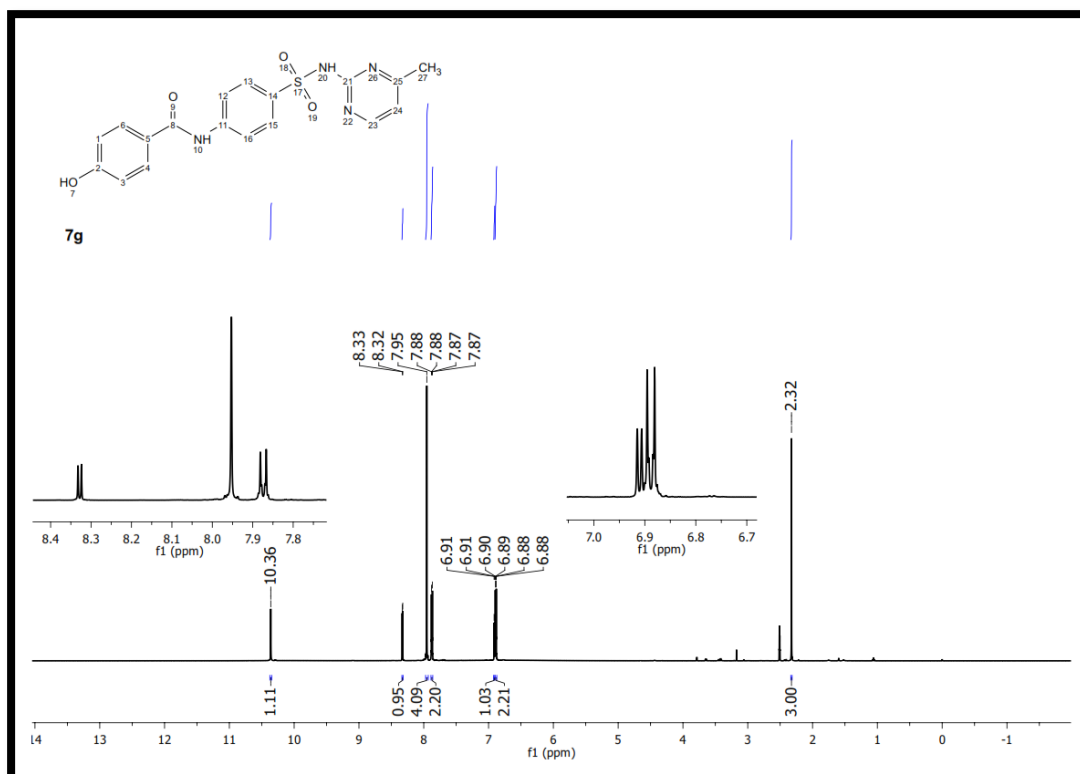
Şekil A.50 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-hidroksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



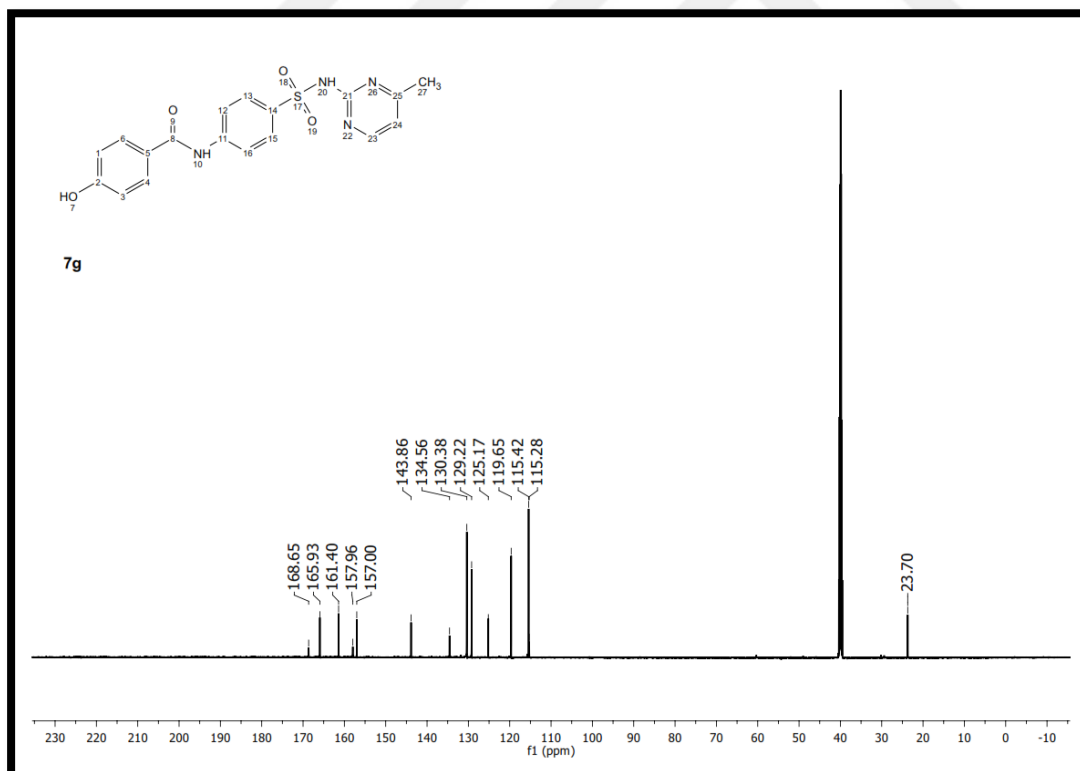
Şekil A.51 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



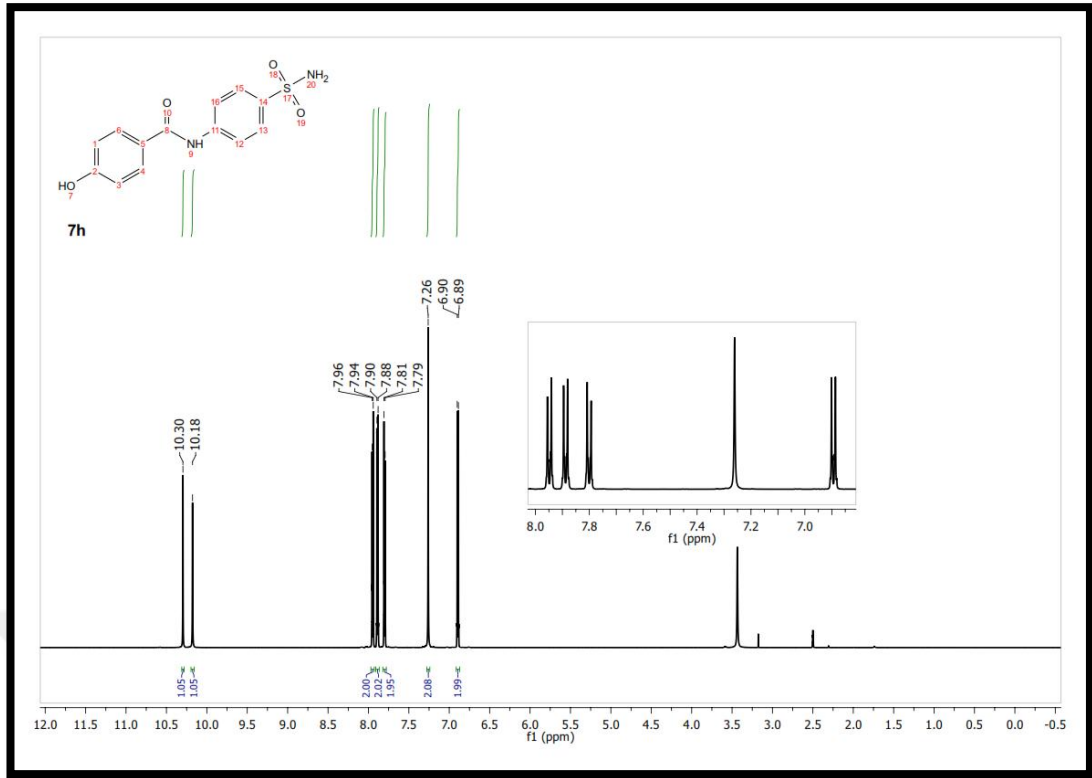
Şekil A.52 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



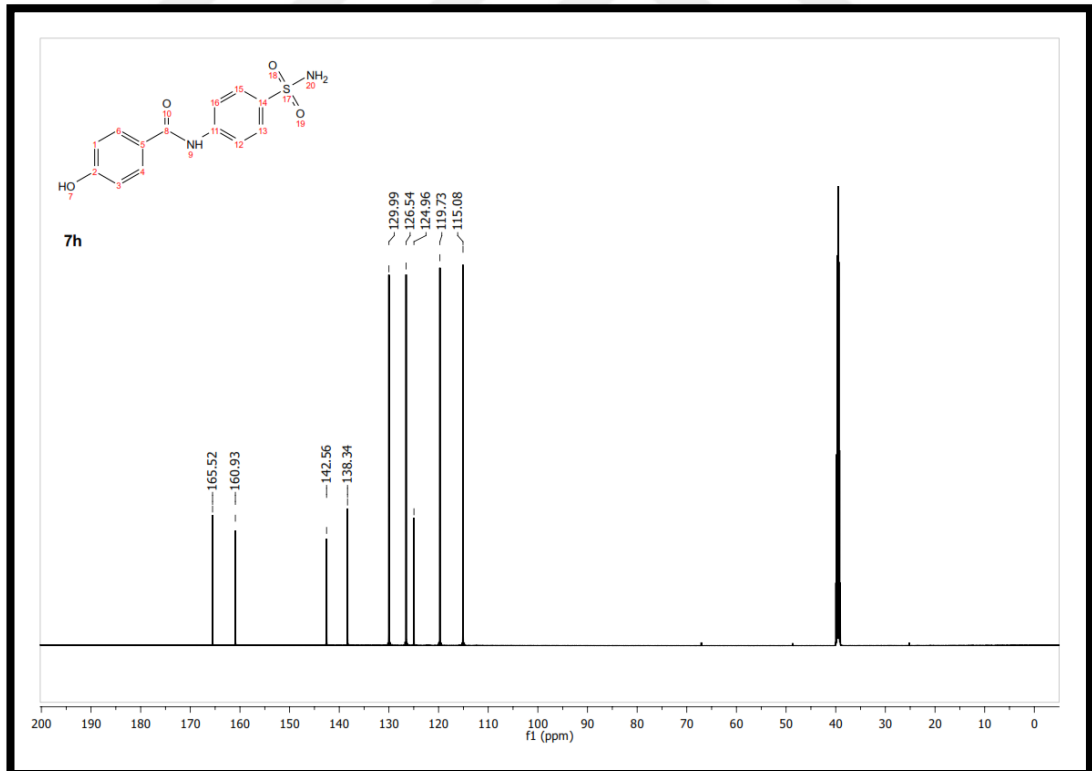
Şekil A.53 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



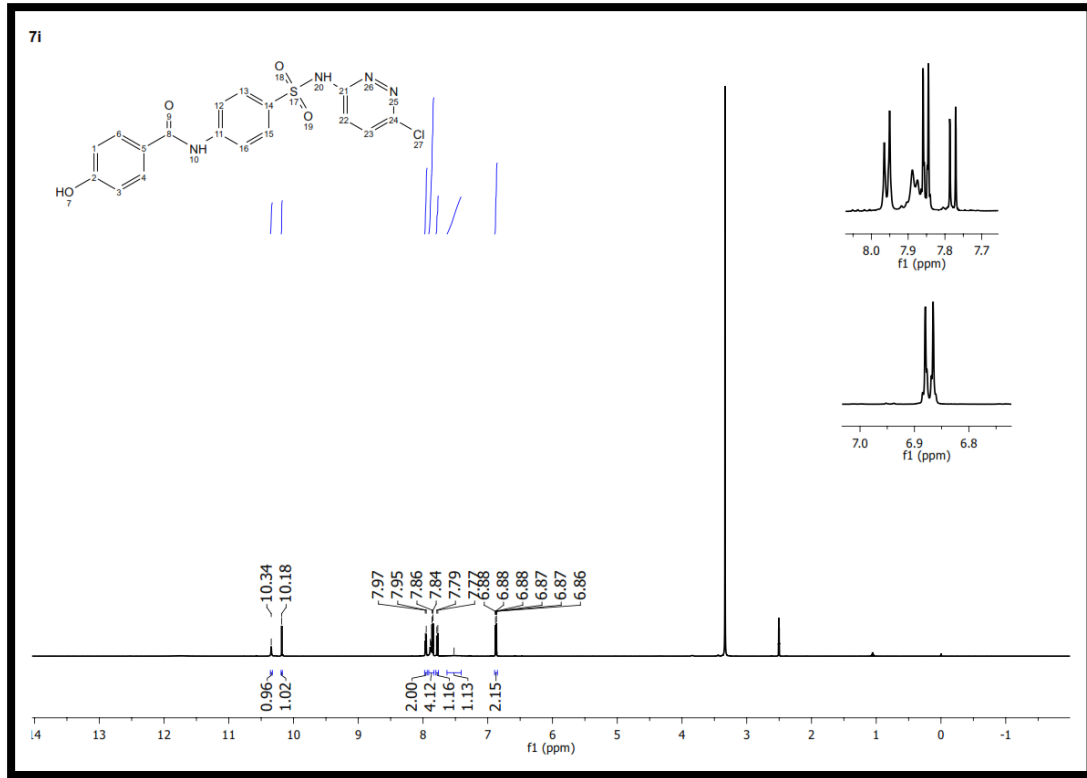
Şekil A.54 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



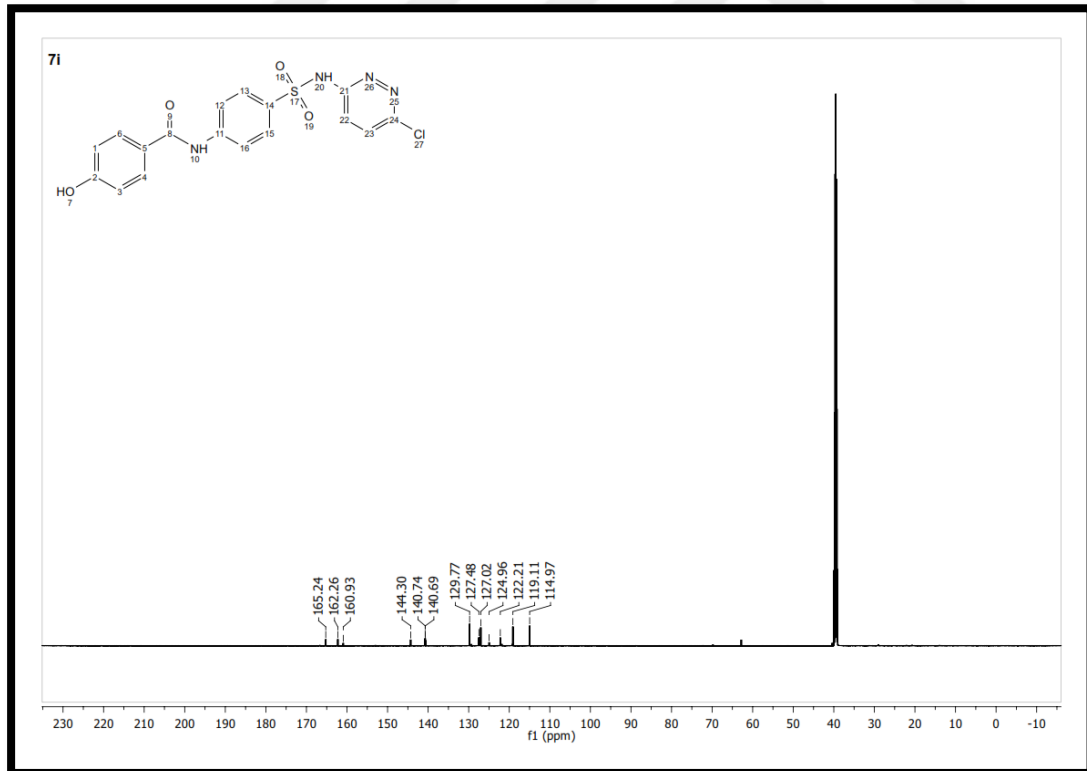
Şekil A.55 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-hidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



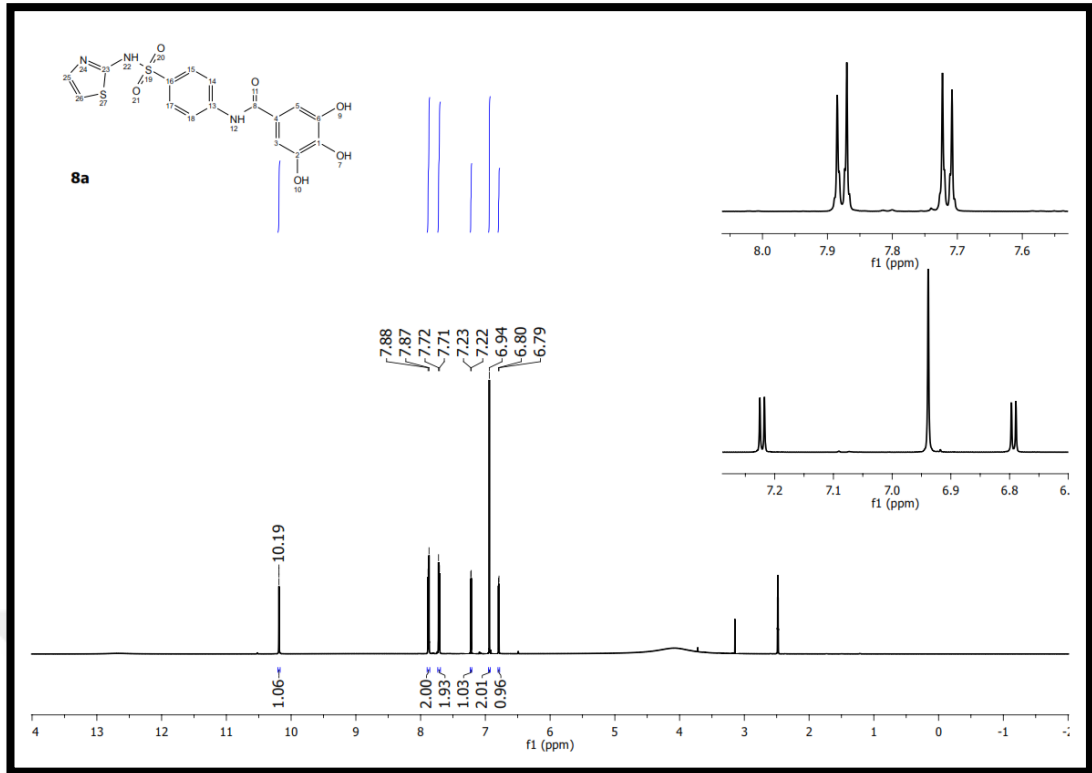
Şekil A.56 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-hidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



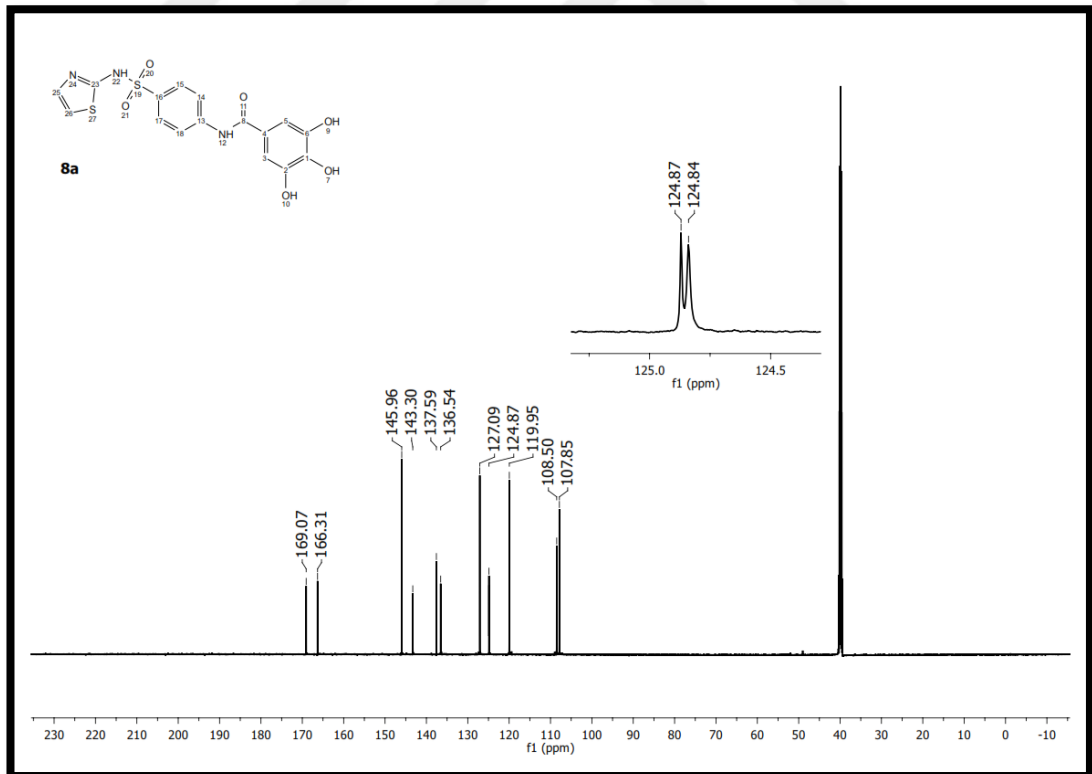
Şekil A.57 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-hidroksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



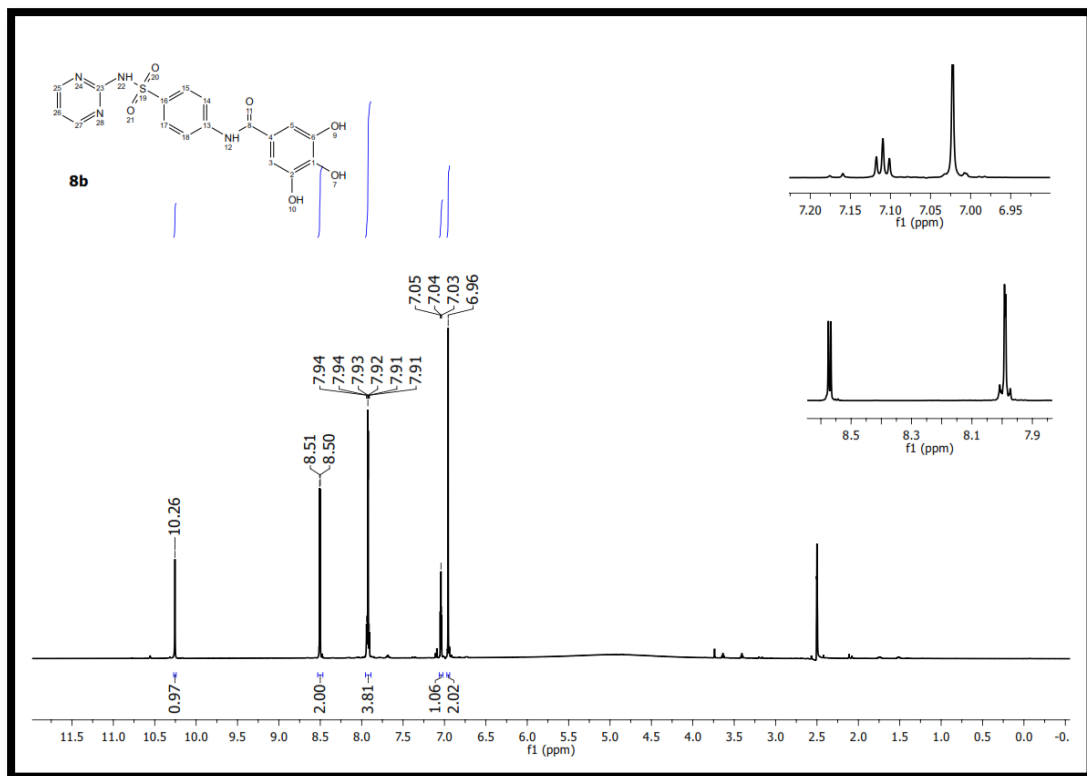
Şekil A.58 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-hidroksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



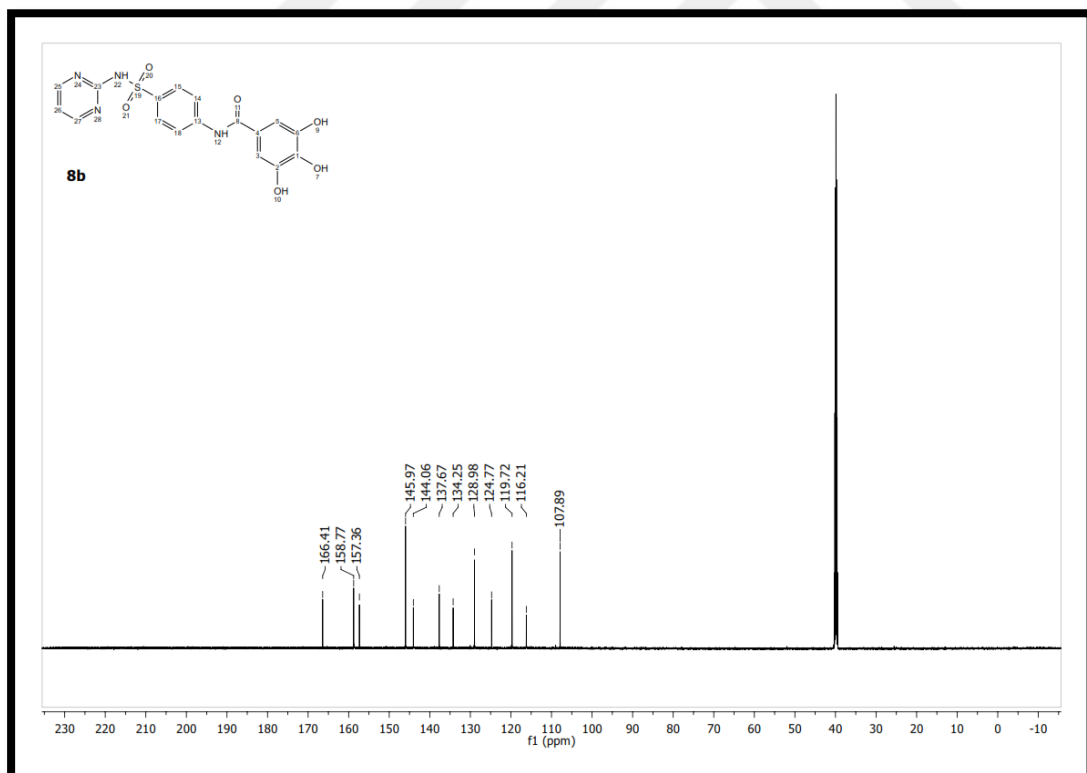
Şekil A.59 : *N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



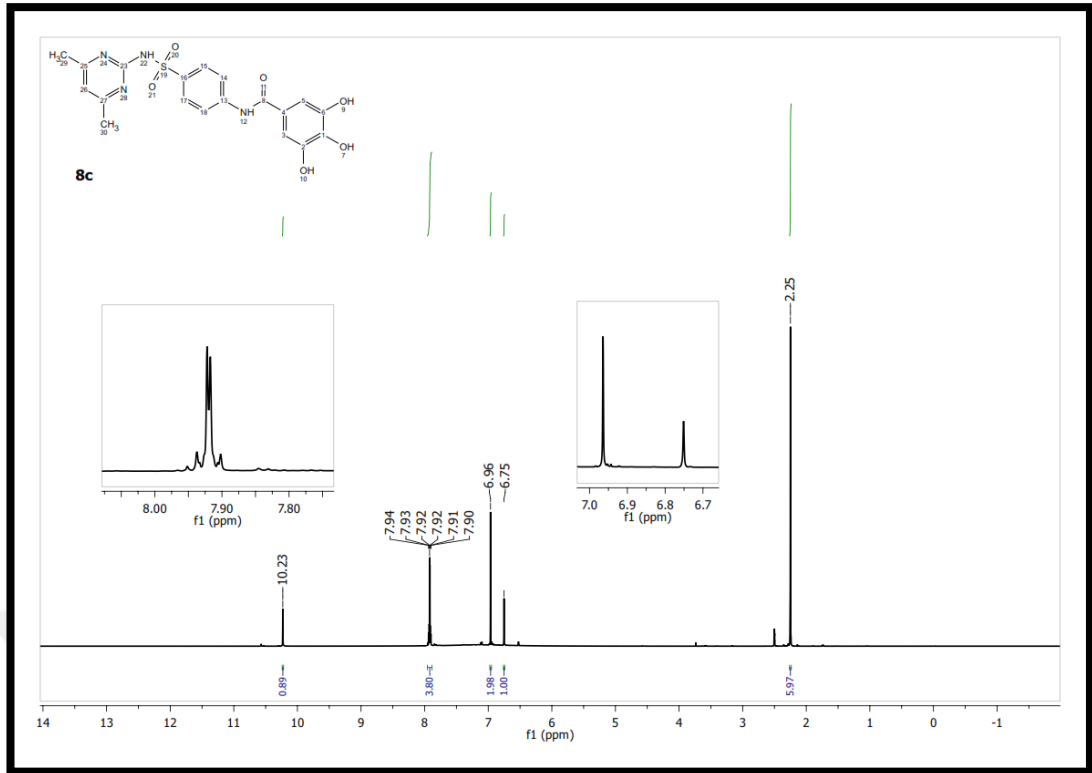
Şekil A.60 : *N*-(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



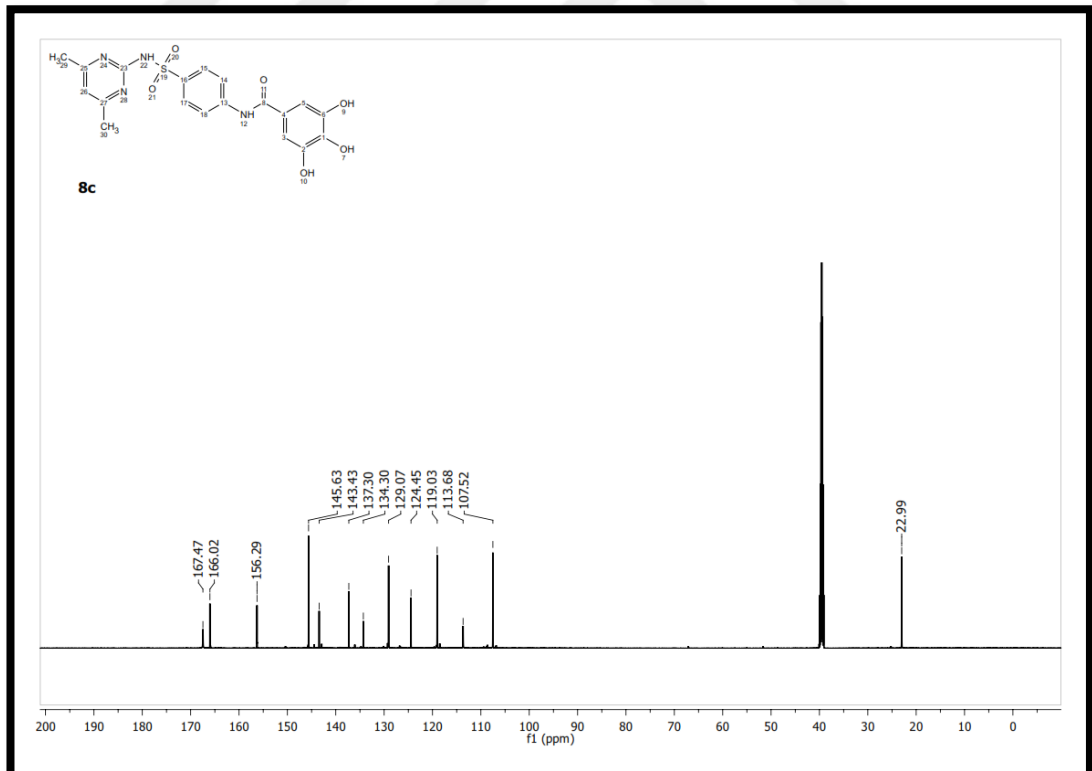
Şekil A.61 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



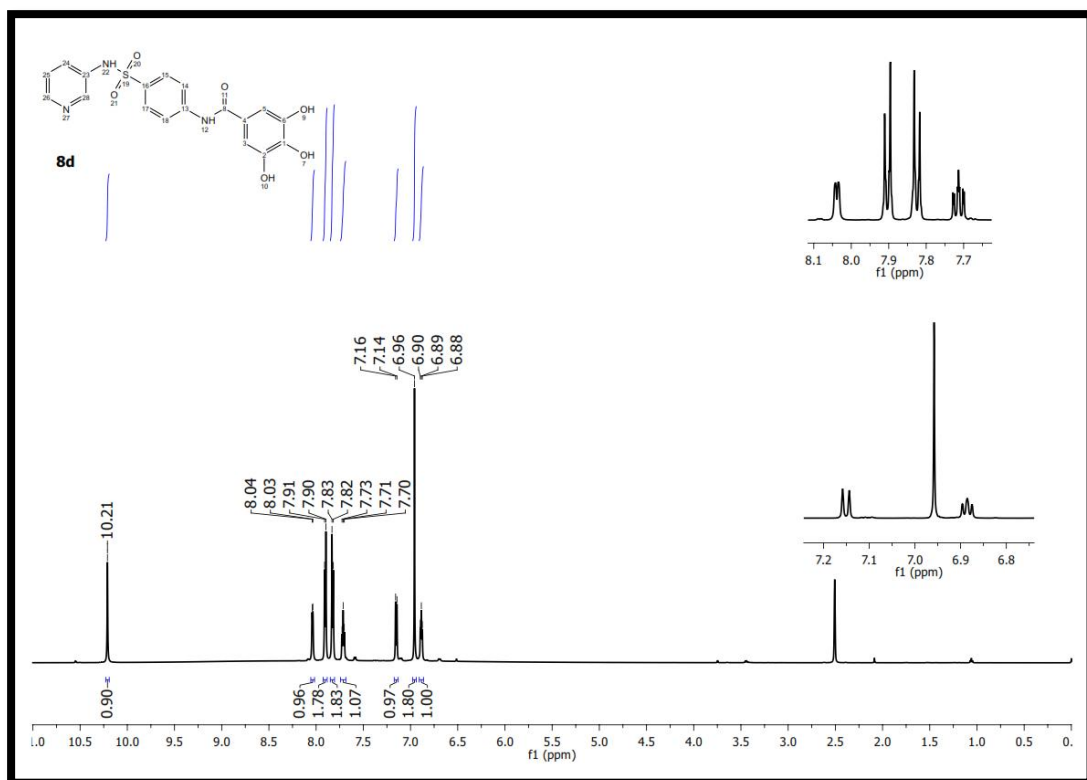
Şekil A.62 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



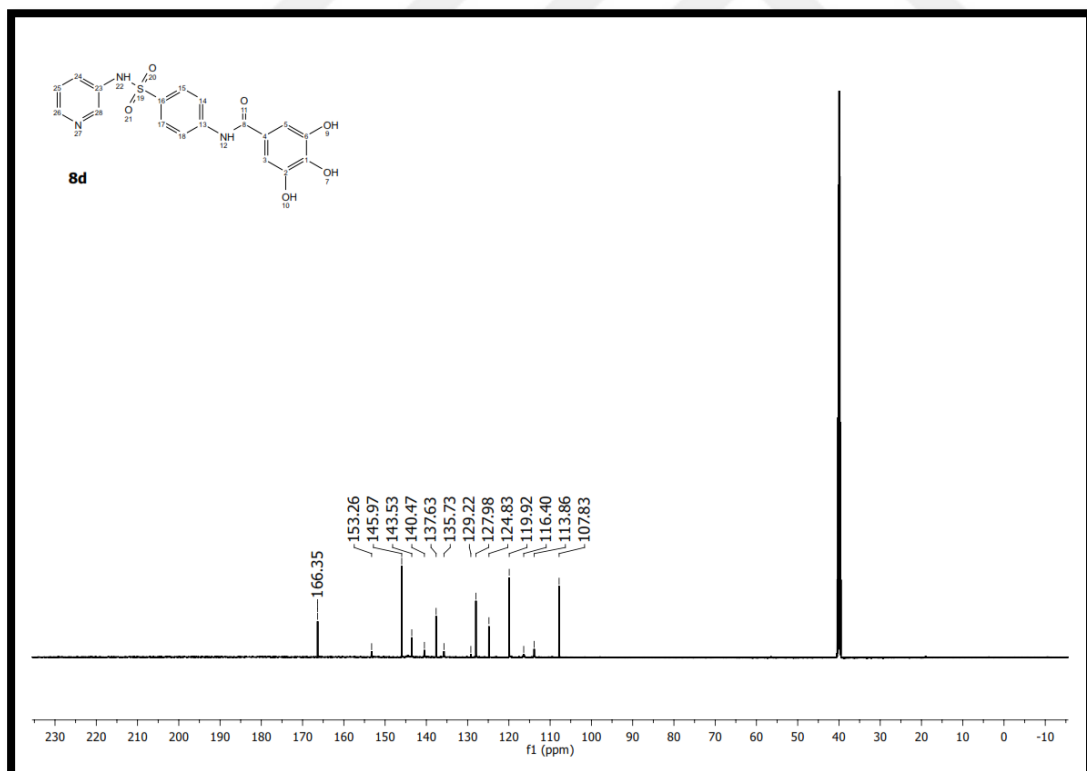
Şekil A.63 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



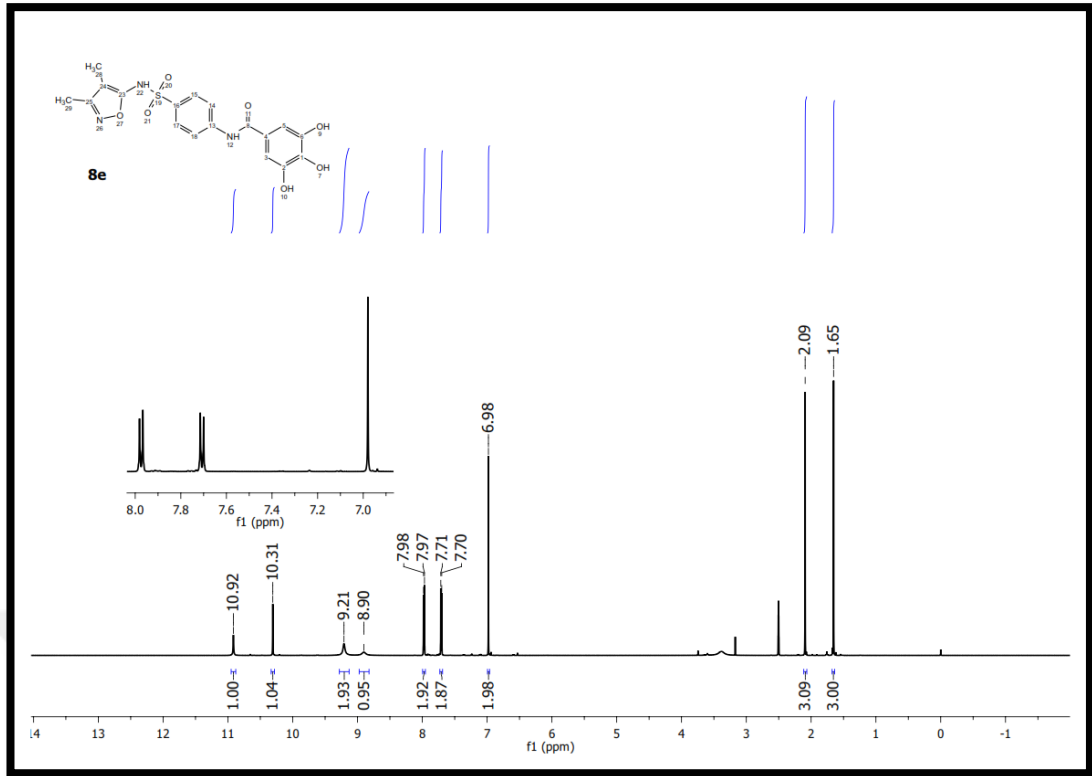
Şekil A.64 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



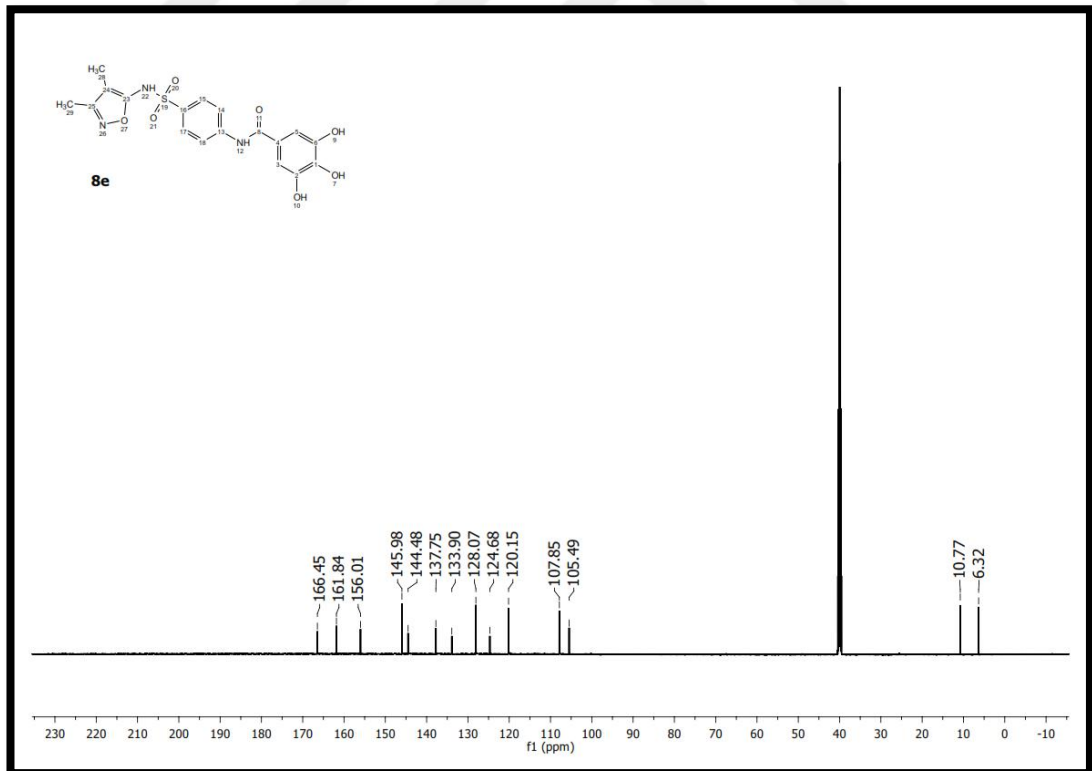
Şekil A.65 : *N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



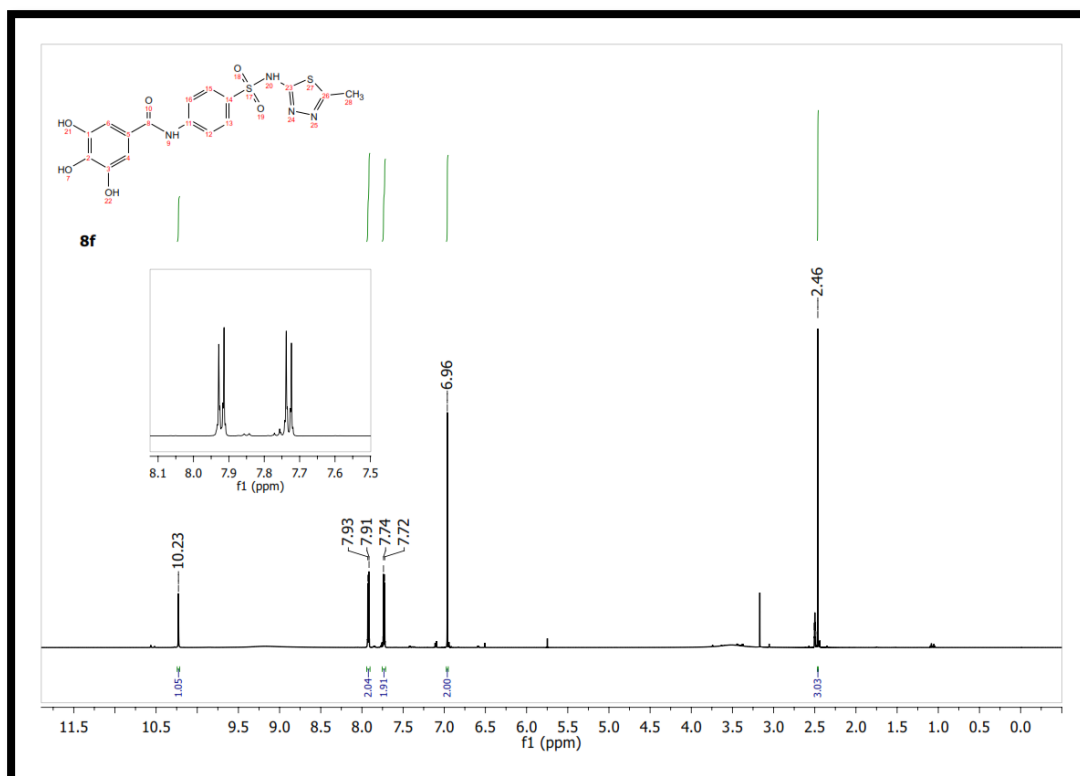
Şekil A.66 : *N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



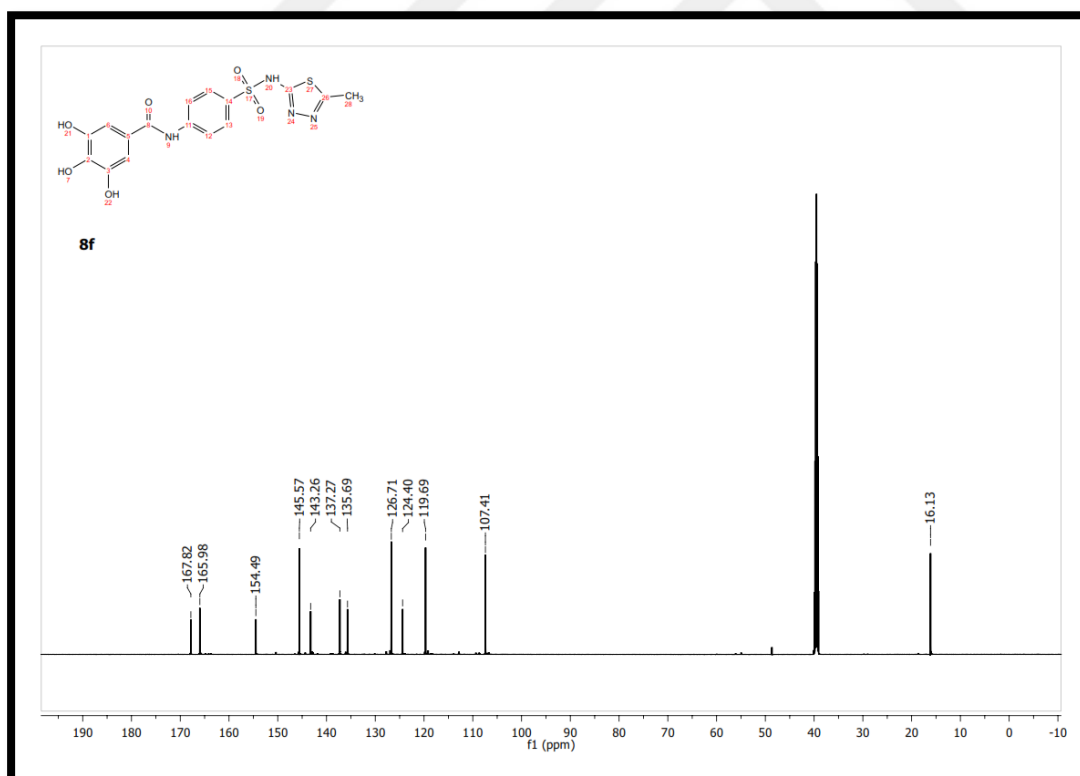
Şekil A.67 : *N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



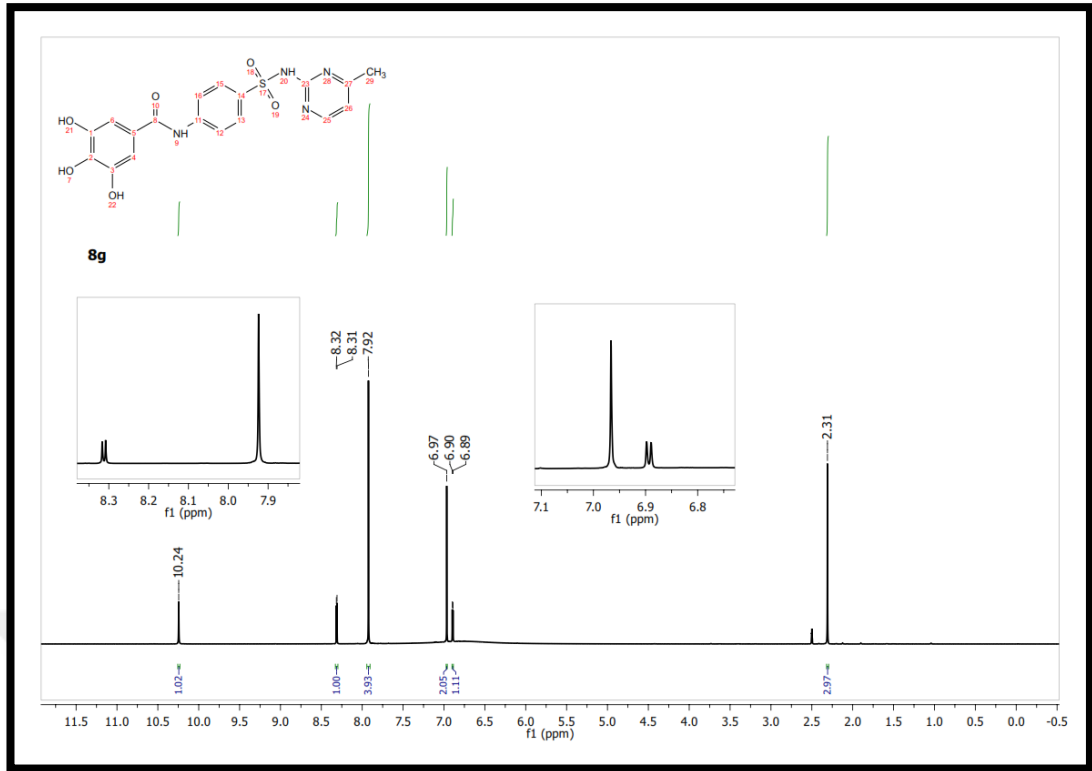
Şekil A.68 : *N*-(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.



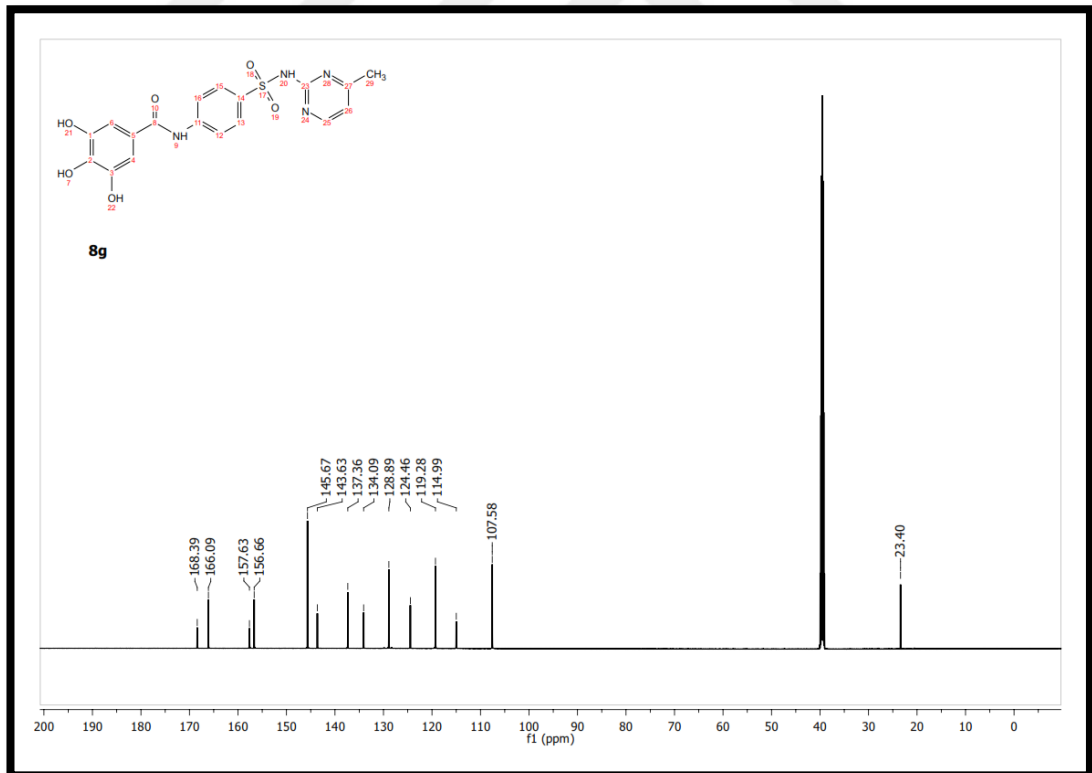
Şekil A.69 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



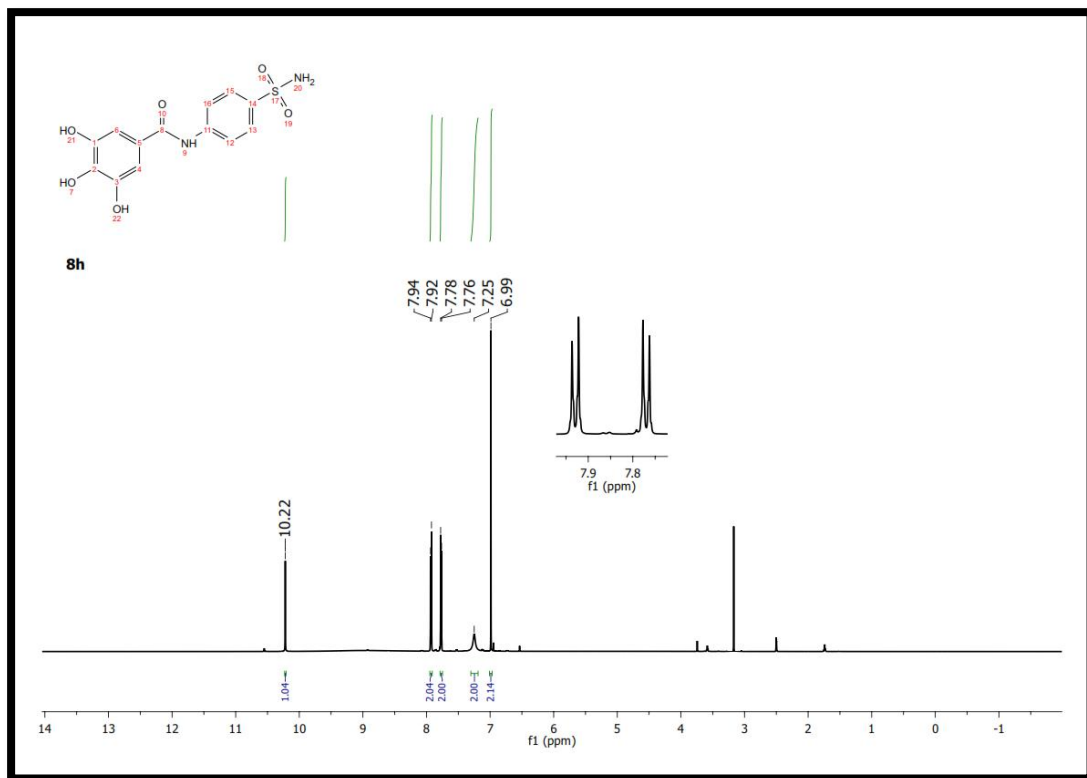
Şekil A.70 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



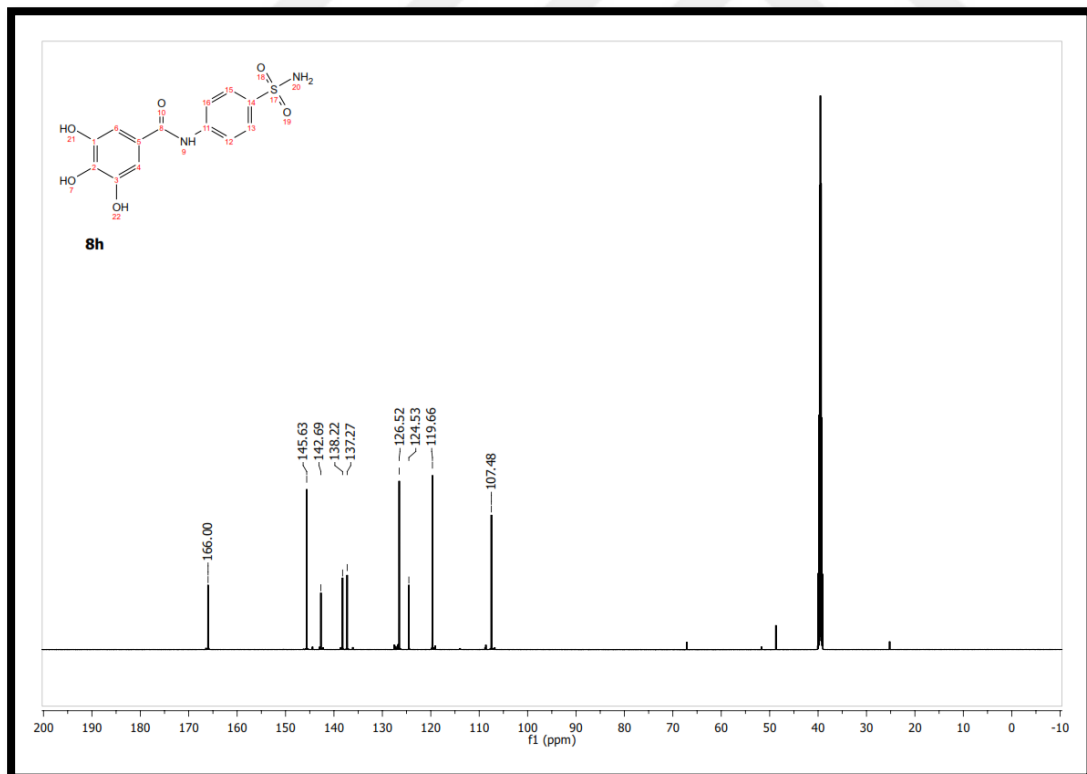
Şekil A.71 : *N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



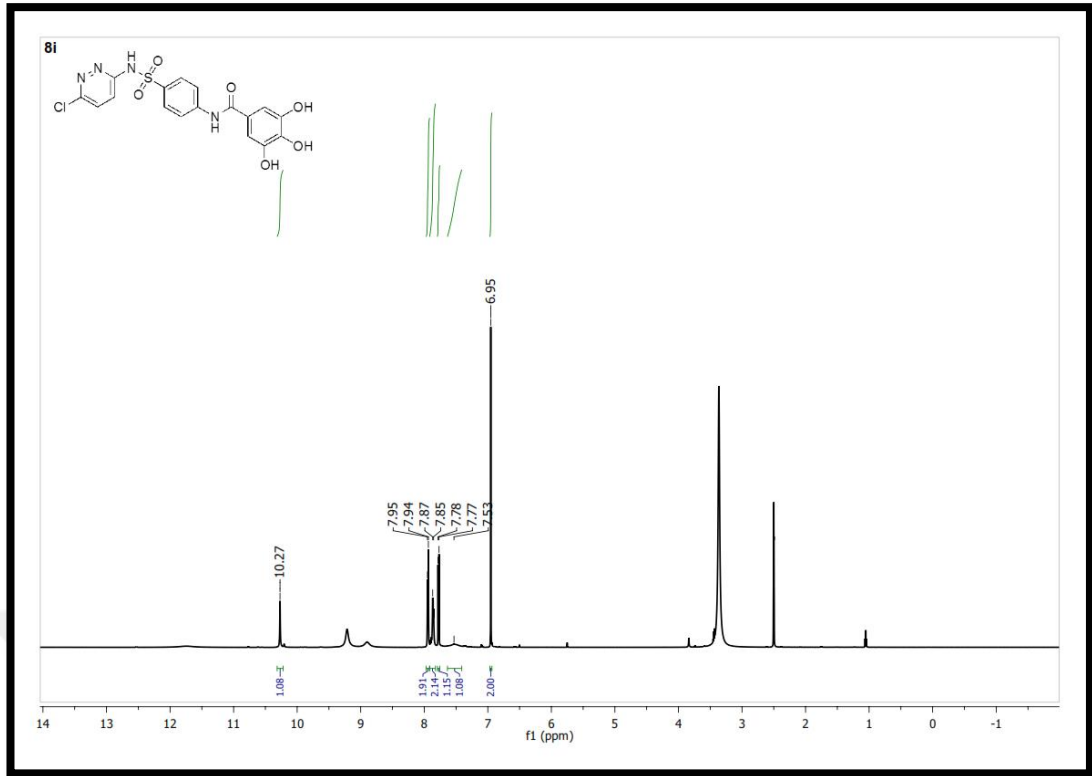
Şekil A.72 : *N*-(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.



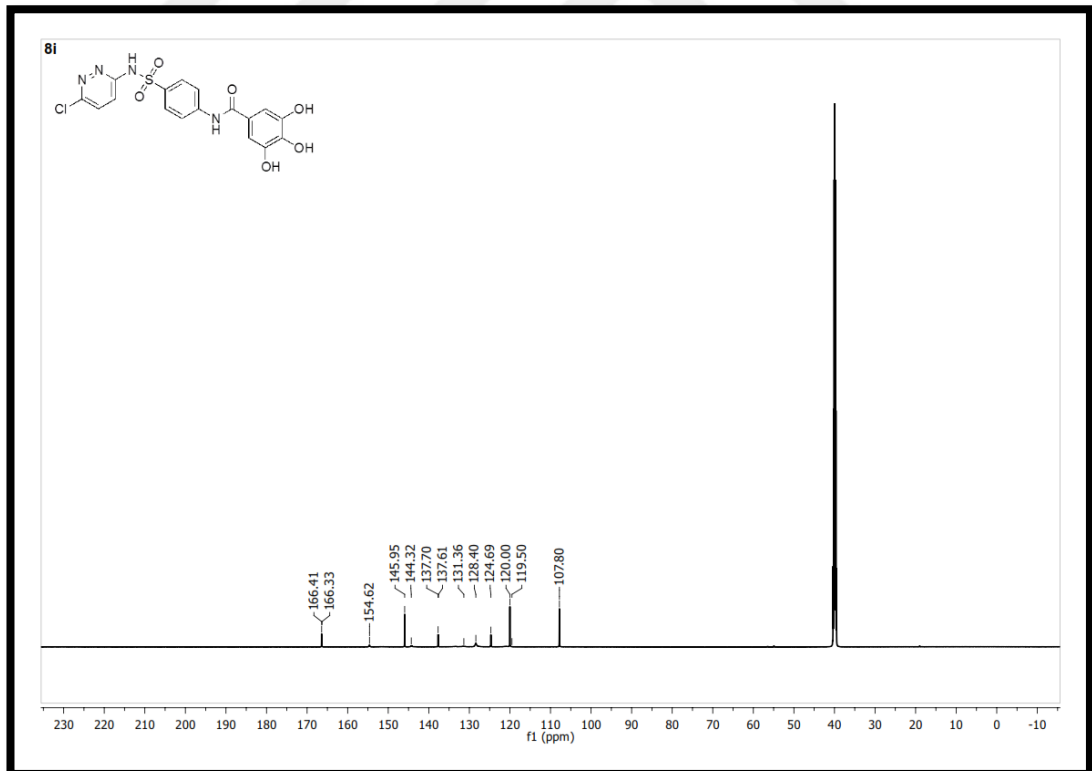
Şekil A.73 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹H NMR spektrumu.



Şekil A.74 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid ¹³C NMR spektrumu.

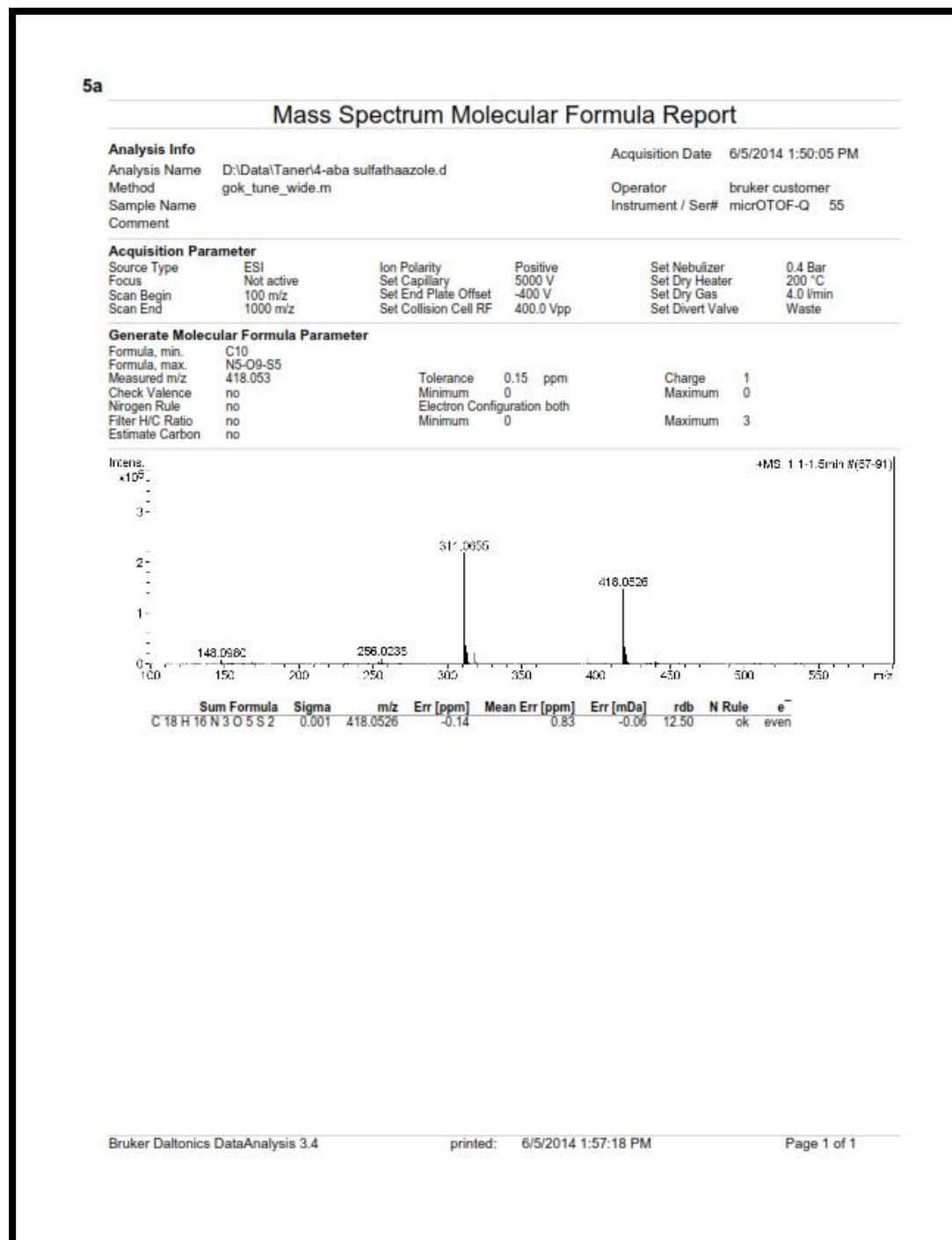


Şekil A.75 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ^1H NMR spektrumu.



Şekil A.76 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid ^{13}C NMR spektrumu.

EK B



Şekil B.1 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

5b

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba sulfadiazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/5/2014 2:44:40 PM

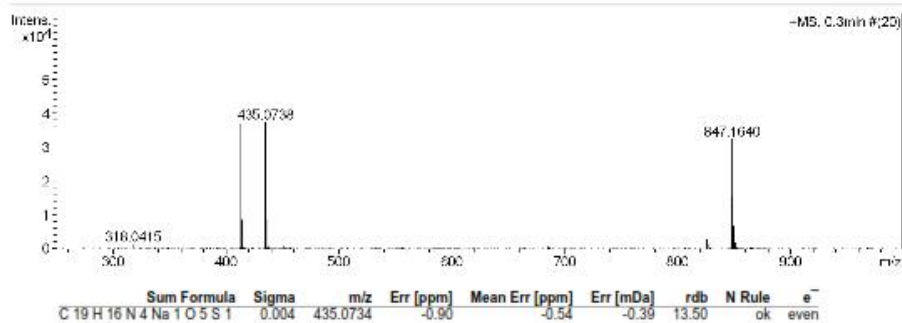
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C19H17N4O5SNa				
Measured m/z	435.074	Tolerance	50 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				

Şekil B.2 : *N*-(Sülfadiazin)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

5c

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba sulfamethazine-2.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/6/2014 2:25:45 PM

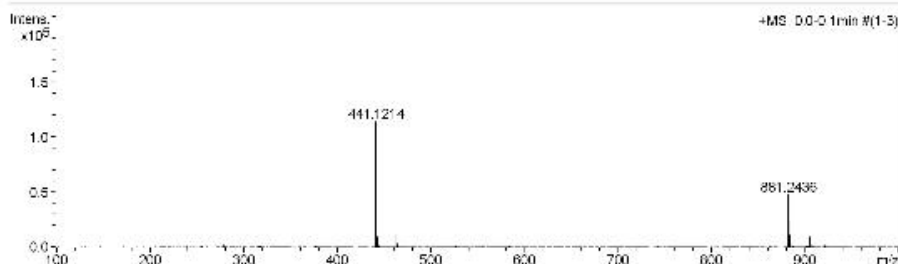
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# microTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O6S				
Measured m/z	441.121	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Sum Formula	Sigma	m/z	Err [ppm]	Mean Err [ppm]	Err [mDa]	rdB	N Rule	e ⁻
C21H21N4O6S	0.003	441.1227	3.07	4.02	1.35	13.50	ok	even

Şekil B.3 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

5d

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba sulfapyridine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 4:37:29 PM

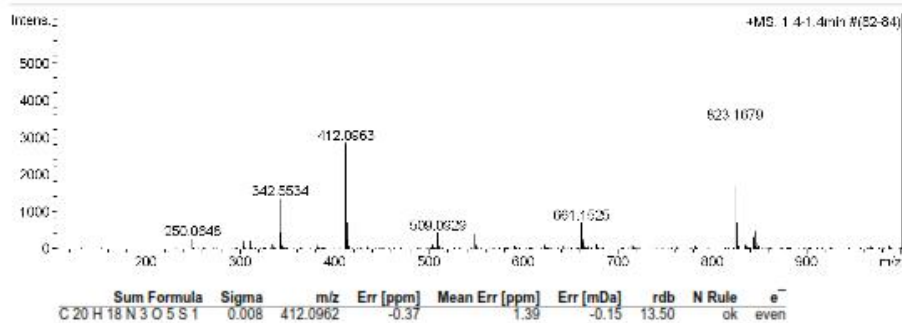
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	70.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O6S				
Measured m/z	412.096	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.4 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

5e

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba sulfoxazole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 7:02:39 PM

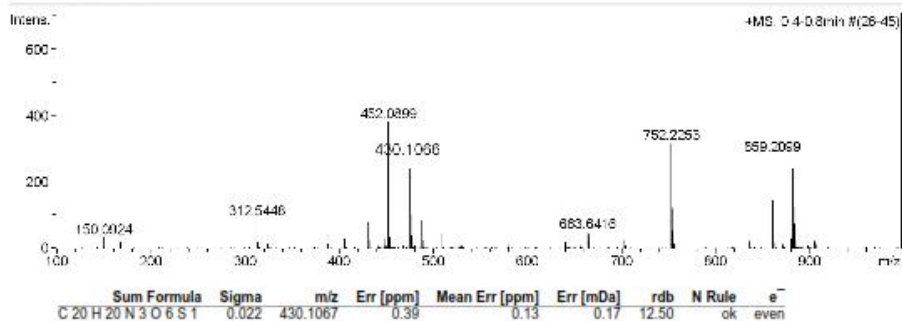
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	300.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O7S				
Measured m/z	430.107	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.5 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba sulfamethizole-4.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 9:14:07 AM

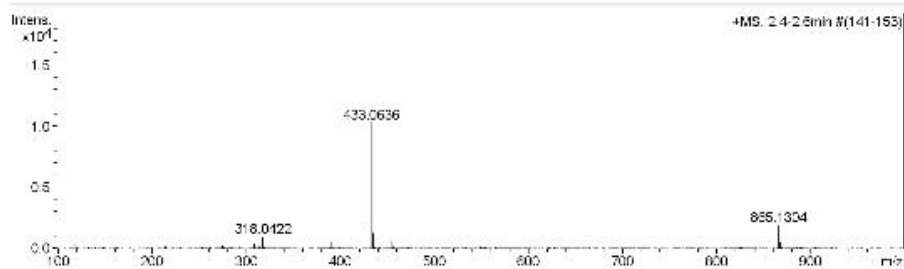
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C23H21N4O9S2				
Measured m/z	433.064	Tolerance	2 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Sum Formula	Sigma	m/z	Err [ppm]	Mean Err [ppm]	Err [mDa]	rdb	N Rule	e ⁻
C18H17N4O5S2	0.004	433.0635	-0.25	-0.66	-0.11	12.50	ok	even

Şekil B.6 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

5q

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name	D:\Data\Taner\4-aba_sulfamerazine.d
Method	gok_tune_wide.m
Sample Name	
Comment	

Acquisition Date 6/11/2014 10:25:07 AM

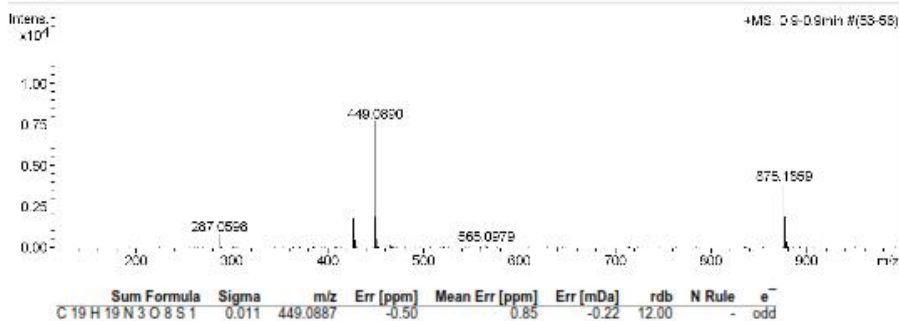
Operator bruker customer
Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	25.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10			
Formula, max.	C25H25N4O9S2			
Measured m/z	449.089	Tolerance	2 ppm	Charge 1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum 0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both	
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum 3
Estimate Carbon	no			



Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

printed: 6/11/2014 10:35:14 AM

Page 1 of 1

Şekil B.7 : *N*-(Sülfamerazin)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

5h

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba Sulfanilamide.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 11:07:53 AM

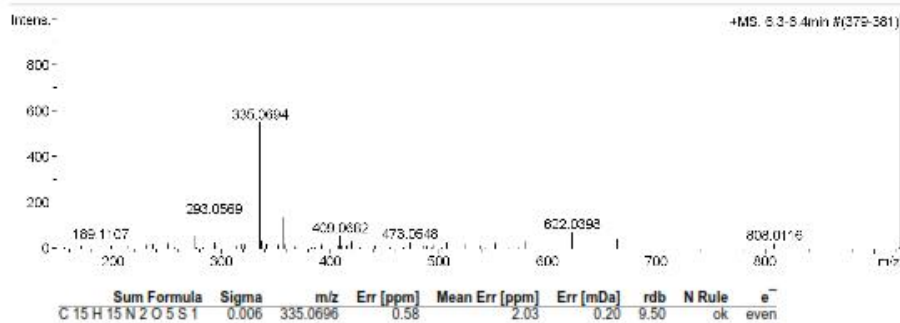
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	300.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C24H25N4O9S2				
Measured m/z	335.069	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.8 : N-(Sülfanilamid)-p-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-aba sulfachloropyridazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/5/2014 4:34:18 PM

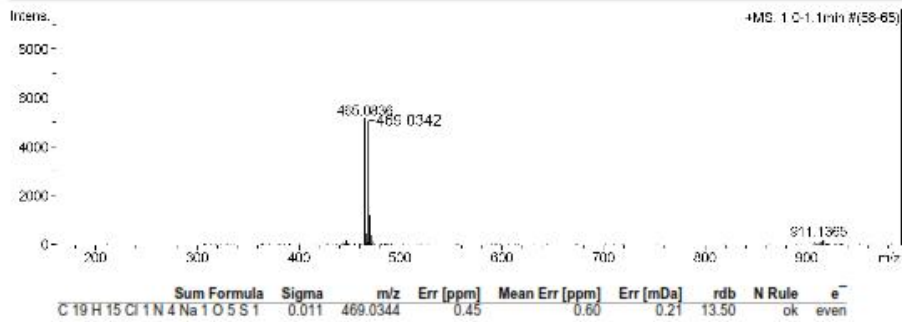
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C19H15ClN4O5SNa				
Measured m/z	469.034	Tolerance	50 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	no				



Şekil B.9 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-asetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6a

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A. Sulfathiazole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/11/2014 2:53:34 PM

Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

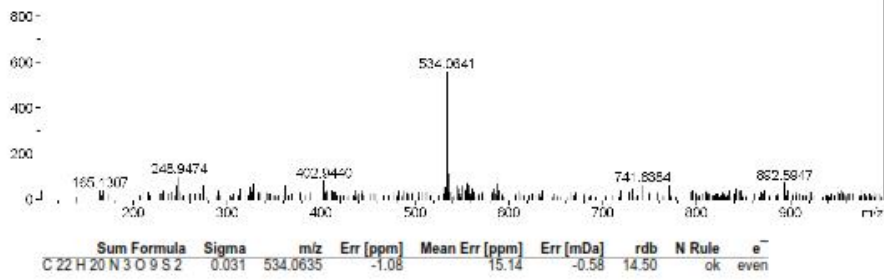
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C20H15N3O8S1				
Formula, max.					
Measured m/z	534.064	Tolerance	2 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				

Intens.:

*MS, 1.5min @115



Şekil B.10 : N-(Sülfatiazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6b

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A. Sulfadiazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 7:34:28 PM

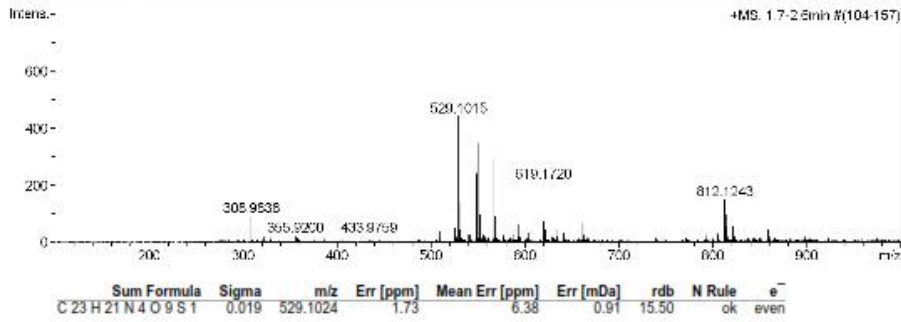
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C22H21N4O9S1				
Formula, max.					
Measured m/z	529.101	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.11 : N-(Sülfadiazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6c

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Erkan Erturk\G.A.Sulfamethazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 4:02:54 PM

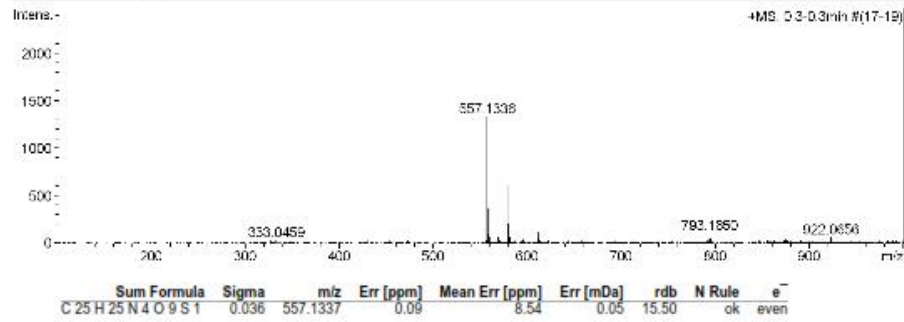
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	500.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C19H24N4O9S1				
Formula, max.					
Measured m/z	557.134	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.12 : N-(Sülfametazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6d

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A. Sulfapyridine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/11/2014 5:18:07 PM

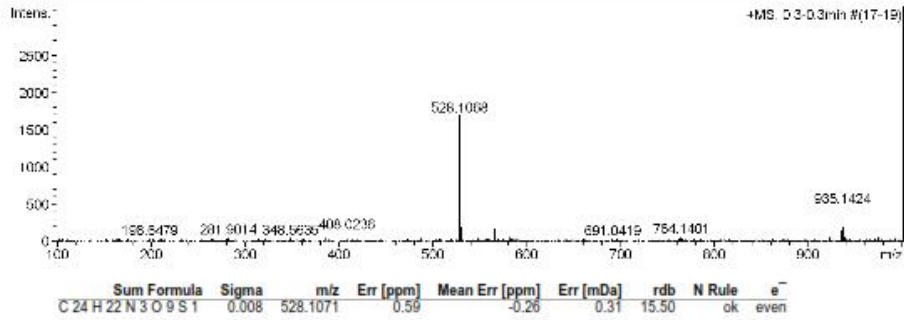
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C20H14N3O6S1				
Formula, max.					
Measured m/z	528.107	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				

Şekil B.13 : *N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6e

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A.Sulfisoxazole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 6:30:00 PM

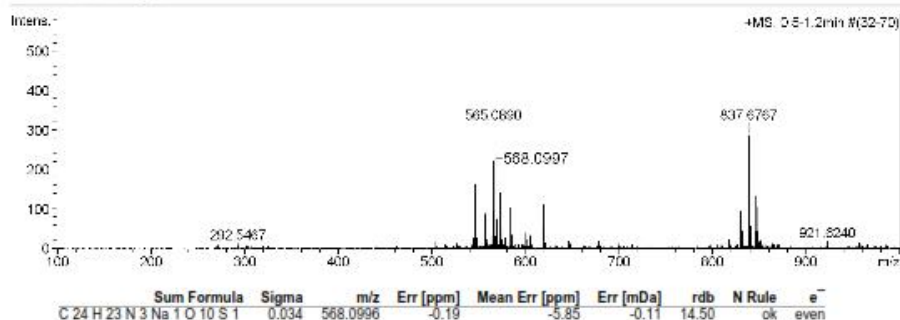
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C23H23N3Na1O10S1				
Formula, max.					
Measured m/z	568.1	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.14 : N-(Sülfisoksazol)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\Gallic acetoxysulfamethizole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 7:49:31 PM

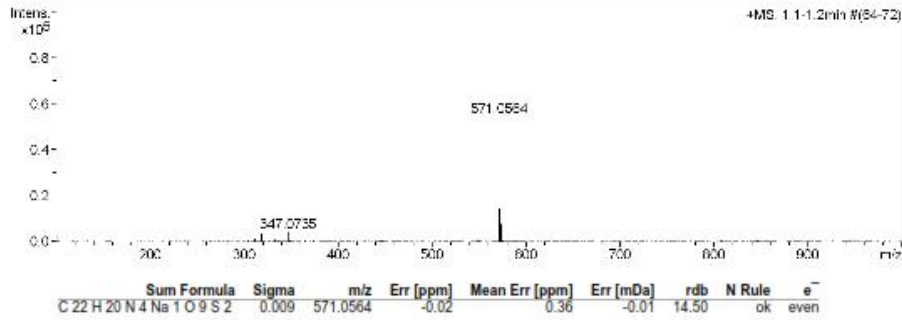
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	130.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C23H21N4O9S2Na				
Measured m/z	571.056	Tolerance	3 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.15 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6g

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\gallic acetoxysulfamerazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 9:47:54 AM

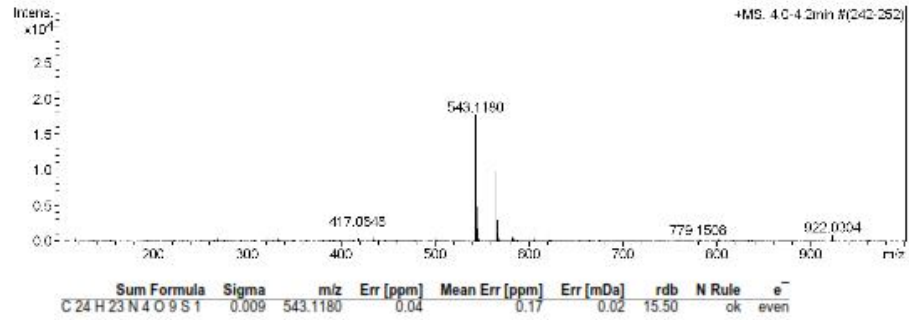
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	120.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10	Tolerance	2 ppm	Charge	1
Formula, max.	C25H25N4O9S2	Minimum	0	Maximum	0
Measured m/z	543.118	Electron Configuration both		Maximum	3
Check Valence	no	Minimum	0		
Nitrogen Rule	no				
Filter H/C Ratio	no				
Estimate Carbon	no				



Şekil B.16 : N-(Sülfamerazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

6h

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\Gallic acetoxysulfanilamide.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 10:54:14 AM

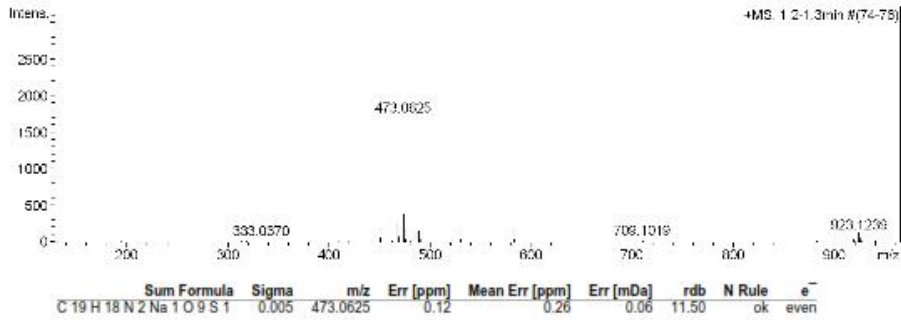
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C24H25N4O9S2Na				
Measured m/z	473.063	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	no				



Şekil B.17 : N-(Sülfanilamid)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A. Sulfachloropyridazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 8:01:46 PM

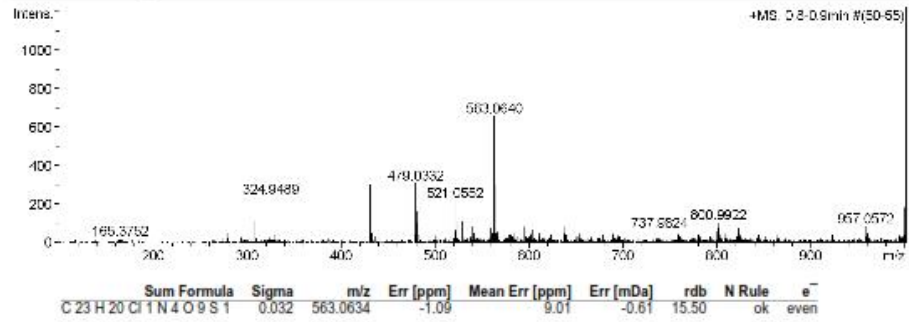
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C19H20Cl1N4O9S1				
Formula, max.					
Measured m/z	563.064	Tolerance	4 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.18 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A. Sulfacetamide.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 7:13:38 PM

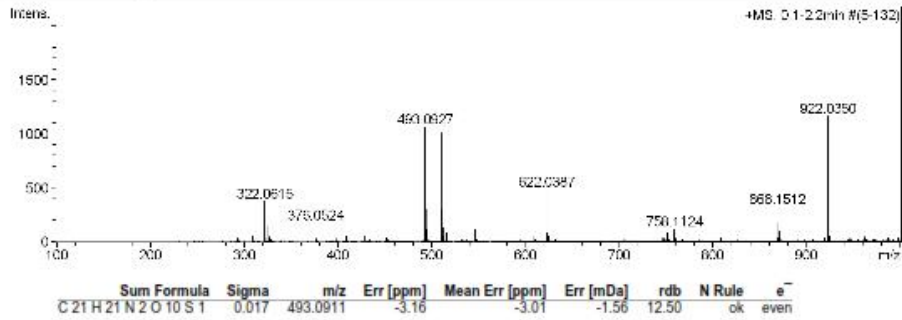
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C19H20N2O10S1				
Formula, max.					
Measured m/z	493.093	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.19 : *N*-(Sülfasetamid)-3,4,5-triaasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G.A. Sulfadimethoxine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/11/2014 4:51:57 PM

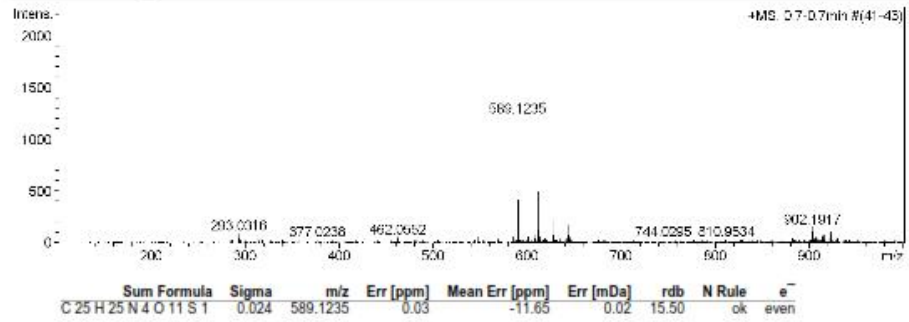
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C24H15N3O8S1				
Formula, max.					
Measured m/z	589.124	Tolerance	2 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.20 : N-(Sülfadimetoksin)-3,4,5-triasetoksibenzamid HRMS spektrumu.

7a

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba Sulfathiazole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 6:59:52 PM

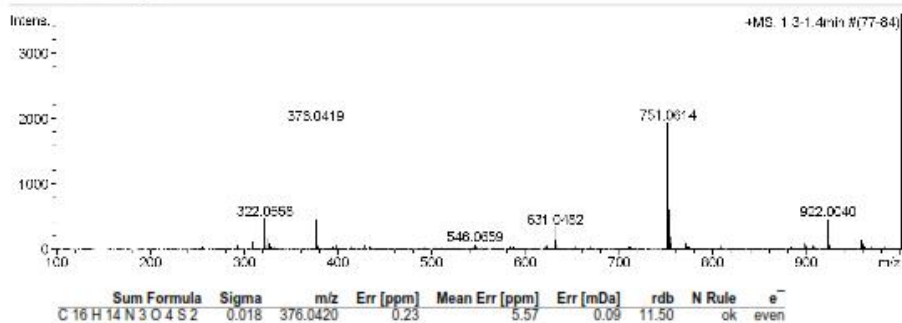
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C16H13N3O4S1				
Formula, max.					
Measured m/z	376.042	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	yes				

Şekil B.21 : *N*-(Sülfatiazol)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

7b

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba Sulfadiazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 8:14:28 PM

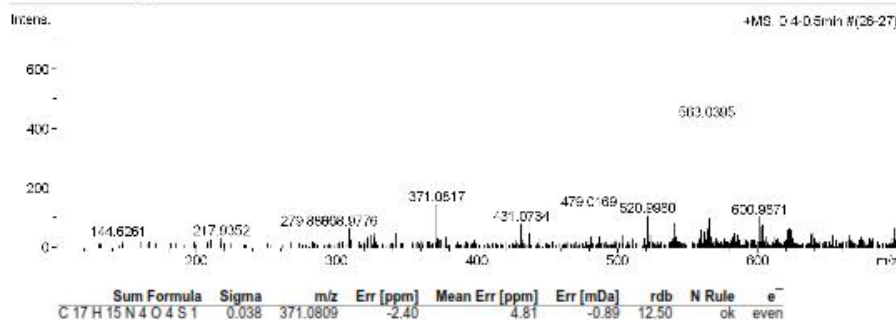
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C13H15N4O4S1				
Formula, max.					
Measured m/z	371.082	Tolerance	4 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Şekil B.22 : *N*-(Sülfadiazin)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

7c

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba sulfamethazine-2.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/6/2014 3:27:52 PM

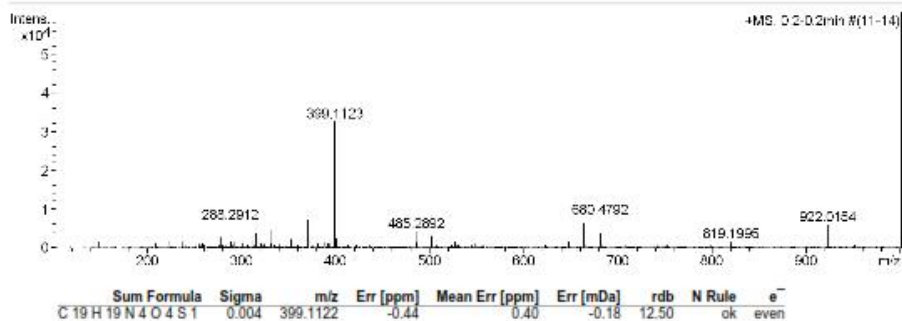
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	300.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O6S				
Measured m/z	399.112	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	no				

Şekil B.23 : *N*-(Sülfametazin)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

7d

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba sulfapyridine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 5:09:38 PM

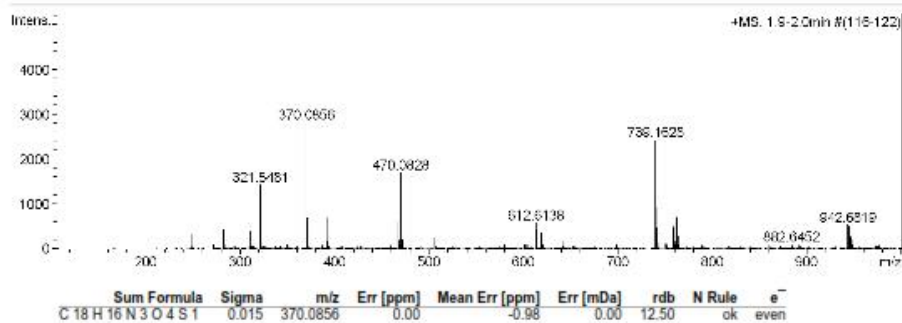
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O6S				
Measured m/z	370.086	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				

Şekil B.24 : *N*-(Sülfapiridin)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

7e

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba sulfoxazole-2.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 7:34:55 PM

Operator bruker customer

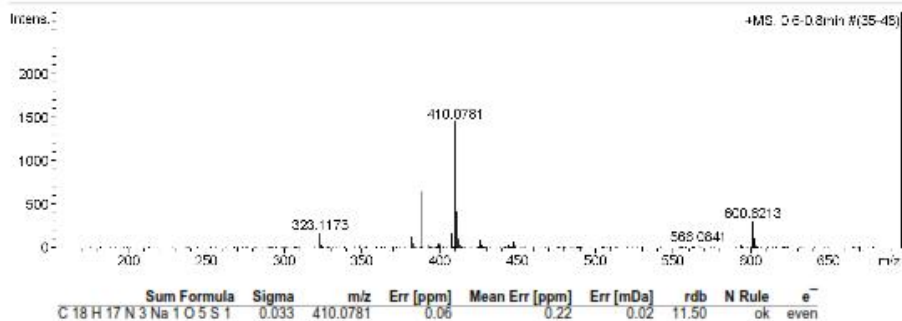
Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	700 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O7SNa				
Measured m/z	410.078	Tolerance	3 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				

Şekil B.25 : *N*-(Sülfisoksazol)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba sulfamethizole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 9:33:23 AM

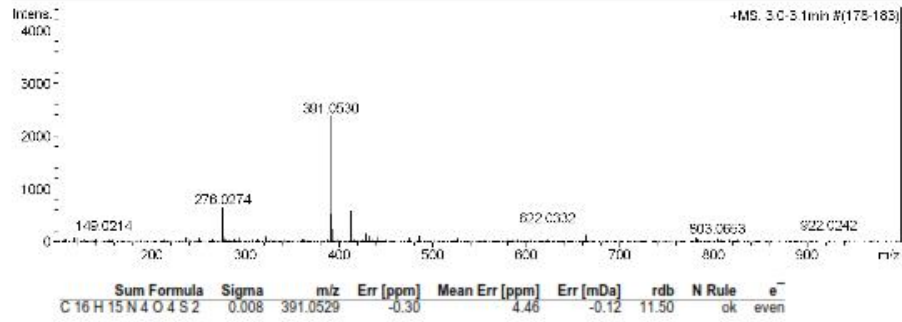
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C23H21N4O9S2				
Measured m/z	391.053	Tolerance	2 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.26 : *N*-(Sülfametizol)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

7g

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\4-hba sulfamerazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 10:42:00 AM

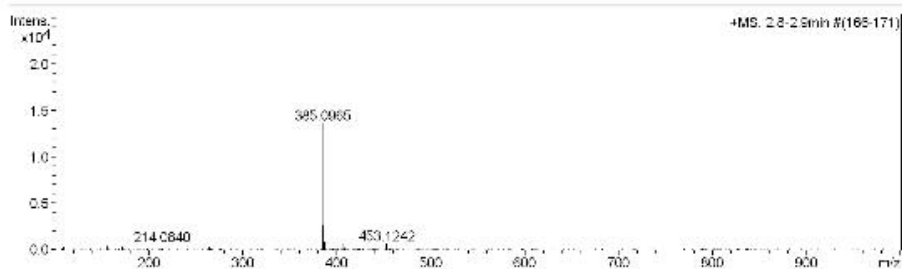
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C25H25N4O9S2				
Measured m/z	385.096	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	no				



Sum Formula	Sigma	m/z	Err [ppm]	Mean Err [ppm]	Err [mDa]	rdb	N Rule	e ⁻
C18H17N4O4S1	0.016	385.0965	0.08	-0.96	0.03	12.50	ok	even

Şekil B.27 : N-(Sülfamerazin)-p-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

7h

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Erkan Erturk\4-hba sulfanilamide.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 4:21:09 PM

Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

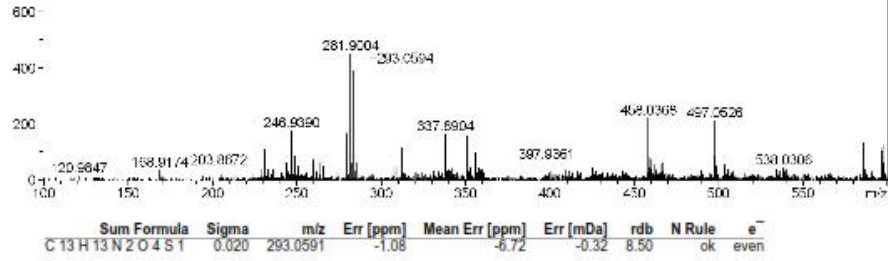
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set Collision Cell RF	500.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

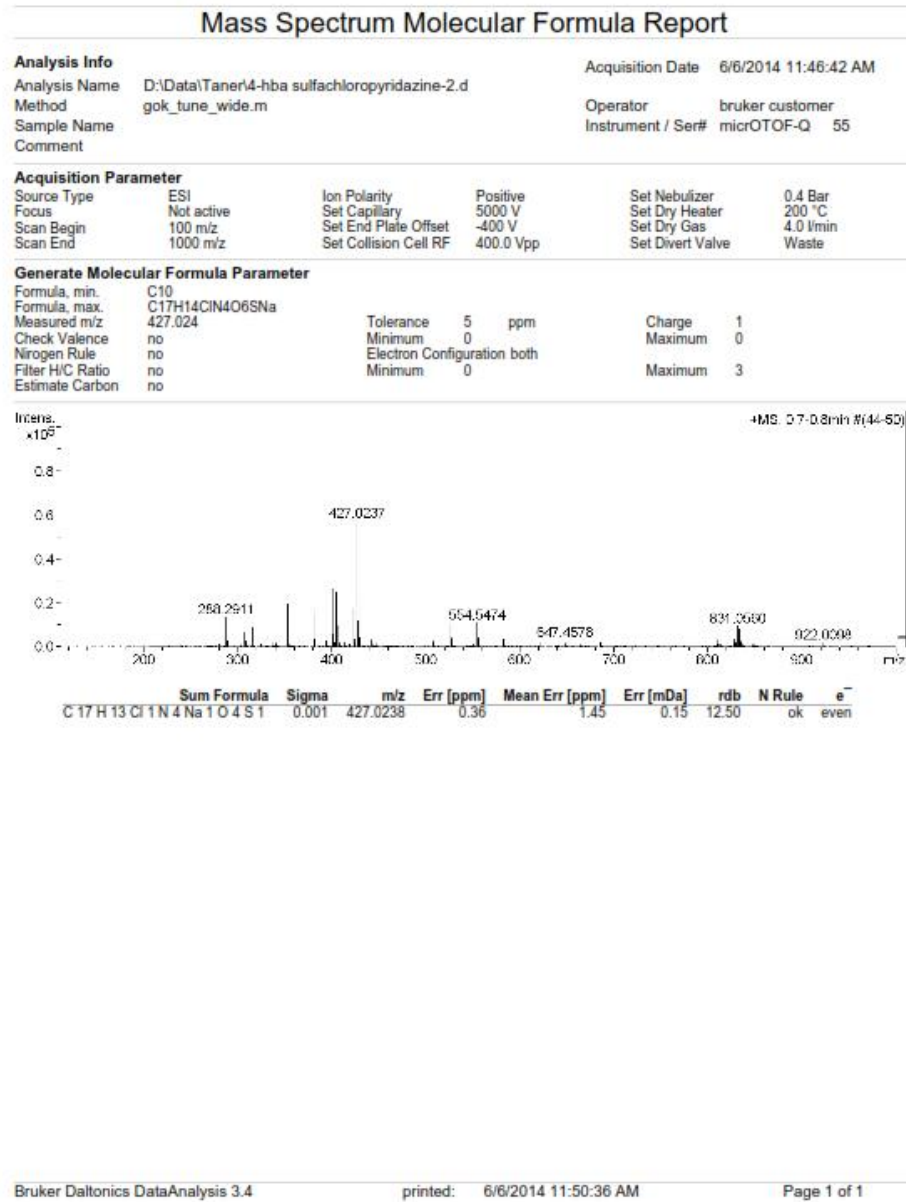
Formula, min.	C6H13N2O4S1				
Formula, max.					
Measured m/z	293.059	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				

Intens...

+MS: 1.4-1.4min #1(53-85)



Şekil B.28 : *N*-(Sülfanilamid)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.



Şekil B.29 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-*p*-hidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8a

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G. Sulfathiazole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/11/2014 5:07:53 PM

Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

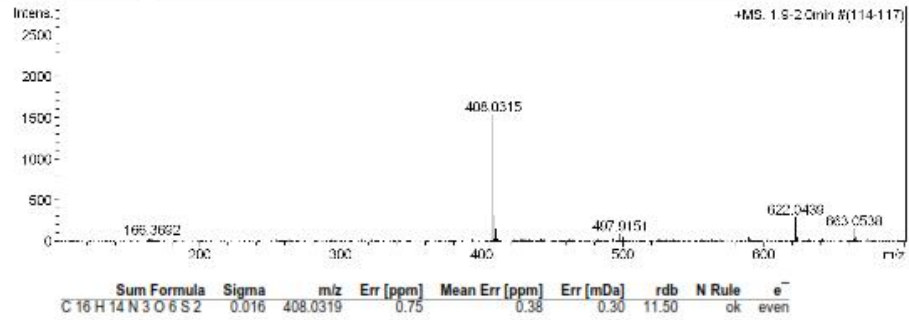
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C13H14N3O6S1		
Formula, max.			
Measured m/z	408.031	Tolerance	2 ppm
Check Valence	no	Minimum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both	
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0
Estimate Carbon	yes		

Charge 1
 Maximum 0
 Maximum 3



Şekil B.30 : N-(Sülfatiazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8b

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G. Sulfadiazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/11/2014 2:34:51 PM

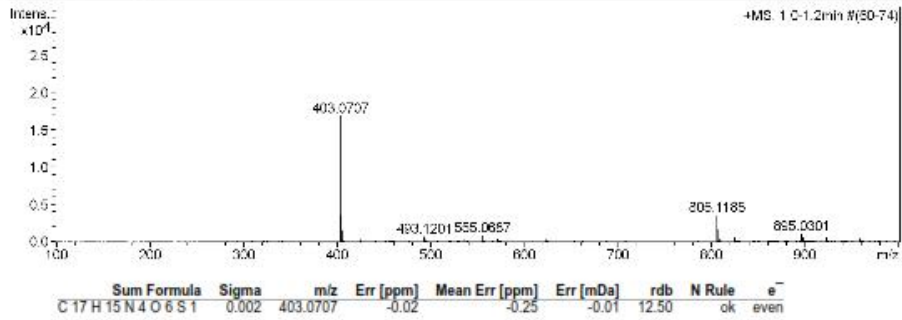
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C13H15N4O4S1				
Formula, max.					
Measured m/z	403.071	Tolerance	4 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	yes				

Şekil B.31 : *N*-(Sülfadiazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8c

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\G. Sulfamethazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 4/10/2014 7:48:12 PM

Operator bruker customer

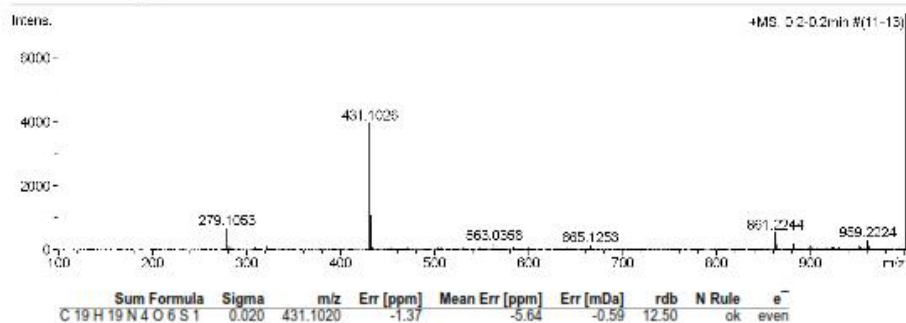
Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C19H18N4O6S1				
Formula, max.					
Measured m/z	431.103	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				

Şekil B.32 : *N*-(Sülfametazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8d

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\Gallic sulfapyridine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 4:20:25 PM

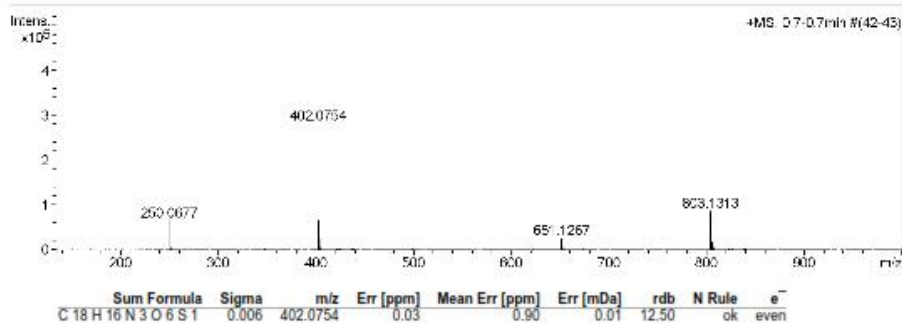
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	225.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O6S				
Measured m/z	402.075	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	no				

Şekil B.33 : *N*-(Sülfapiridin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8e

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\gallic sulfisoxazole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/10/2014 5:27:35 PM

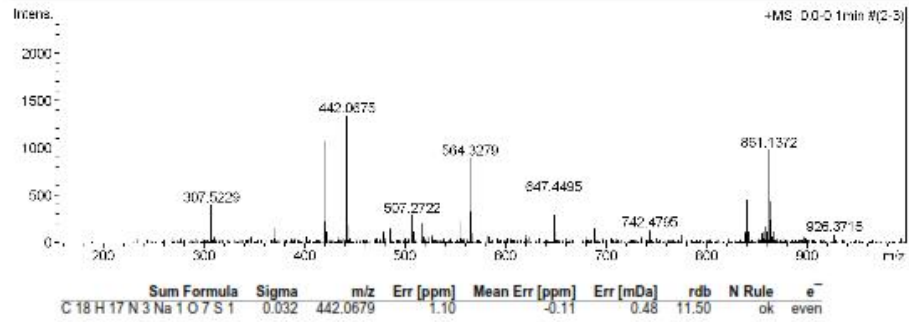
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	500.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C21H21N4O7SNa				
Measured m/z	442.068	Tolerance	5 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.34 : N-(Sülfisoksazol)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\Gallic sulfamethizole.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 11:37:46 AM

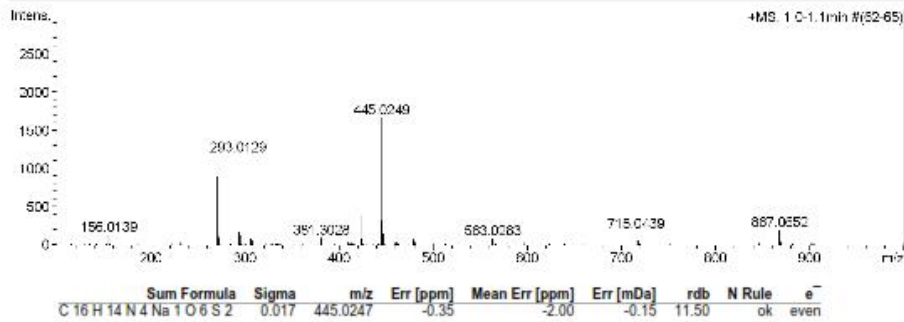
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C16H25N4O6S2Na				
Measured m/z	445.025	Tolerance	1 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.35 : *N*-(Sülfametizol)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8g

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\gallic sulfamerazine.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/11/2014 10:11:36 AM

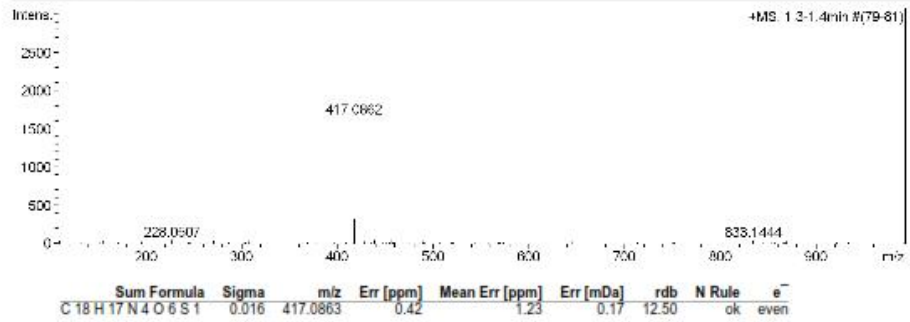
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	100.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C25H25N4O9S2				
Measured m/z	417.086	Tolerance	2 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.36 : N-(Sülfamerazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

8h

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\Gallic sulfacetamide.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/5/2014 2:21:19 PM

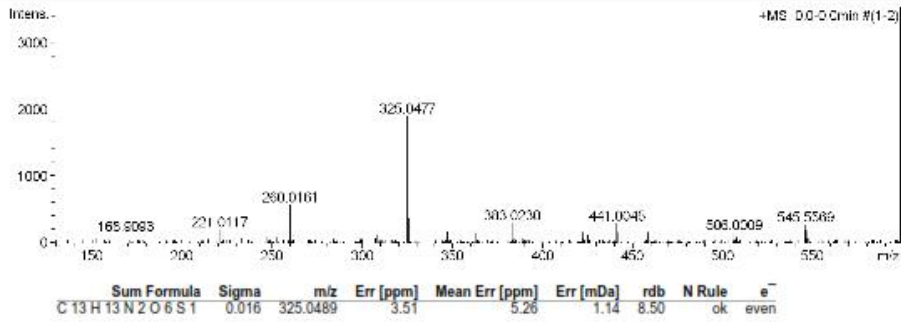
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	600 m/z	Set Collision Cell RF	300.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C13H13N2O6S				
Measured m/z	325.048	Tolerance	50 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both		Maximum	3
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0		
Estimate Carbon	no				



Şekil B.37 : *N*-(Sülfanilamid)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Taner\Gallic sulfachloropyridazine-3.d
 Method gok_tune_wide.m
 Sample Name
 Comment

Acquisition Date 6/6/2014 10:12:52 AM

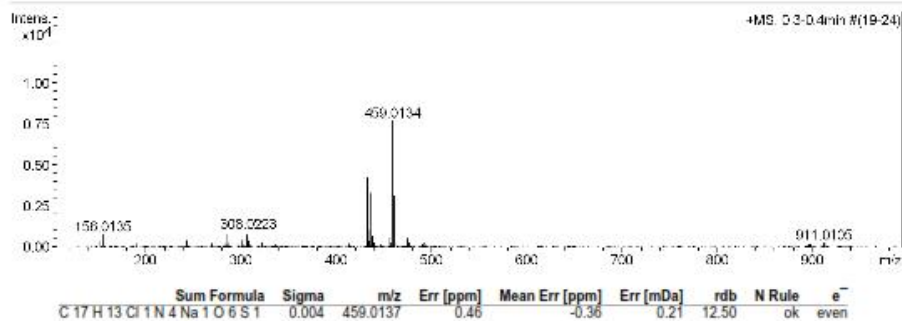
Operator bruker customer
 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 55

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	5000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-400 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Collision Cell RF	300.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C10				
Formula, max.	C17H14ClN4O6SNa				
Measured m/z	459.013	Tolerance	50 ppm	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	no				



Şekil B.38 : *N*-(Sülfakloropiridazin)-3,4,5-trihidroksibenzamid HRMS spektrumu.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Taner GÖKÇEN

Adres: : TÜBİTAK-Ulusal Metroloji Enstitüsü, Gebze/Kocaeli

E-Posta: : taner.gokcen@tubitak.gov.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2002, Boğaziçi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yükseklisans** : 2005, Worcester Polytechnic University (USA), Chemistry and Biochemistry, Chemistry Program

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2002-2004 yılları arasında Worcester Polytechnic University’de asistan olarak çalıştı.
- 2004-2005 yılları arasında Momenta Pharmaceuticals, Boston, USA’de yöntem geliştirme uzmanı olarak çalıştı.
- 2006 yılından beri TÜBİTAK UME’de araştırmacı olarak çalışmaktadır.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- Aydın Unsal, I., **Gokcen, T.**, Goren, A. C., Tasan, M.. Sütte Sülfonamid Bileşiklerinin LC-IDMS Yöntemiyle Tayini. 27. *Ulusal Kimya Kongresi*, Ağustos 23-28, 2015 Çanakkale, Türkiye.
- **Gokcen, T.**, Al, F., Topal, M., Ozturk, T., Goren,A. C.. Karbonik Anhidraz İnhibitörü Olarak Bazı Sülfonamid Türevleri. 27. *Ulusal Kimya Kongresi*, Ağustos 23-28, 2015 Çanakkale, Türkiye.
- **Gokcen, T.**, Gulcin, I., Ozturk, T., Goren, A. C., 2016. A Class of Sulfonamides as Carbonic Anhydrase I and II Inhibitors, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 180-188.
- **Gokcen, T.**, Al, M., Topal, M., Gulcin, I., Ozturk, T., Goren, A. C., 2017. Synthesis of Some Natural Sulphonamide Derivatives as Carbonic Anhydrase Inhibitors, *Organic Communications*, 10:1, 15-23.
- Koksall, Z., Kalin, R., Camadan, Y., Usanmaz, H.,Almaz, Z., Gulcin, I., **Gokcen, T.**, Goren, A. C., Ozdemir, H. 2017. Secondary Sulfonamides as Effective Lactoperoxidase Inhibitors, *Molecules*, 22, 793.

