

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MAKRO HALKALI TIYO-CROWN ETERLERİN SENTEZİ VE KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ADEM ERGÜN**

**BALIKESİR, Ocak-2011**

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**MAKRO HALKALI TIYO-CROWN ETERLERİN SENTEZİ VE KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ADEM ERGÜN**

**BALIKESİR, Ocak-2011**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

MAKRO HALKALI TİYO-CROWN ETERLERİN SENTEZİ VE KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADEM ERGÜN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Baki ÇİÇEK

Sınav Tarihi: 12.01.2011

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Ümit ÇAKIR (BAÜ)

Doç. Dr. Serap DOĞAN(BAU)

Yrd. Doç. Dr. Baki ÇİÇEK (Danışman-BAÜ)

Balıkesir, Ocak - 2011

“Bu alışma Balıkesir Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP 2009/16 Kodlu Proje ile desteklenmiştir. Teşekkür ederiz.”

**MAKRO HALKALI TIYO-CROWN ETERLERİN SENTEZİ VE KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Adem ERGÜN**

**Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Baki ÇİÇEK)**

**Balıkesir, Ocak.2011**

**ÖZET**

Bu çalışma iki aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak, bazı makro halkalı tiyocrown eterlerin sentezleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise bu tiyocrown eterlerin, Arslan ve grubunun sentezlediği sepharose-4B-tirozin-*p*-aminosulfonamid afinite kromatografi kolonu kullanılarak insan kanından saflaştırılan hCAI ve hCAII enzimleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Makrohalkalı tiyocrown eterler, üç farklı giriş maddesi (*o*-ftaloil diklorür, *p*-ftaloil diklorür, *m*-ftaloil diklorür) ile trietilenglikolditiyol ve dietilenglikolditiyol bileşiklerinin uygun baz (piridin) eşliğinde azot atmosferinde esterleşme – halkakapama reaksiyonu sonucunda sentezlenmiştir. Elde edilen makrohalkalı tiyocrown eterler kolon kromatografisiyle saflaştırılmış ve sentezlenen bileşiklerin yapısal karakterizasyonu erime noktası, FT-IR ve <sup>1</sup>H NMR yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Sentezlenen bileşikler sırasıyla; 7,8,10,11,13,14,23,24,26,27,29,30 - dodekahidrodibenzo [i,w] [1,4,15,18,7,12,21,26] tetraoksatetratyosiklooktakosin - 5,16,21,32-tetron **(1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) (A1)**, 6,9,22,25-tetraoksa - 3,12,19,28-tetratyotrisiklo [28.2.2.2<sup>14,17</sup>] heksatyokonta-1(32),14,16,30,33,35-hekzan-

2,13,18,29-tetron **(1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) (A2)**, 6,9,23,26-tetraoksa-3,12,20,29-tetratyotrisiklo[29.3.1.1<sup>14,18</sup>]heksatyokonta-1(35),14(36),15,17,31,33-hekzan 2,13,19,30-tetron **(1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) (A3)**, 7,8,10,11,20,21,23,24 - oktahidrodibenzo [f,q] [1,12,4,9,15,20] dioksatetratyosiklodokosin - 5,13,18,26-tetron **(1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) (A4)**, 6,19-dioksa-3,9,16,22 – tetratyotrisiklo [22.2.2.2<sup>11,14</sup>] tyokonta - 1(26),11,13,24,27,29 – heksaen - 2,10,15,23-tetron **(1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) (A5)** ve 6,20-dioksa-3,9,17,23 – tetratyotrisiklo [23.3.1.1<sup>11,15</sup>] tyokonta-1(29),11(30),12,14,25,27 – heksan - 2,10,16,2 –tetron **(1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) (A6)** bileşikleridir. Elde edilen bu bileşikler tamamen orijinal olup, hCAI üzerinde inhibe edici, hCAII üzerinde ise aktive edici sonuçlar elde edilmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER:** Tiyocrown Eter / Diaçil türevleri / Esterleşme / Halkalaşma reaksiyonu / Karbonat dehidrataz / Karbonik anhidraz inhibitörleri

**THE SYNTHESIS OF MACRO CYCLIC THIO-CROWN ETHER AND  
INVESTIGATION OF INHIBITION IMPACT ON CARBONIC ANHYDRASE  
ENZYME**

**Adem ERGÜN**

**Balıkesir University, Institute of Science, Department of Chemistry**

**(MSc. Thesis / Supervisor: Asist. Prof. Dr. Baki ÇİÇEK)**

**Balıkesir, TURKEY, 2011**

**ABSTRACT**

In the first step, some thiocrown ethers were synthesized and then the impacts of these thiocrown ethers on CAI and CAII, which were purified from human blood by using sepharose 4B-tirozin-sulfonamid affinity chromatography was synthesized by Arslan and colleagues, were investigated.

Thiocrown ethers were synthesized by using three starting components (*o*-phthaloyl dichloride, *p*-phthaloyl dichloride, *m*-phthaloyl dichloride) 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol and 2-Mercaptoethyl ether) with convenient base pyridine on nitrogen atmosphere with using cyclization reaction. The thiocrown ethers were purified with column chromatography and the structural characterizations were illuminated by using FT-IR ve <sup>1</sup>H NMR.

The synthesized products are 7,8,10,11,13,14,23,24,26,27,29,30 - dodekahidrodibenzo [i,w] [1,4,15,18,7,12,21,26] tetraoxatetrathiacyclooctacosine - 5,16,21,32-tetrone **(1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) (A1)**, 6,9,22,25-tetraoxa - 3,12,19,28-tetrathiatricyclo [28.2.2.2<sup>14,17</sup>] hexatriaconta-1(32),14,16,30,33,35-heksaen-2,13,18,29-tetrone **(1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) (A2)**, 6,9,23,26-tetraoxa-3,12,20,29-tetrathiatricyclo[29.3.1.1<sup>14,18</sup>]hexatriaconta-1(35),14(36),15, 17, 31, 33- hexaene-

2,13,19,30-tetrone **(1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) (A3)**, 7,8,10,11,20,21,23,24 - octahydrodibenzo [f,q] [1,12,4,9,15,20] dioxatetrathia-cyclodocosine - 5,13,18,26-tetrone **(1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) (A4)**, 6,19-dioxa-3,9,16,22 - tetrathiatricyclo [22.2.2.2<sup>11,14</sup>] triaconta - 1(26),11,13,24,27,29 - hexaene - 2,10,15,23-tetrone **(1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) (A5)** and 6,20-dioxa-3,9,17,23 - tetrathiatricyclo [23.3.1.1<sup>11,15</sup>] triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27 - hexaene - 2,10,16,2 -tetrone **(1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) (A6)**. These components are totally original and all have inhibition impact on hCAI and activation impact on hCAII.

**KEY WORDS:** Thiocrown ether / Diacyl derivatives / Esterification / Cyclization reaction / Carbonate dehydrase / Carbonic anhydrase Inhibitors



## İÇİNDEKİLER

---

<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	ii
<b>ABSTRACT, KEY WORDS</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>KISALTMALAR ve SEMBOL LİSTESİ</b>	viii
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	ix
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	xi
<b>ÖNSÖZ</b>	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. TİYOCROWN ETERLER	1
1.1.1. Tiyocrown Eterlerin Sentezinde Sentetik Metotlar	7
1.1.2. Tihocrown Eterlerin Sentezi İçin Genel Bir Yol	14
1.1.2.1. Sodyum / n-bütanol Metodu	14
1.1.2.2. Sezyum karbonat / DMF metodu	16
1.2.2.3. Sezyum Etkisi	16
1.1.3. Tiyo (bisklorometan) kullanarak $-SCH_2SCH_2S-$ içeren Makro Halka ve Mezohalkalı Tiyocrown Eter Sentezi	18
1.1.4. Diaçilklorür ve Tiyol Bileşiklerinin Pridin Varlığındaki Reaksiyonu	22
1.1.4.1. 3,4 Dihidro-2,5-benzoditiosine-1,6-diyon Eldesi	22
1.1.5. Tiyocrowneter Sentezlerinde Templet Etki	23
1.2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ	26
1.2.1. Fizyolojik Önemi	26
1.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	27
1.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi	28
1.2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	29
2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	30
1.2.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	33
1.2.6.1. CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi	33
1.2.6.2. Esteraz Aktivitesi	34

1.2.7.	Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	34
1.2.8	AfiniteJelininHazırlanması	35
<b>2.</b>	<b>MATERYEL VE YÖNTEM</b>	<b>36</b>
2.1.	MATERYAL	36
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.1.2.	Kullanılan Alet ve Cihazlar	37
2.1.3.	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	38
2.	YÖNTEMLER	40
2.2.1.	Tiyocrown Eter Bileşiklerinin Sentezi	40
2.2.1.1.	1,4-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-28-Crown-8' in Sentezi (A1)	40
2.2.1.2.	1,4-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-32-Crown-8' in Sentezi (A2)	41
2.2.1.3.	1,3-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-30-Crown-8' in Sentezi (A3)	41
2.2.1.4.	1,2-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-22-Crown-6' nın Sentezi (A4)	42
2.2.1.5.	1,4-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-26-Crown-6' nın Sentezi (A5)	43
2.2.1.6.	1,3-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-24-Crown-6' nın Sentezi (A6)	44
2.2.2.	Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCAI ve hCAII ) Saflaştırılması	44
2.2.2.1.	Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması	44
2.2.2.2.	Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enziminin Elüsyonu	45
2.2.2.3.	Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini (CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi)	45
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>47</b>
3.1.	Sentezlenen Bileşiklerin <sup>1</sup> H NMR ve FT-IR Spektrumları	47
3.2.	Afinite Kromatografisi İle hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Saflaştırılması	61
3.3.	hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Aktivite Tayini	62
3.4.	Sentezlenen Tiyocrown Eterlerin hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkileri	69
<b>4.</b>	<b>SONUÇ ve TARTIŞMA</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>82</b>

## KISALTMALAR ve SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
DMF	N,N-Dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
THF	Tetrahidrofur
$\Delta$	Isı
R	Alkil grubu
Ar	Aril grubu
Me	Metil grubu
Et	Etil grubu
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
E.N.	Erime noktası
FT-IR	Kızıl ötesi spektroskopisi
$^1\text{H}$ NMR	Proton Nükleer Magnetik Rezonansı
CA	Karbonik Anhidraz Enzimi
hCA-I	İnsan karbonik anhidraz enzimi 1
hCA-II	İnsan karbonik anhidraz enzimi 2

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Tiyocrown eterlerden bazı örnek moleküller	1
Şekil 1.2	Bazı makrohalkalı tiyocrown eterler	3
Şekil 1.3	Buter ve Kellogg tarafından sentezlenen tiyocrown eter	5
Şekil 1.4	Koruyucu kullanmaksızın sentezlenmiş karışık-donör atom içeren crown eterler	6
Şekil 1.5	2,3,4,5 oksamonoazatiyo crown eterlerin boc ile korunmuş bis(2-kloroetil)amin ile reaksiyonundan elde edilmiş ürünleri	8
Şekil 1.6	Syn-azot içeren makro halka sentez	9
Şekil 1.7	Hidroksil grubu içeren [20]aneS <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> ' nin sentezi	10
Şekil 1.8	Hidroksil grubu içeren [13]aneS <sub>4</sub> (OH) ve [26]aneS <sub>8</sub> (OH) <sub>2</sub> ' nin sentezi	11
Şekil 1.9	N-4-NO <sub>2</sub> Ph-[12]aneNS <sub>3</sub> (16) ve N-4-NH <sub>2</sub> COPh-[12]aneNS <sub>3</sub> (17)' nin sentezi	13
Şekil 1.10	Ochrymowycz tarafından sentezlenen 18S6	14
Şekil 1.11	2.1 ve 2.2'nin halkalaşmasında yan ve ana ürünler ( X = Cl, Br)	15
Şekil 1.12	Reinhoudt tarafından CsF yardımıyla sentezlenen crown eter	17
Şekil 1.13	Templet Etki	18
Şekil 1.14	Halkalaşma reaksiyonun genel gösterimi	19
Şekil 1.15	Dimetilsülfürün klorlanma ürünleri	20
Şekil 1.16	Tritiyon'un klorlanma ürünleri	20
Şekil 1.17	Halkalaşma reaksiyonuna bir örnek	21
Şekil 1.18	Bazı tiyocrown eter bileşikleri	22
Şekil 1.19	Piridin bazıyla esterleşme - halka kapama reaksiyonu	23
Şekil 1.20	1,2-dimerkaptobenzen'in reaksiyonundan elde edilen dibenzo-18-tiyocrown-6	24
Şekil 1.21	CA Enziminin Aktif Bölgesi ( Büyük küre Zn <sup>+2</sup> iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.)	31
Şekil 1.22	CA enziminin CO <sub>2</sub> hidrasyon reaksiyonunu katalizlediği mekanizma	32
Şekil 1.23.	Sepharose-4B-L-Tirozin- <i>p</i> -benzosülfonamid	35
Şekil 3.1	A1' in <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	48
Şekil 3.2	A1' in FT-IR Spektrumu	49
Şekil 3.3	A2' nin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	50

Şekil 3.4	A2' nin FT-IR Spektrumu	51
Şekil 3.5	A3' ün <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	52
Şekil 3.6	A3' ün FT-IR Spektrumu	53
Şekil 3.7	A4' ün <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	54
Şekil 3.8	A4' ün FT-IR Spektrumu	55
Şekil 3.9	A5' in <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	56
Şekil 3.10	A5' in FT-IR Spektrumu	57
Şekil 3.11	A6' nin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu	58
Şekil 3.12	A6' nin FT-IR Spektrumu	59
Şekil 3.13	hCA-I enziminin elüsyon grafiği	60
Şekil 3.14	hCA-II enziminin elüsyon grafiği	61
Şekil 3.15	Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine A1' in % aktivite-[I] grafiği	69
Şekil 3.16	Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine A1' in % aktivite-[I] grafiği	69
Şekil 3.17	Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine A2' nin % aktivite-[I] grafiği	70
Şekil 3.18	Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine A2' nin % aktivite-[I] grafiği	70
Şekil 3.19	Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine A3' ün % aktivite-[I] grafiği	71
Şekil 3.20	Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine A3' ün % aktivite-[I] grafiği	71
Şekil 3.21	Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine A4' ün % aktivite-[I] grafiği	72
Şekil 3.22	Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine A4' ün % aktivite-[I] grafiği	72
Şekil 3.23	Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine A5' in % aktivite-[I] grafiği	73
Şekil 3.24	Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine A5' in % aktivite-[I] grafiği	73
Şekil 3.25	Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine A6' nin % aktivite-[I] grafiği	74
Şekil 3.26	Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine A6' nin % aktivite-[I] grafiği	74
Şekil 3.27	hCAI ve hCAII enzimlerinin IC <sub>50</sub> değerleri	75

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	Karbonik anhidraz izoenzimleri	28
Çizelge 1.2	Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	30
Çizelge 3.1	A1'in hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC <sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	62
Çizelge 3.2	A2'nin hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC <sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	63
Çizelge 3.3	A3'ün hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC <sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	64
Çizelge 3.4	A4'ün hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC <sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	65
Çizelge 3.5	A5'in hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC <sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	66
Çizelge 3.6	A6'nın hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC <sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.	67

## **ÖNSÖZ**

Bu çalışmanın tamamlanmasında ve yüksek lisans süresince bana yol gösteren, tecrübelerinden faydalandığım ve her zaman yanımda olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Baki ÇİÇEK' e ve yüksek lisansa başlamamda en büyük etkenlerden biri olan ve kendime örnek aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve çok değerli hocam Prof. Dr. Ümit ÇAKIR' a saygılarımı arz ederim.

Çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Nahit GENÇER' e, tezimin düzenlenmesinde emeği geçen Yrd. Doç. Dr. İsmet BAŞARAN' a, biyokimya çalışmalarında en az benim kadar yorulan Dudu DEMİR' e, laboratuvar arkadaşlarım ve aynı zamanda hocalarım Arş. Gör. Arzu GÜMÜŞ' e ve Şeref KARADENİZ' e, yüksek lisans süresince yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Taner ÖZCAN' a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana desteğini esirgemeyen cefakar annem Sultan ERGÜN' e, sevgili ablam Elif TELCİ ve eşi Levent TELCİ' ye, biricik kardeşim Sibel ERGÜN' e en içten sevgilerimi sunarım. Tezimi, merhum babam Cenap ERGÜN' e ithaf ediyorum.

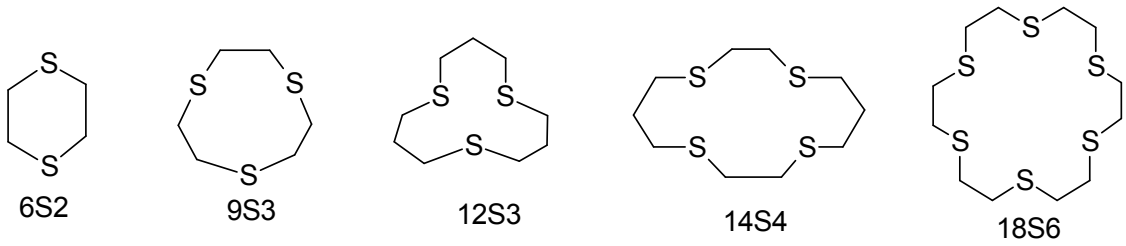
**Balıkesir, Ocak 2011**

**Adem ERGÜN**

## 1. GİRİŞ

### 1.1. TİYOCROWN ETERLER

Tiyocrown eterlerin tarihi 1886'ya dayanmaktadır. Mansfeld 1,4,7-tritiosiklononan'nın (9S3) sentezini yapmıştır[1]. Bu zamana kadar, sikloheptanon ve sikloheptilamin hariç, altı atomdan daha fazla halkalı hiçbir molekül bilinmiyordu. İlk teşebbüs olarak Mansfeld altı üyeli halkadan daha geniş yapıya halka sentezini 1,2-dibrometan ile sodyum sülfürü reaksiyona girdirmek suretiyle 9S3 ürününü izole etmeyi başarmıştır. Buna benzer bir metotla 12S3'ü 1,3-dibromopropan'dan sentezlemiştir.



Şekil 1.1. Tiyocrown eterlerden bazı örnek moleküller

Ray, 9S3'ün ilk serisini 1920 yılında yayınladı[2] ve 1,2-dibrometan ile potasyum hidrojen-sülfürün reaksiyonu sonucunda etanditiyolün sentezini gerçekleştirdi [3].

Bununla beraber aslında tiyocrown eter tarihi 1934'lere dayanmaktadır. Meadow ve Reid sadece sülfür heteroatomu içeren makro halka polieter bileşiklerini ilk izole eden bilim adamlarıdır[4]. Onlar sodyum etanditiyolatı 1,2-dibrometan ile reaksiyona girdirerek farklı halka genişliğine sahip halkalı polieter içeren kompleks reaksiyon

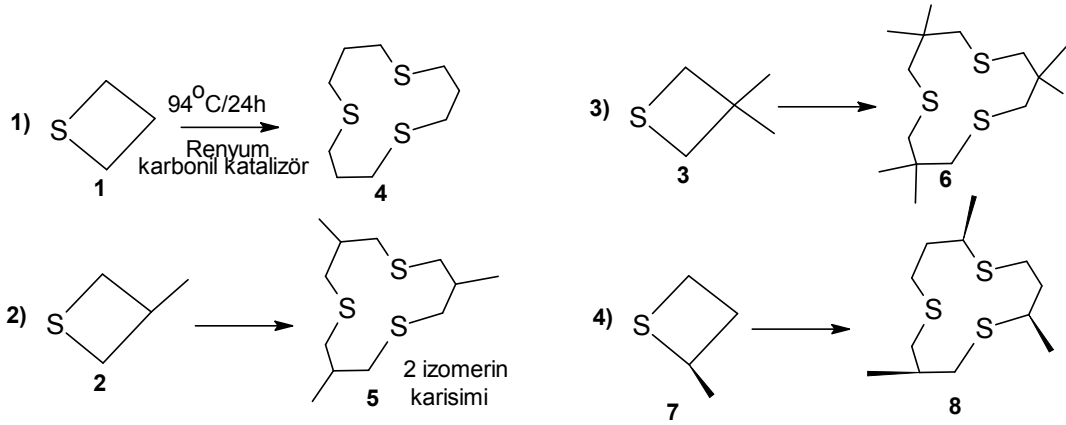


karışımı elde etmişlerdir. Bu karışımdan 1,4,7,10,13,16-hekzatiyasiklooktadekan (18S6) elde etmişlerdir.

Otuz yıldan daha fazladır tiyocrown eterlerle ilgili yeni, dikkat çekici ve onların metal iyonlarıyla olan özelliklerinin farkına varılmaya başlanmıştır. 1969'da Rosen ve Busch, 14S4'ü sentezlediler ve bunun nikel(II) kompleksini hazırladılar[5].

Tiyocrown eterlerin makrohalkalı formasyonunun karbonil grubu kapsadığı önceden biliniyordu[6-9]. Makrosilik eter-ester bileşiğinin[10], eter-ester içeren geniş kapsamlı polieter-diester bileşiğinin[11-18], tiyoeter-ester[13,15,17,19] ve eter-tiyolester[13,17] bileşiğinin sentezi, Bradshaw, Izatt ve Christensen tarafından dibazik asit tuzu ve alfa, omega-dihalo bileşikler veya dibazik asit klorürleri ve alfa, omega-dihidroksi bileşiklerinden herhangi birine bağlanarak hazırlandı. İki makrohalkalı polieter-monoester bileşikler Matsushima[20] tarafından normal verimlilikle raporlandı. Edema ve çalışma arkadaşları[21] diketo-fonksiyonelleşmiş tiyocrown eterleri %38-57 verimle sentezledi.

Makrohalkalı politiyoeeterler veya tiyocrown eterler katalitik olarak, thietan (1) [22,23], 3-metilthietan (2) [24] ve 3,3-dimetilthietan (3) [25] bileşiklerini kapsayan ve thietanlar olarak bilinen gergin halkalı tiyoeterlerden renyum ve tungsten karbonil katalizörü kullanılarak elde edilebilmektedir. Bu reaksiyonların esas ürünü tritiosiklododekanlar: 12S3 (4), Me312S3 (5) ve Me612S3 (6)'dır. Tiyocrown eterler geçiş metalleri için ligand olarak davranmalarından dolayı ilgi çekmişlerdir [26]. Kiral fosfin ligandı içeren metal komplekslerinin asimetric indirgemeye çok miktarda katalizleme gösterdiği belirlenmiştir[27]. Bununla beraber tiyocrown ligandı içeren metal komplekslerinden ayrılan katalizör örnekleri çok az miktarda oluşmuştur[28].



**Şekil 1.2.** Bazı makrohalkalı tiyocrown eterler

Makrohalkalı bileşikler çoğunlukla faz transfer reaksiyonları, biyometrik çalışmalar ve metaller için spesifik ve selektif kompleks ajanı olarak kullanılırlar. Son günlerde makrohalkalı iskeleti çevresi crown eter türevleri, eterik veya aniyonik gruplarla şekillendirilmiştir. Analitik ve ayırma metodlarında, bunun yanı sıra biyolojik membranlarda metal seçiciliğini ve kompleksleşme stabilitesini artırmak amacıyla da çalışmalar yapılmıştır[29-35].

Tiyocrown eterlerle ilgili araştırmalar yetersizdi ve iyi ürün için sentetik bir yol henüz bilinmiyordu. 1969'da Black ve McLean, 18S6'nın sentezini geliştirmiş olarak gerçekleştirmişlerdir[36]. Black ve McLean, etanol'de high dilution (yüksek seyreltik) şartlara başvurmuşlardır. Bu şartlar altında 18S6'yı %31 verimle elde ettiklerini iddia etmişlerdir. Bununla beraber aynı verim diğer araştırmacılar tarafından tekrar gerçekleştirilememiş ve Cooper ve Ochrymowycz'in araştırma grupları 18S6'yı %8 verimden yukarı çıkamayarak bağımsız olarak sentezlemeyi başarmışlardır[37].

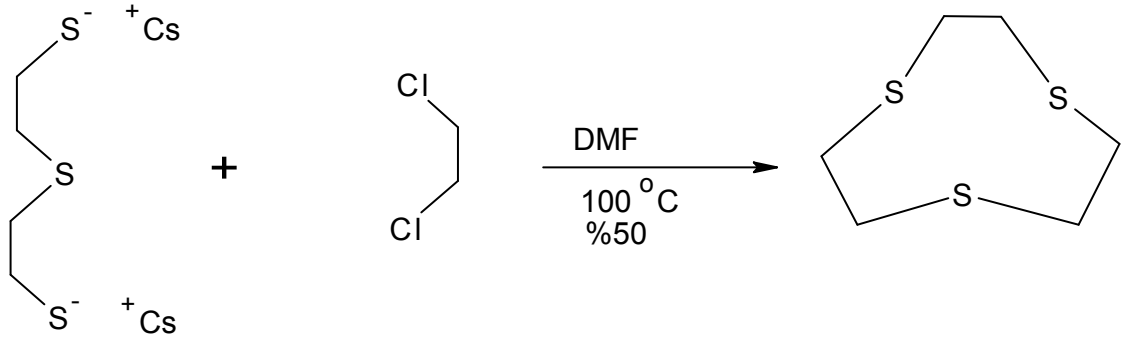
Oksijen içeren crown eterlerin özellikle katyonlarla koordine davranışı yoğun olarak çözüldüden alkali metal iyonlarını izole etmek ve bağlamak için kullanılmıştır [38, 39].

Azot ve kükürt donör atomları içeren halkalı bileşikler ve bunların ağır geçiş metallere yüksek afinite göstermesiyle birlikte bu bileşiklerin metal seçiciliği, donör atom ve halka boyutunu değiştirerek kolayca akort edilebilir olması oldukça ilgi çekicidir. O,N,S-donör crown eterler ilginç bir bileşik sınıfı oluşturur ki yumuşak metal katyonları için seçici ekstraktant ve bazı enzimlerin aktivitesi için bir model olarak kullanılmıştır[40-42]. Karışık donör crown eterlerin geçerliliği sentetik zorluklardan dolayı sınırlıdır ve çok farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu araştırmada karışık donör crown eterlerin oluşması için yeni sentetik bir yol izlenmiştir. Yapısında O,N,S içeren ligandlar organik polimerik reçinelerde, bu ligandların immobilizasyonundan sonra, geçiş metal iyonlarının seçici ekstrakte ettiler. Bu seçicilik ligantın makro halka boyutu ile ahenk içinde olduğunu gösterdi[43,44]. Ek olarak, N-sübstitüe karışık donör crown eterlerin redoks kemosensörler veya anyon ve katyonların eş zamanlı bağ yapmaları için host - guest (ev sahibi - konuk) biçiminde uygulamaları bulunabilir[45-48].

Sadece oksijen atomu içeren crown eterler genellikle uygun dihalojenür veya baz varlığında (NaOH) ditosilat türevleri ile uygun diol reaksiyonu yoluyla elde edilebilirler[38]. Bu tip halka kapama, polieter bileşikleri ile alkali metal iyonlarının güçlü templet etkisinden dolayı başarılı bir şekilde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Sülfür atomu içeren sentezlerde, bununla beraber böyle bir templet etki olmadığından dolayı daha az başarılı olunmuştur ki, bu durum sülfür atomlarının oksijene göre alkali metal iyonlarına karşı daha düşük bir afinite göstermelerinden kaynaklanabilir. Bu yüzden 3-tiyo-1,5-pentanditiyol ile 1,2-dikloroetan, NaOH varlığında ve EtOH içinde daha düşük (0,04%) halka ürünü verir[49].

Son zamanlarda, tiyocrown eterlerin sentezi için Buter ve Kellogg tarafından farklı bir metod geliştirilmiştir (Şekil 1.3) [48]. Bu metod, reaksiyon zamanının uzatılmasıyla high dilution (yüksek seyreltik) şartlar altında, DMF içinde ditiyol ve dihalojenürün halkalaşmasını  $Cs_2CO_3$  varlığında gerçekleştirir.  $Cs^+$  iyon formu tiyolatla zayıf iyon çiftlerinden dolayı sülfür atomunu oldukça nükleofilik ve daha reaktif yapar. Bu metod kullanılarak 9S3 ürünü %50 oranında sentezlenebilmektedir[49]. Benzer bir

şekilde ditiyol veya dihalojenürün türevleri değiştirilmek suretiyle oksatidyocrown eterler ve süstitüe makro halkalar sentezlenmiştir[52-54].



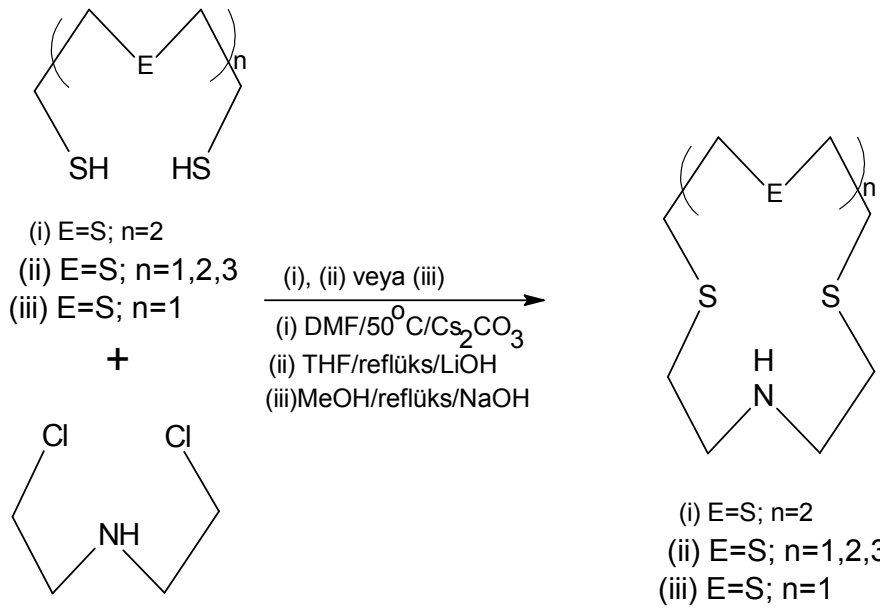
**Şekil 1.3.** Buter ve Kellogg tarafından sentezlenen tiyocrown eter

Azatiyocrown eterler için alternatif sentetik prosedürler tosilatlı ara ürünlerden kaçınılması gerektiği vurgulamaktadır. [15]aneNS<sub>4</sub> halkalı ürün verimi oldukça düşük olmasına rağmen, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> varlığında DMF içinde high dilution (yüksek seyreltik) şartlar altında 3,6-ditiya-1,8-oktanditiyol ve 1,5-dikloro-3-azapentandan direkt olarak hazırlanmıştır (Şekil 3(i)) [55]. [12]aneNS<sub>3</sub>, [15]aneNS<sub>4</sub> ve [18]aneNS<sub>3</sub> 1,5-dikloro-3-azapentan ve uygun ditiyollerden %26 - % 39 verimle hazırlandı (Şekil 1.4 3(ii)) [54]. Benzer şekilde, [12]aneNOS<sub>2</sub> NaOMe varlığında MeOH içinde 3-oksa-1,5-pentanditiyol ve 1,5-dibromo-3-azapentandan hazırlanmıştır (Şekil 1.4(iii))[56].

N-alkilasyon olgusu ve yarışmalı polimerizasyon reaksiyonları ditiyol ve korunmamış bis(2-haloetil) aminin kullanılmasından dolayı başlıca bir dezavantaj olarak açığa çıkar. Metal templet etkisi halka kapama reaksiyonlarını kolaylaştırmak için kullanılmıştır. Örneğin; [9]aneS<sub>3</sub> bileşiği 1,2-dibromoetan ve 3-tiya-1,5-pentanditiyol arasındaki reaksiyonla Mo(CO)<sub>3</sub> fragmenti kullanılarak iyi bir verimle hazırlanmıştır. Bu reaksiyon katalizör olarak molibdenyum kullanılarak da olarak yapılabilir[57].

Bu yüzden makrohalka sentezlerinde sentetik problemler, (I) Önce koruyucu ve koruyucusuz gruplar ve daha sonra halka kapama, (II) yan reaksiyonla sonuçlanma ve

polimerik ürünler, (III) yüksek seyreltik şartlar veya iki reaktifin dikkatlice ortama ilave edilmesi şeklinde sonuçlanmaktadır. Tosil grubu ise makro halka sentezlerinde koruyucu grup olarak yaygın bir şekilde kullanılır ve ağır reaksiyon şartlarına karşı yüksek kararlılık sağlar[59]. Tosil grubunun başlıca dezavantajı ise karışık donör crown eterlerden uzaklaştırılmasının güçlüğüdür[60].



**Şekil 1.4.** Koruyucu kullanmaksızın sentezlenmiş karışık-donör atom içeren crown eterler

Koruyucu grup olmaması durumunda zorlukların üstesinden gelmek için halkalaşma reaksiyonlarında sekonder aminleri korumak için t-butiloksikarbonil (t-boc) grubu kullanılması tercih edilmiştir. t-boc gruplarının avantajları şunlardır: (i) sekonder aminlerle kolayca etkileşebilmektedirler, (ii) halkalaşma reaksiyonu süresince uzaklaştırılmazlar, (iii) t-boc grubu ile korunmuş crown eterler kolon kromatografisiyle kolayca saflaştırılabilirler ve (iv) t-boc grupları halkalı yapıyı etkilemeksizin hafif asidik şartlar altında uzaklaştırılırlar. Sübstitüe olmamış oksamonoazatiyocrown eterlerin sentezi için anahtar ana ürün gibi N-boc-bis(2-kloroetil)amin kullanılması önerilmiştir.

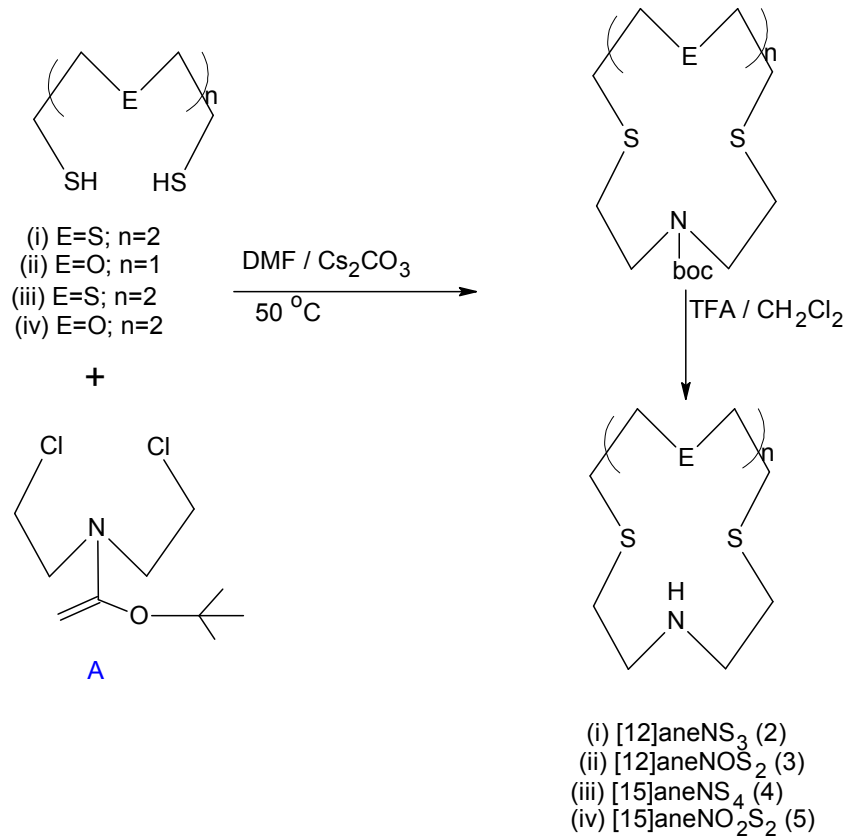
İkinci olarak N,N'-bis(kloroasetil)-diamino alkanlar ile ditiyollerin reaksiyonu sonucu diazatiyocrown eterler sentezlenmiştir.

Bu yolla halkalaşma reaksiyonu süresince hiçbir yan ürün meydana gelmez, azot atomları amit bağı tarafından korunur ve boran-THF içinde ılıman indirgenme süstitüe olmamış diazatiyocrown eterleri meydana getirir. Son olarak hidroksit içeren tiyocrown eterler ve N-aril-süstitüe monoazatiyocrown eter sentezi rapor edilmiştir.

### 1.1.1. Tiyocrown Eterlerin Sentezinde Sentetik Metotlar

A (1-*tert*-bütoksivinil)bis(2-kloroetil)amin) molekülünün uygun ditiyolle reaksiyonu, DMF içinde iyice karıştırılmış Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bazı varlığında gerçekleştirilmiştir. Genellikle konsantrasyonlar 50 - 100 mmol/L ve sıcaklık ise 65 - 100° C aralığındadır. Bu prosedür Buter ve Kellogg tarafından gerçekleştirilmiştir[13]. Makro halka sentezler [12]aneNS<sub>3</sub> (2), [12]aneNOS<sub>2</sub> (3), [15]aneNS<sub>4</sub> (4) ve [15]aneNO<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (5) Şekil 1.5' de örneklendirilmiştir. Benzer şekilde [16]aneNS<sub>4</sub> (6) A molekülü ve 3,7-ditia-1,9-nonanditiyolden hazırlanmıştır. Ham boc ile korunmuş ürünler 35-40% verimle kolon kromotogromofisi tarafından saflaştırılmış veya (boc-2, 55% verim) ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

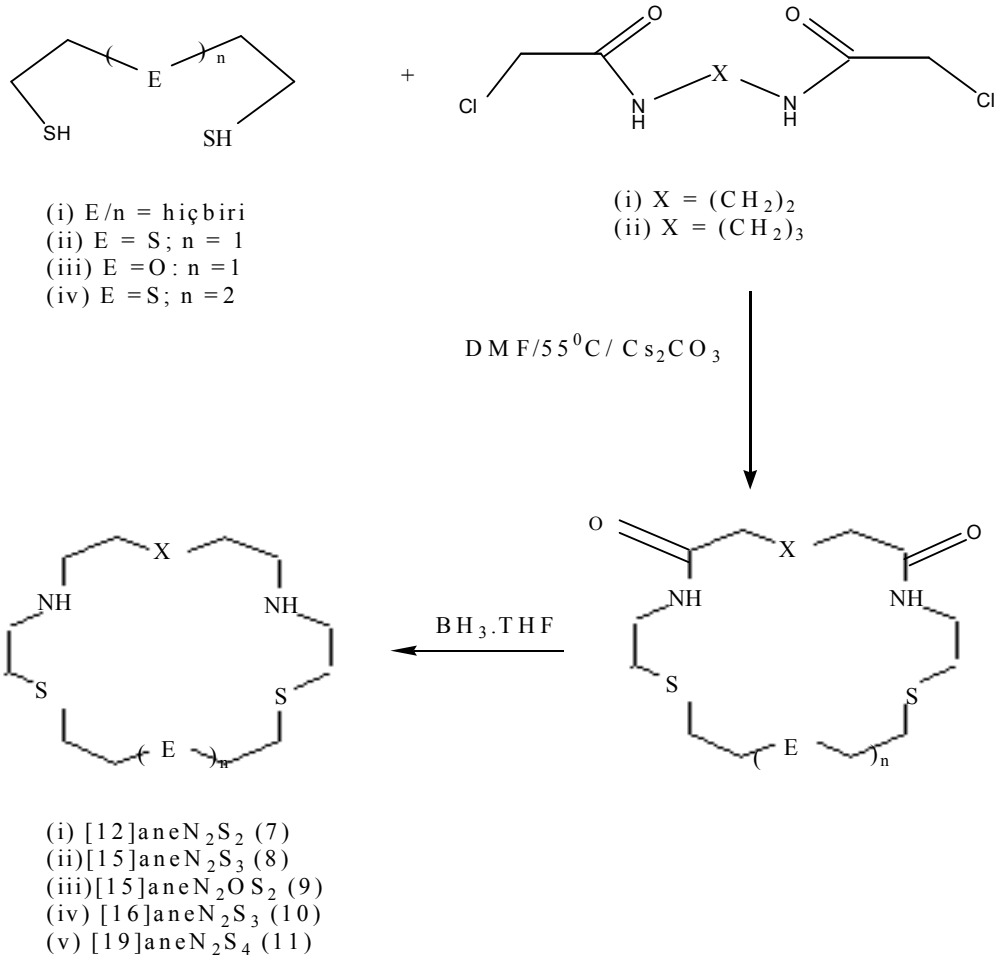
Her bir durumda boc ile korunmamış moleküller, boc ile korunmuş crown eterler TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> karışımı ile karıştırılarak uygulanmıştır. Sonuçta %90 verimle korunmamış makro halka elde edilmiştir.



**Şekil 1.5.** 2,3,4,5 oksamonoazatiyo crown eterlerin boc ile korunmuş bis(2-kloroetil)amin ile reaksiyonundan elde edilmiş ürünleri

N-merkezli 2 ajan içeren karışık donör makro halkaların serileri, [12]aneN<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (7), [15]aneN<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (8), [15]aneN<sub>2</sub>OS<sub>2</sub> (9), [16]aneN<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10) ve [19]aneN<sub>2</sub>S<sub>4</sub> (11); N,N'-bis(kloroasetil)-1,2-diaminoetan ve N,N'-bis(kloroasetil)1,3-diaminopropan kullanılarak hazırlanmıştır(Şekil 1.6). Halkalaşma, ditiyol kullanılarak orta seyreltik şartlar altında DMF / Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> varlığında gerçekleşmiştir.

Makro halka diamit ara ürününün CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ile ekstraksiyonu, makro halkalaşmada oluşan asıl ürünü, polimerik materyalden kolayca ayrıştırabilmeyi sağlamıştır. [12]aneN<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (7) bunun dışındadır. 15 üyeli diamit halkalaşma ürünleri %60-70 oranındadır. 1,4-ditiyo-7,10diazasiklododekan-6,11-dionun ürünü daha düşük ve polimerik materyal olduğundan meydana gelmesi oldukça zor olmuştur.



**Şekil 1.6.** Syn-azot içeren makro halka sentezi

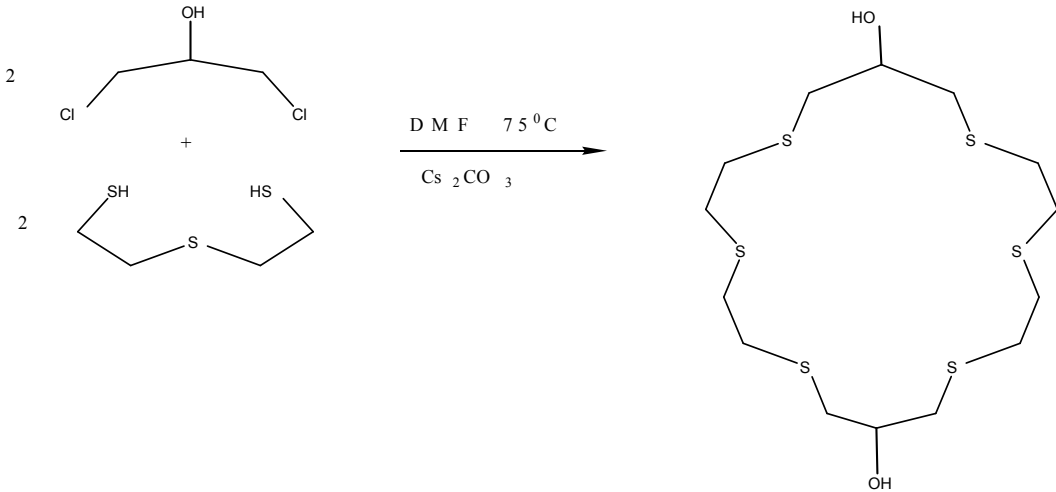
Doymuş makro halkalar boran-THF ile diamidin indirgenmesi ile iyi verimde elde edilmişlerdir. [12]aneN<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (7) için polimerik metaryellerden hiçbir zorluk meydana gelmemiştir.

Reaksiyon süresi indirgenme basamağında 8-12 saat olduğunda ideal ürünler elde edilmiş ve 20-40 saat olduğunda verimi daha düşük ürünler (%5-10) elde edilmişlerdir. Kolon kromatografisi analitik saf örnekleri elde etmek için kullanılabilmesine rağmen, çoğu durumda saflaştırılmaksızın kullanılması için ham materyal uygundur. Ayrıca 7,13-diaza-1,2-dioksa-10-tia-siklopentadekan-8,12-dion'un indirgenmesi rapor edilmiş, 3,6-dioksa-1,8-oktandiaminden hazırlanmış ve aynı prosedür kullanılarak MeOH [59]

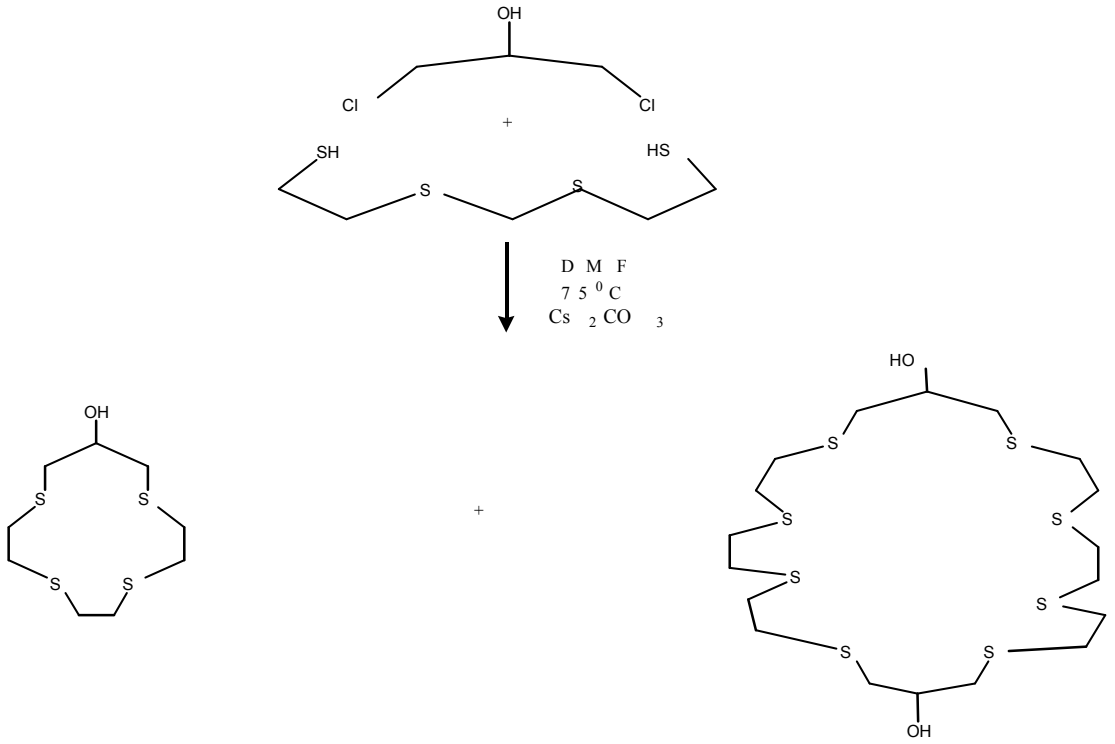


içinde tiyodiglikolik asidin dimetil esteri gösterilmiştir. İndirgenme basamağı etkili ve makro halka [15]ane N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (12)'yi %60 verimle meydana getirmiştir.

Aynı metodoloji kullanılarak A ara ürünü diğer aza-tiyoeter makro halka hazırlanmıştır. Bu makro halkalar [20]aneS<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> (i3) (Şekil 1.5), [13]aneS<sub>4</sub>(OH) (i4) [32] ve [26]aneS<sub>8</sub>(OH)<sub>2</sub> (i5) (Şekil 1.6) 1,3-dikloro-2-hidroksi propanın uygun ditiyollerle reaksiyonu yoluyla hazırlanmıştır. 20 üyeli makro halkaların hazırlanışı, i3, ayrıca [1+1]10 üyeli makro halka küçük miktarlardadır ki bunun saflaştırılması oldukça zordur. 13 ve 26 üyeli makro halka aynı reaksiyon karışımından elde edilir ve kolon kromatografisi tarafından saflaştırılır. Bu makro halkalar syn/anti karışımı elde edilirler ve birbirinden ayrılmazlar, bununla beraber [20]aneS<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> (i3) kristalleri X ışınları analizi ile aydınlatılmıştır.



**Şekil 1.7.** Hidroksil grubu içeren [20]aneS<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>' nin sentezi



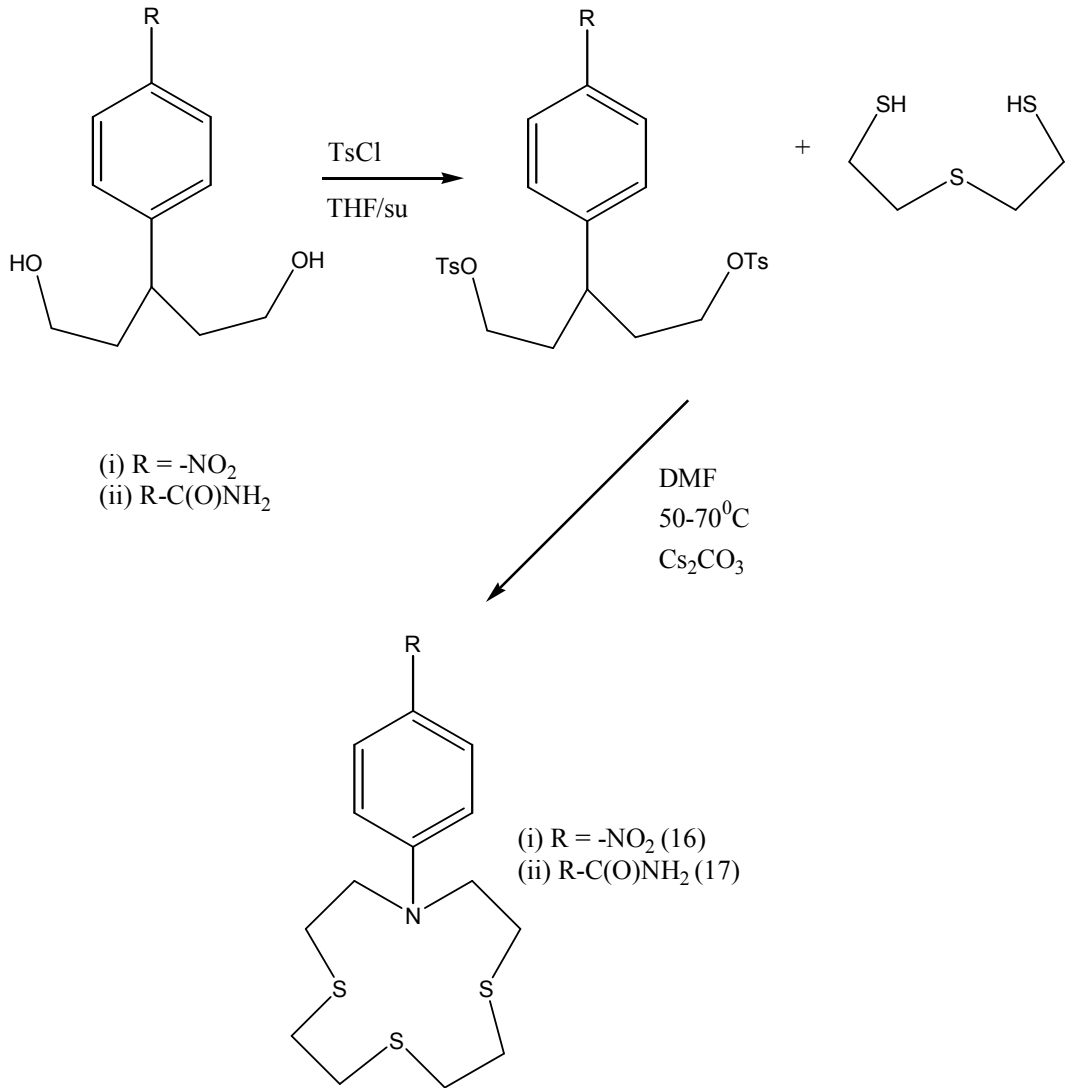
**Şekil 1.8.** Hidroksil grubu içeren [13]aneS<sub>4</sub>(OH) ve [26]aneS<sub>8</sub>(OH)<sub>2</sub>' nin sentezi

Makro halkalarda aza parçasına modifikasyonlar kolay olur ve bazı durumlarda yüksek verimle gerçekleşir[52-54], doğrudan aril grupları makro halkayla etkileşmeyi tercih eder. N-merkezli makro halka çiftler çoğunlukla problemlidir, hatta Pd katalizörlü reaksiyonlar vasıtasıyla oksacrown eter analoglarında iyi verimler meydana getirir[62].

Pd katalizli yolların N-aril-sübstitüe azatiyo crownlara katılmasındaki başlıca sorun yüksek afinite olmasına yol açar ve bu durumda palladyum merkezli makro halkaların bağ yapmasına neden olur. Bu nedenle katalizör etkisiz hale gelir. Bununla beraber literatürde aril-sübstitüe aza tiyo-eter makro halkaların bazı çalışma sonuçları onların hazırlanma yolları ve verimlerinde değişiklik göstermesine rağmen bilim adamları N-arilsübstitüeleri kullanmaya eğilim göstermişlerdir[34].

Bu tip makro halkaların ilginç olan tarafı onların çok potansiyel kullanışlı olmasından kaynaklanır. Örnek olarak selektif metal sensörler, metal ekstraksiyon ve moleküler düğümlerdir. Bu çalışmada aril-süstitüe aza-tiyoeeter makro halkaları ayrılan grup olarak tosilatları kullanılarak makul ürünler oluşturmak için bir yol geliştirilmiştir. Genel halkalaşma prosedürü yukarıda verilmiştir. Bu metodoloji ayrıca N-aril süstitüeleri ve tosilatları Kellogg şartları altında kullanılmaktadır[50]. Kullanılan şartlar altında ayrılan grup olarak iyot gibi, tosilatlar, tiyolatlar için reaktif olamamasına rağmen buradaki makro halka reaksiyonlarında memnun edici, iyi verimler elde edilmiştir.

Bu yüzden N,N-bis(2-hidroksietil)-4-nitroanilin ditosilatlı türevlerinin karışımı THF/su karışımı tosil klorürle diolün reaksiyonundan iyi bir verimde hazırlanmıştır ve DMF içinde 3-tiyo-1,5-pentan-ditiyol 70°C'de DMF içinde Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> yavaşça ilave edilmiştir(Şekil 1.9). Sonuçta N-4-NO<sub>2</sub>Ph-[12]aneNS<sub>3</sub> (N-4-nitrofenil-7-aza-1,4,10-tritiosiklododekan) (16) makro halka ürünü kristallendirmek sureti ile %47 verimle elde edilmiştir. Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilavesi reaksiyonların akıcı bir şekilde yer değiştirmesi için gereklidir ve sıcaklık 50-70°C de olması gereklidir. Çünkü başlangıç materyalleri veya polimerik materyallerin geri alınmasından kaçınmak için büyük öneme sahiptir. Benzer şekilde N-4-NH<sub>2</sub>COPh-[12]aneNS<sub>3</sub> (N-4-benzaamido-7-aza1,4,10-tritiosiklododekan) amit fonksiyonel grubunun amino grubuna indirgenmesi ile hazırlanmıştır.

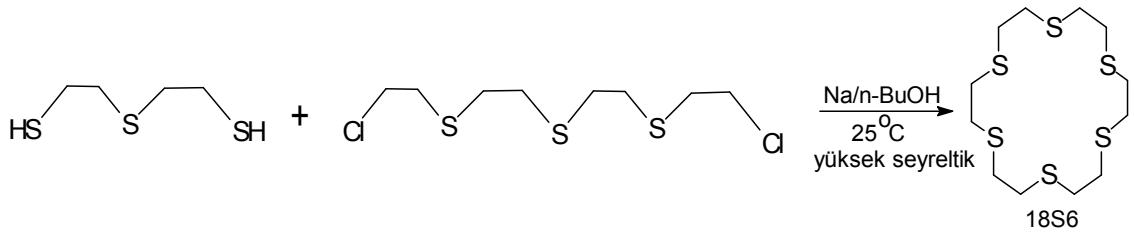


**Şekil 1.9.** N-4-NO<sub>2</sub>Ph-[12]aneNS<sub>3</sub> (16) ve N-4-NH<sub>2</sub>COPh-[12]aneNS<sub>3</sub> (17)' nin sentezi

## 1.1.2. Tiyocrown Eterlerin Sentezi İçin Genel Bir Yol

### 1.1.2.1. Sodyum / n-bütanol Metodu

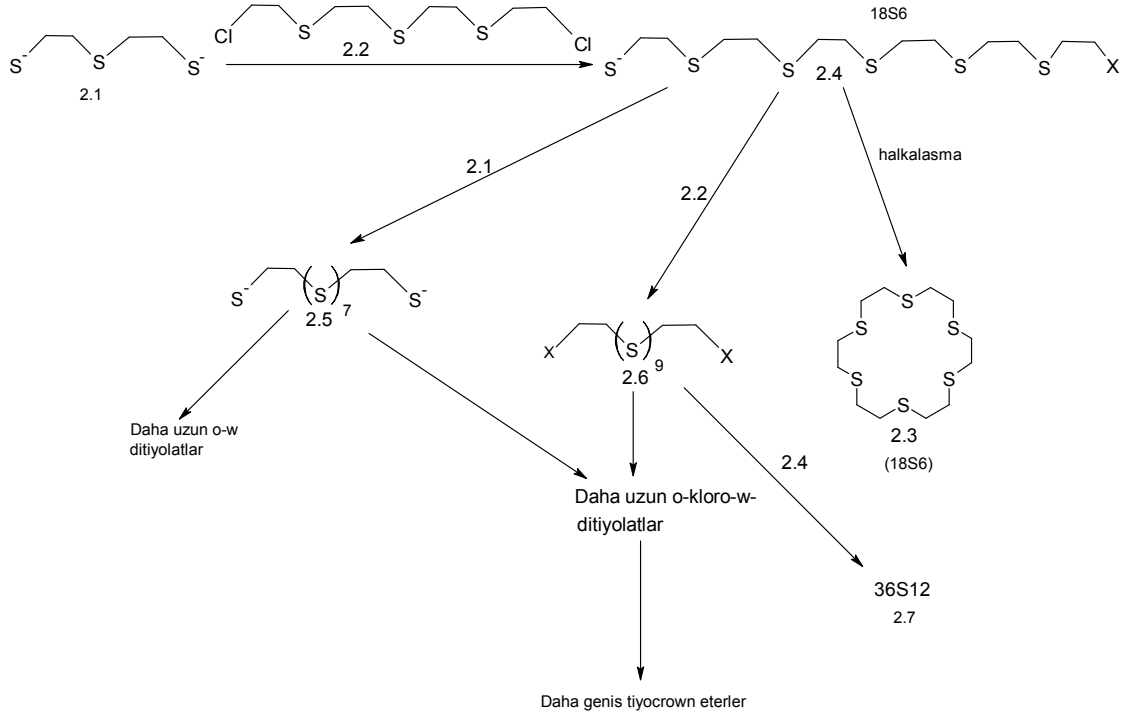
Makro halkaların sentezinde karşılaşılan genel bir problem asiklik reaksiyonunun halka kapanmasıdır. Metodlar makro halka sistemlerin oluşmasında istenmeyen entropi etkilerinden kaçınmak için geliştirilmek zorundaydı. Oksa-tiyocrown eterler Pedersen ve Bradshaw tarafından sentezlendikten sonra, Ochrymowycz ve çalışma arkadaşları sadece sülfür heteroatom içeren tiyocrown eterlerin sentezi üzerinde sistematik olarak çalışan ilk kişilerdir[63,64,65] ve oda sıcaklığında n-bütanol içinde diklorürü ditiyolün disodyum tuzunun seyreltik çözeltisine yavaş yavaş ekleyerek %13 verimle 18S6'yı sentezleyebilmişlerdir.



**Şekil 1.10.** Ochrymowycz tarafından sentezlenen 18S6

Birkaç faktör bu reaksiyonun verimi ve ürün dağılımını etkiler. Reaktantların konsantrasyonları halkalı ve lineer ürünlerin oranını etkiler. Bu reaksiyonun ilk basamağında S<sub>N</sub>2 tarzı reaksiyon gerçekleşirken bir ara ürün oluşur. Bu ara ürün, halkalı ürün vererek intramoleküler reaksiyon gerçekleştirir veya lineer ürün vererek intermoleküler reaksiyon da gerçekleşir. Reaksiyon yüksek seyreltik koşullar altında gerçekleştirildiği zaman halka ürünlerinin oluşması yüksek verimle olacaktır.

Ayrıca halka ve lineer ürün oranı ayrılan gruba göre etkilenir. Klorür yerine bromür kullanıldığı zaman daha çok halka ürün oluşmaktadır. Moleküller arası reaksiyon (intermoleküler), molekül içi (intramoleküler) reaksiyona göre daha fazla tercih edilir. Bromür, klorürle karşılaştırıldığında bromür daha kolay ayrıldığından dolayı lineer ara ürün daha reaktif olmaktadır. Yüksek seyreltik uygulandığı zaman diğer lineer bromürle veya tiyolat molekülü ile intermoleküler çarpışma yapmadan önce 2.4' ün intramoleküler reaksiyon şansı artırılmış olur. Bununla beraber bromür yerine klorür kullanıldığı zaman daha geniş halkalar ve polimerik materyaller oluşacaktır. 2.2 bileşiği ve 2.4 ara ürünü onların bromür analoglarından daha az reaktiftir. Bu reaksiyon karışımında 2.4 (X=Cl)'ün reaktivitesini azalttığı için nispeten uzun olacaktır. (X=Cl) bu reaksiyon karışımına sabit bir hızda ilave edildiği zaman bu reaksiyon karışımında her ikisinin konsantrasyonları 2.2 (X=Cl) ve 2.4 (X=Cl) nispeten yüksek olacak ve 2.6 (X=Cl)'nin oluşması üzerinde bu iki bileşik arasında intermoleküler reaksiyon şansı yükselerek sonuçlanacaktır.



Şekil 1.11. 2.1 ve 2.2'nin halkalaşmasında yan ve ana ürünler (X = Cl, Br)

Daha uzun lineer ara ürünler zincirinin oluşması tercih edilir, son olarak daha geniş halka tiyocrown eterlerin veya polimerik materyalin oluşmasıyla sonuçlanır.

### 1.1.2.2. Sezyum karbonat / DMF metodu

1980'de Ochrymowycz'nin metodu çözücü olarak dimetilformamit (DMF) ve sodyum tiyolat yerine sezyum karbonat kullanılarak Buter ve Kellogg tarafından geliştirilmiştir[50,66]. Bu metot DMF'de çözülmüş dihalojenür ve ditiyolün eşit mollerdeki karışımı DMF'de çözülmüş  $Cs_2CO_3$ 'a yavaş katılmasıyla meydana gelir[67]. DMF çözücüsü içerisinde  $Cs_2CO_3$  ditiyolün protonlarını kopararak sezyum ditiyolat oluşur. Bu ditiyolat tiyocrown oluşturmak için dibromür ile reaksiyona girer. Bu metotla seyreltik koşullar altında makro halka reaksiyonları başarılabilir. Bu metotta sezyum tuzlarının kullanılması önemli bir rol oynadığı gözükmektedir, nispeten yüksek ürün meydana gelmesi "sezyumun etkisi"ne dayandırılmaktadır.

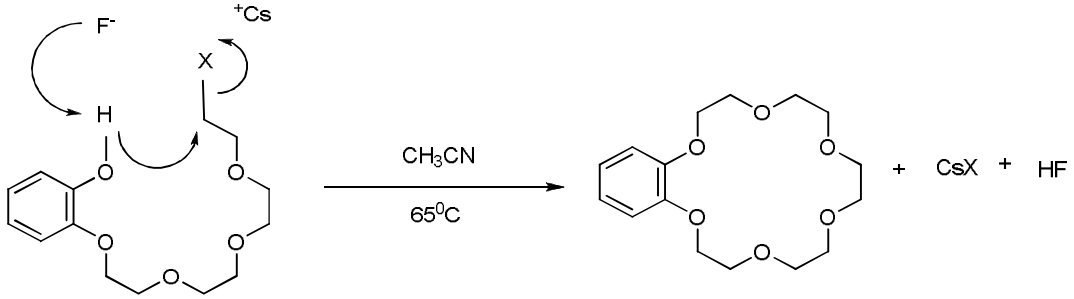
$Cs_2CO_3$  / DMF metodu tiyocrown eter sentezinde genel bir yol olarak uygulanabilir. Tiyocrown eterler ve karışık oksa-tiyocrown eterler yüksek verimle (genel olarak %70-90) sentezlendi. Bu metotla 18S6, %76 verimle, multi gram sıklaya ulaşılmıştır[68].

### 1.1.2.3. Sezyum Etkisi

Zayıf organik asitlerin sezyum tuzları süstitüsyon reaksiyonlarda çok etkili nükleofillerdir[69]. Onlar genellikle  $S_N$  tipi reaksiyonlarda aşırı bir şekilde reaksiyon verirler[70,129].

İntramoleküler süstitüsyon reaksiyonlarda yüksek verimler sezyum karbonat ile elde edilebilir. Farklı alkali metal karbonatlar makro halka reaksiyonlarda bir baz gibi kullanıldığı zaman ürün  $LiCO_3 \ll NaCO_3 < K_2CO_3 < Rb_2CO_3 < CsCO_3$  şeklinde artar[50,68]. Bu etki genel olarak tiyolatlı, alkalolatlı, fenolatlı, karboksilatlı, tosilamitli

ve yüksek gergin halkalı bileşiklerin sentezinde, makro halkalarda gözükmemektedir[50,66,68,71-74]. Bununla alakalı reaksiyon katı alkali metal florürün aşırısının hazırlanmasında ditosilatlarla katekollerin halkalaşmasıdır[75]. Florür iyonu, eter bağının oluşmasını sağlayan iyi bir nükleofil meydana getirmek için güçlü bir bazdır. Ayrıca katyon da halka kapamalarda önemli rol oynar. Halkalaşma ürünün verimi katyonun doğasına bağlıdır. Halkalaşma ürünü kullanılan alkali florürlerde,  $KF < RbF < CsF$  şeklinde olmasıyla artar. LiF veya NaF uygulandığı zaman hiçbir halkalaşma ürünü elde edilmez. Sezyumun makro halka reaksiyonlarda neden bu kadar yararlı etkisi olduğu sorusu ortaya çıkar. Bu etki tam olarak anlaşılmamış ve literatürde bu etkinin tartışması yer almaktadır. Sezyumun etkisine katkıda bulunan birkaç faktör tartışılmıştır.

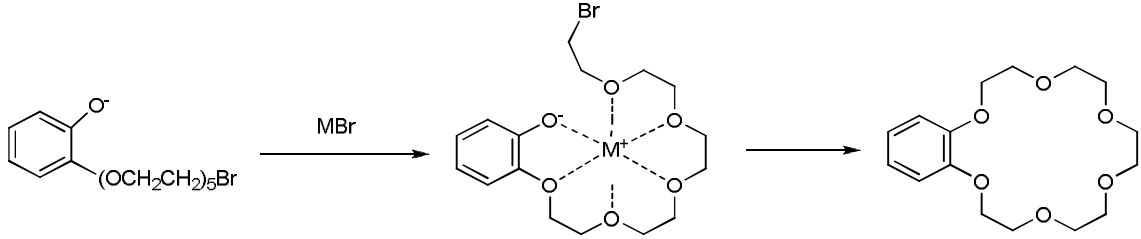


**Şekil 1.12.** Reinhoudt tarafından CsF yardımıyla sentezlenen crown eter

Alkali metal iyonları Williamson tipi halkalı eter oluşmasında oksacrown eterlerin oluşmasını kolaylaştırır. Bu olağan dışı etki ‘templet etkisi’ diye bilinir ve bu etki crown eterin metal iyonu ile kompleksleşmesinden kaynaklanır (Şekil 1.13). Makro halka reaksiyonlarda crown eterin tekli bağların etrafında internal rotasyondan dolayı konformasyonel entropi kaybı Gibbs enerji aktivasyonuna büyük bir katkı sağlar[76].

Alkali metal bromürler (LiBr hariç)  $o\text{-HOC}_6\text{H}_4(\text{CH}_2\text{CH}_2)_5\text{Br}$ ’nin tetrametilamonyum tuzları benzo-18-crown-6’yı oluşturmak için halka kapanmasını hızlandırır[77].



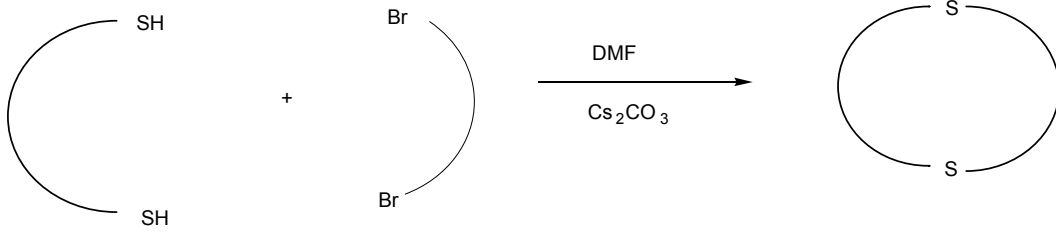


**Şekil 1.13.** Templet Etki

Crown eter boşluğuna tam olarak uyan bir metal iyonu olduğu zaman halka kapanma hızı maksimum olur. Benzo-18-oksocrown-6 için halka kapanma hızı  $\text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{Rb}^+ < \text{K}^+$  şeklinde artar, oysa Benzo-21-oksocrown-7 daha geniş crown eter halka kapanma hızı  $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Rb}^+ < \text{Cs}^+$  şeklinde artar[78].

### 1.1.3. Tiyo (bisklorometan) kullanarak $-\text{SCH}_2\text{SCH}_2\text{S}-$ içeren Makro Halka ve Mezohalkalı Tiyocrown Eter Sentezi

Makro halka tiyocrown eterler, oksijen ile birlikte olduğu analoglar 20 yıl boyunca sülfürün oksijen içeren moleküllerle uyumlu olarak özellikle de Hg, Ag, Cd ve Pb gibi ağır metallerle uygun bir kompleks yapmasından dolayı ilgi çekici bir konu olmuştur[78-81]. Metal komplekslerin büyük yapıları böyle koordine bileşikleri ve sentezlerini incelemek için çeşitli bilim adamlarını bu konu üzerinde çalışmaya teşvik etmiştir. Bu sistemlerin hazırlanması için laboratuarda geliştirilen strateji  $\alpha,\omega$ -sezyum ditiyolatın bifonksiyonel dihalajenür ile nükleofilik halkalaşmasıdır[50,52,67,82]. Bu, halka bileşiklerinin genel sentezi için bir yol olarak önerilmiştir (Şekil 1.14). Makro halka sentezinin başında, sülfür düğüm tarafı etilenik veya propilenik köprüler tarafından ayrılır.

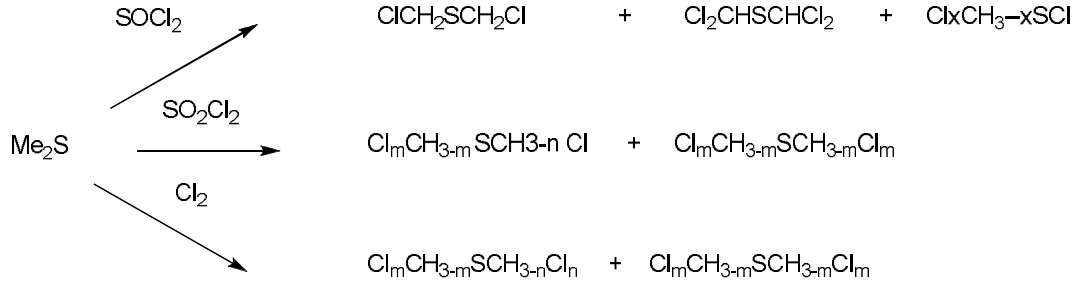


**Şekil 1.14.** Tiyocrown eterlerin halkalaşma reaksiyonunun genel gösterimi

Sülfür atomlarının iç-dış düzenlenmesiyle halka yapısını oluşturur. Tiyocrown eterlerin etkilerini gösteren bir çalışmayla alakalı olarak  $-SCH_2S-$  fragmenti içeren bileşikler hazırlamak için metodlara ihtiyaç duyulmuştu. Bir karbon köprülü sentezler biliniyordu[83-89]. Bunlar genellikle sülfür atomunun bütün cis konformasyonu makro halka ile alakalı olarak halka sistemi üzerinde bazı sertlik yükliyordu. 1,3,5-tritanyon ve 1,3-ditanyon gibi sistemler hariç sülfür fragmentleri içeren hiçbir sistematik ve etkili genel bir sentez stratejisi geliştirilmemişti.  $ClCH_2SCH_2Cl$  geniş bir skala rotası önceden geliştirilen sezyum tuzu metodu içinde bunun yapılabileceği ortaya koyuldu[50,52,67,82].

$-CH_2SCH_2-$  birimlerinin makro halka birleşmesi sentetik bir problemdir. Şekil 1.15’de gösterilen yaklaşım,  $XCH_2SCH_2CX$  üzerinde nükleofilik sübstitüsyonu çağırıştır. Bu birimin oksidasyonu diğer sülfür oksidasyonun tehlikesiz sülfon ve sülfoksidin ana girişinde izin vermeliydi. Bu çalışmada tritanyonun halka üzerinde yarılmalarının çinkobromürün katalitik etkisine dayalı olan  $ClCH_2SCH_2Cl$ ’ni geliştirilmiş ve uygun, sert tiyoketal fragmentleri içeren yeni tiyocrownların yeni serilerinin hazırlanmasında kullanılan yöntemleri tanımlanmıştır.

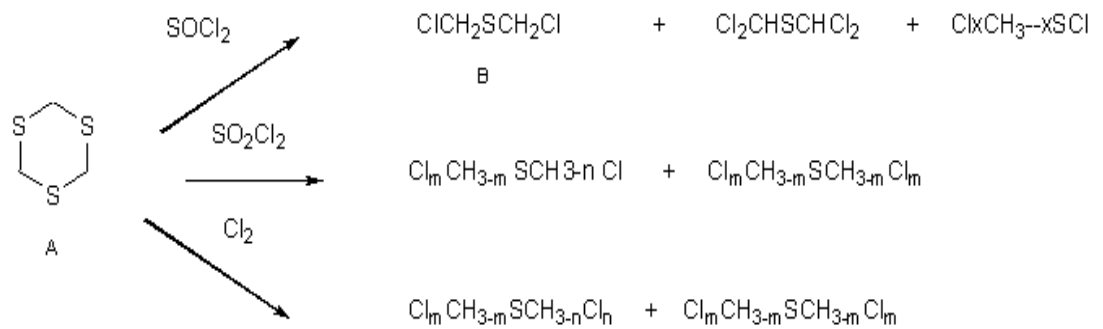
Çeşitli sentezler tanımlanmasına rağmen istenilen şekilde ve memnun edici bir etki meydana getirmemiştir[84-87]. Şekil 1.15’deki mevcut yaklaşımların tamamı dimetilsülfürün çeşitli klor ajanlarıyla sentez yapılmasıdır. Bu metodların bariz bir dezavantajı klorlama reaksiyonu süresince selektivite eksikliği ve çeşitli dereceli klorlanmış ürünleri parçalara ayırmanın zorluğudur.



**Şekil 1.15.** Dimetilsülfürün klorlanma ürünleri

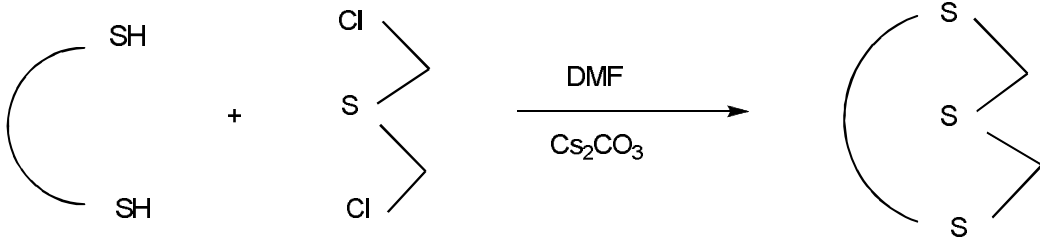
Daha iyi sonuçlar, bununla beraber tritiyoformaldehidin; tiyonil klorürle ve sülfür mono-di klorürle Şekil 1.16'deki gibi daha yüksek ürün vermek için reaksiyonu gerçekleştirilebilir. Ancak daha iyi verim  $\text{SOCl}_2$  için bir öncekinde gözlemlendi ve  $\text{SOCl}_2$  metodlar ana fraksiyonun %50'sinden fazla oluşan monoklor materyallerle birlikte izole edilenden daha yüksek klorlu ürünlerin tekrar üretilemez olarak kalmasıdır.

$\text{CCl}_4$  gibi çözücüler içinde uygulandığı zaman reaksiyon ürünü (%90) ve selektiviteyi geliştiren alüminyum klorür veya çinko bromür gibi Lewis asidinin %1 katalitik miktarını gözlemlenmiştir. Çinkobromürün halojen karışımlarında sonuç vermemiştir. Bu çalışmada lewis asidinin tiyonil klorürden klor taşıyıcısı gibi rol oynadığından şüphelenilmektedir.



**Şekil 1.16.** Tritiyon'un klorlanma ürünleri

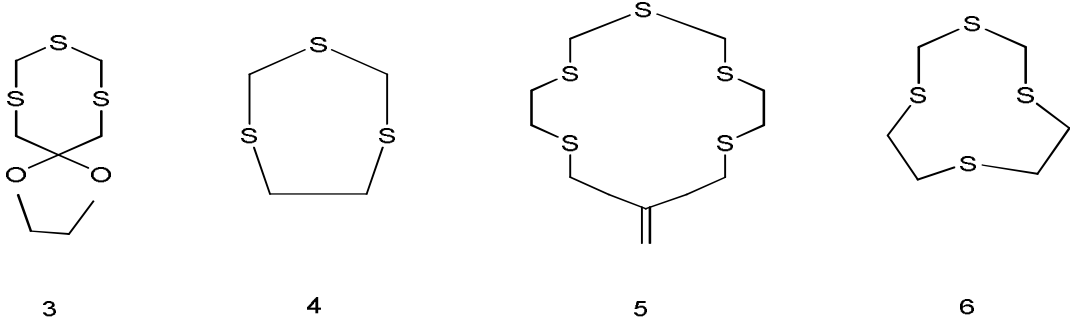
Bu gelişmiş reaksiyon değerli olabilir, çünkü 500 gr'dan daha fazla geniş skalada uygulanır. Tiyobis reaksiyonu (klorometan),B,  $\alpha,\omega$ -sezyum ditiyolatla birlikte (Şekil 1.17) heteroatomlar arasında metilenik ara halkalar içeren yeni bir çok tiyocrown eterlerin hazırlanması için iyi bir yöntem olmuştur (Şekil 1.15). Bu çalışmada 1,3,5-tritiyon ve 1,3-ditiyon içerisinde sülfür bağlarının cis şeklinde düzenlendiğini gözlemlenmiştir.



**Şekil 1.17.** Halkalaşma reaksiyonuna bir örnek

Şekil 1.18'deki 3. ve 6. bileşikler için benzer etkilerin tahmin edilmesine rağmen X-ray yapısını elde etmek henüz mümkün olmamıştır. Eğer sülfürler makrohalkanın bir yüzüne yerleştirilirse koordine metal iyon eğilimi artar. Böyle etkiler 12S3 ve 9S3 için bulunur. Biri kendilerini düzenlemek için iki karbon köprüleri tarafından ayrılmış sülfürlerin eğilimi müşahede edildi. Sentezlenen bileşiklerin fiziksel özellikleri –SCH<sub>2</sub>S- fragmenti tarafından sarf edilmiş daha yüksek sertliğini iyi yansıtabilir. 1,3,5-tritiyonun düşük çözeltisi ve kloroform, metilen klorür ve etanol gibi çözücülerde 1,3-ditiyon daha küçük bunu önerir, halbuki 1,4-ditiyonunun homologları bütün organik çözücülerde çözülebilir.

Bu gözlemlerde, Şekil 1.18'deki 4 ve 6 yaygın organik çözücülerde yetersiz çözünür, dahası 4 bileşiği 150<sup>0</sup>C üzerinde erimedenden bozunur. 3 ve 5 gibi daha geniş halka sistemleri 1,4-ditiyon gibi etileniklere benzer bileşikler kolon kromatografisi tarafından saflaştırılmasına izin veren metilen klorür ve toluende çözülebilmektedir. 4 ve 6 organik çözücülerde düşük çözünebilirliklerinden dolayı saflaştırılması zordur.



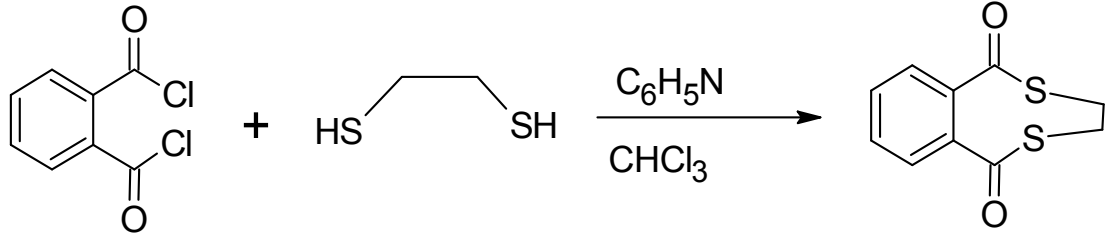
**Şekil 1.18.** Bazı tiyocrown eter bileşikleri

Özetle bu çalışmada heteroatomlar arasında metilenik ara halkalar içeren tiyocrown eterlerin hazırlanması tanımlanmıştır. Bu sülfür içeren ligand kimyasında ve onların metal iyonlara karşı davranışını ortaya koyan bir yeni araştırma konusu meydana getirmiştir[90].

#### **1.1.4. Diaçilklorür ve Tiyol Bileşiklerinin Piridin Varlığındaki Reaksiyonu (Esterleşme)**

##### **1.1.4.1. 3,4 Dihidro-2,5-benzoditiosine-1,6-diyon Eldesi**

1,2 benzendikarbonil klorür (0.29 mL, 2 mmol), piridin (0.32 mL, 4mmol) ve 1,2 etanditiyol (0.33 mL, 2mmol) karışımı refluks altında 2 saat ısıtıldı, bu esnada hiç ürün gösterimi olmadı. Karışıma 10 mL kloroform eklendi ve ısıtma 22 saat devam etti. TLC, başlangıç maddesinin ( $R_f = 0.83$ ) tamamen gözden kaybolduğunu ve ürünün ( $R_f=0.88$ ) bulunduğunu gösterdi. 33 mL su eklendi ve organik kısım ayrıldı,  $CaCl_2$  ile kurutuldu, kuru ortamda konsantre edildi. Katı beyaz kristal (0.38 g, %85) vermek üzere  $CH_2Cl_2$  ile rekristalize edildi[91].



**Şekil 1.19.** Piridin bazıyla esterleşme - halka kapama reaksiyonu

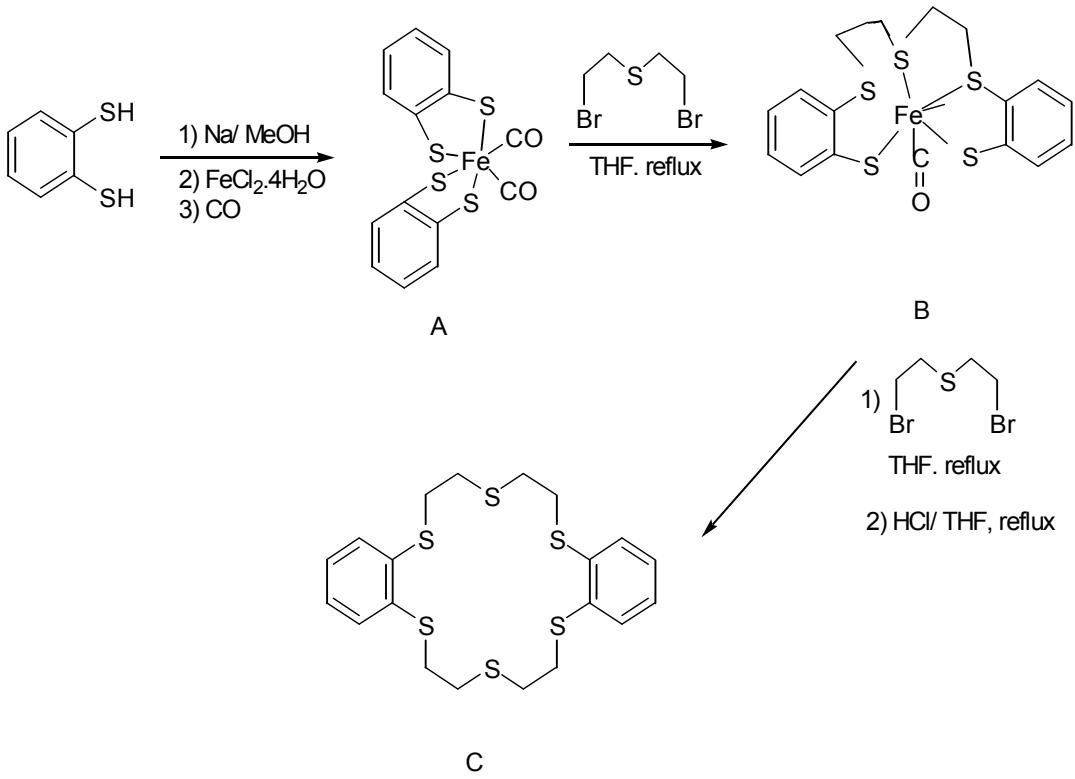
### 1.1.5. Tiyocrowner Sentezlerinde Templet Etki

Oksijen içeren crown eterler  $\alpha$ -alkoksi- $\omega$ -halojenürlerin halka kapama reaksiyonları metal iyonlarla kolayca gerçekleştirilir[92]. Metal iyon, etrafında reaktant örtüden dolayı halka kapama çevresinde onun gevşek olmasını sağlar. Konformasyondaki bu sonuçlar intramoleküler süstitüsyonun kolayca gerçekleşmesine olanak sağlar. Bu olağan dışı etki templet etki olarak bilinmektedir[93]. Oksijen içeren crown eter sentezinden çok daha az yaygın olmasına rağmen, tiyocrown sentezindeki templet etki ayrıca bilinmektedir.

1970'de nikel bisdithienin norbornadienle ve o-oksilen dibromür ile gerçekleşen iki basamaklı halkalaşma reaksiyonu Schrauzer ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır[94]. Bununla beraber hiçbir ürün bu reaksiyon için rapor edilmemiştir. 1984'de Selmann ve Zapf 1,4,7-tritiosiklononanın sentezindeki templet etkiyi rapor etmişlerdir[56]. Bu mezohalkalı tiyocrown eter 1,2-dibromoetanın kompleks 1,4,7-tritanyononan ve  $[\text{Mo}(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})_3]$  ile reaksiyonu tarafından %60 verimle ürün meydana getirmişlerdir.

Bu Mo-templet etki [1+1] formunun oluşmasına sebep olmuştur. Bu metot kullanılmak suretiyle birkaç süstitüe 9S3 türevleri sentezlenmiştir[95]. Birkaç yıl geçtikten sonra Selmann ve Frank, Fe(II) templet etki ile halkalaşma reaksiyonlarını yayımladılar. Bu reaksiyon 1,2-dimerkaptobenzen ve bis(beta-bromo-etil)sülfür arasında meydana gelen [2+2] şeklinde sonuçlanmıştır[96]. İlk basamakta 1,2-dimerkaptobenzenin  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ve CO ile reaksiyonunu meydana getirmişlerdir ve

sonuç olarak Şekil 1.20'deki A molekülünü kararlı bir katı olarak elde etmeyi başarmışlardır[97]. Şekil 1.20'deki B molekülü izole edildi ve daha sonra diğer eşdeğer miktarda bis(beta-bromo-etil)sülfürle alkilendi. Hidrolizden sonra C molekülü %35 verimle elde edilmiştir. Bu yöntemle Şekil 1.20'deki C molekülü sadece iki basamakta makul bir şekilde meydana gelmiştir. Bu [2+2] siklo katılmanın ek olarak avantajı ara ürün olan Şekil 1.20'deki B molekülü izole edilebilir. Böylece iki farklı dibromür fragmentleri tiyocrown eter halkada [2+1+1] olmasını mümkün kılmıştır.



**Şekil 1.20.** 1,2-dimerkaptobenzen'in reaksiyonundan elde edilen dibenzo-18-tiyocrown-6

Bu tip templet etki içeren sentezlerde metalin doğası ürünün meydana gelmesinde önemli rol oynar. Şekil 1.20'deki B molekülünün rutenyum analogları bis(beta-bromoetil)-sülfürle bir 9 üyeli Ru-kompleks halka tritiyobenzo[9]crown-3 (Bzo-9S3, reaksiyon verdiği zaman 18 üyeli [2+2] homolog yerine [1+1] elde edilmiştir[19]. Fe ve Ru kompleksleri arasındaki reaktivite farkının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır.

Templet etkiler [2+2] tarzı tiyocrown eter sentezinde etkili araç olabilirler. Bununla beraber genel olarak hiçbir templet sentezlerin uygulanabilirliği seçiçi olarak [2+2] halkalaşma bilinmemektedir.



## 1.2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ

### 1.2.1. Fizyolojik Önemi

Karbonik Anhidraz (CA) enzimi genel olarak metabolik CO<sub>2</sub> transportu işlevinin yanı sıra, birçok dokuda H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzimine rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır [98-101].

Yeşil bitkiler, fotosentetik hücre kloroplastları vasıtasıyla, gün ışığı varlığında fotosentez yapabilmek için atmosferden CO<sub>2</sub> kullanılır. Gaz halindeki CO<sub>2</sub>, bitkinin yapraklarında HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonları halinde taşınır. Hem kara hem de su bitkilerindeki CA enzimi, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarının tekrar CO<sub>2</sub>'e dönüşmesini sağlar [102].

CA enziminin, hidrataz aktivitesi ile son derece önemli bir fizyolojik fonksiyonu yerine getirdiği görülmektedir. Ayrıca bazı ester bağlarını parçalaması ve aldehitlerin hidratasyonunu da katalizlemesi, bu enzimin endüstriyel organik sentezlerde kullanımını gündeme getirmiştir. Bu nedenle, CA enziminin saflaştırılmasında daha etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmalar yapılmaktadır [103].

### 1.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş 14 farklı CA izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre belirlenmiştir. Bu dokuların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yolla çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO<sub>2</sub> ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO<sub>2</sub> /HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transportu gibi fizyolojik olaylarda rol almalarının yanı sıra, patolojik ve fizyolojik işlem ve olaylarda da rol aldıkları açıklanmıştır [52-53]. Temel olarak bu izoenzimler, sitozolik formda (CA-I,CA-II,CA-VII) ve membrana bağlı (CA-IV), (CA-XII), (CA-XIV) olarak bulunmuştur. CA-VI bir salgı enzimi ve CA-V izoenziminin ise bir mitokondrial enzim olduğu tespit edilmiştir [98,101,106,107].

Eritrosit CA' sının en önemli fonksiyonu, doku kılcallarında metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>' a akciğer pulmoner kapilerde ise H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ın CO<sub>2</sub>'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyip, solunum olayında yer almasıdır. Böbrek tübüllerinde ise aynı reaksiyonlarla Na<sup>+</sup> ve H<sub>2</sub>O geri emilimini sağlamak için ya CO<sub>2</sub> transferini ya da H<sup>+</sup> iyonu birikimini sağlar. Bu dönüşüm reaksiyonları, omurgalıların kan ve hücreler arası sıvılardaki en önemli tampon sisteminin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> tampon sistemi olması nedeniyle çok önemlidir [102,107,109].

CA-III izoenzimi, iskelet kaslarında oluşan laktik asit/laklat dengesinde, pH değerini ayarlamak gibi çok önemli bir göreve sahiptir. CA-V izoenzimi bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoilfosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlanmasından dolayı, glukoneogenez ve urogenizde rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipogenaz olayında da etkili olduğu belirtilmiştir [110].

**Çizelge 1.1.** Karbonik anhidraz izoenzimleri [113]

İZOENZİM	KATALİK AKTİVİTE	BULUNDUĞU BÖLGE
CA I	Düşük	Sitozol
CA II	Yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı
CA V	Orta yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Tükürükte gizli
CA VII	Yüksek	Sitozol
CA-RP VIII	Akatalitik	Muhtemelen sitozolik
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı
CA-RP X	Akatalitik	Bilinmiyor
CA-RP XI	Akatalitik	Membrana bağlı
CA XII	Düşük	Membrana bağlı
CA XIII	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı

**1.2.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi**

CA enzimi proton ve bikarbonat iyonlarını üretip, pH değerinin düzenlenmesinde ve vücudumuzun farklı bölgelerindeki akışkan dengesinin kurulmasında anahtar rol oynar. Midemiz asit salgılanmasında rol alırken, aynı enzim pankreatik alkalın özsuyu ve doğal tükürüğün üretilmesine yardımcı olur. Böbrek ve gözlerde üretilen bikarbonat iyonları ve protonların taşınması, bu bölgelerdeki hücrelerin su içeriğini etkiler. Bu yüzden CA izoenzimleri kendi spesifik bölgelerinde farklı fonksiyonlar gösterir ve yoklukları ve inaktiflik durumları, midedeki asit üretiminin azalmasından böbreklerin kaybına kadar uzanan hastalık durumları oluşturabilir[100,103,109,114].

hCA-II izoenzimi ile ilgili olarak, CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da hCA-II izoenziminin kemik dokusu, böbrek ve beyin organları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır [105,106,116,117].

Kanser, hücre değişiminin ve çoğalmasının kontrolden çıkması ile gelişen bir hastalıktır. Çoğu kanser hücre tipleri kitlelere neden olur ve buna tümör ismi verilir. CA-IX ve CA-XII izoenzimleri tümörlü hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserlerle ilişkili olan izoenzimler olarak tespit edilmişlerdir [118,119].

#### **1.2.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar**

CA, CO<sub>2</sub> molekülünün hidrasyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik asite ve siyanamide, aldehitin geminal diol hidrasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik asit, sülfonik asit ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze nükleofilik atakları içeren aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidrasyonu, piruvik asit, sülfonik asit ve fosforik asit esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonları da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [120-122].

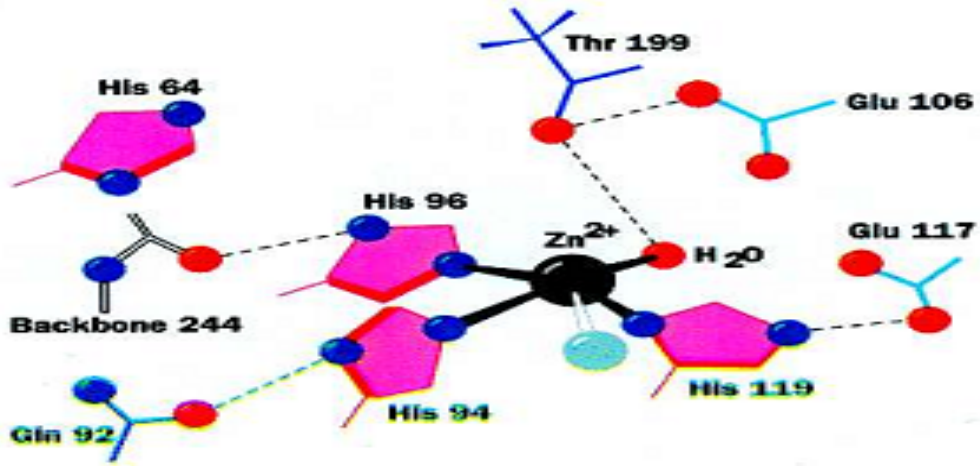
**Çizelge 1.2.** Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar [113]

(1)	$O=C=O + \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3^- + ArOH$
(7)	$ArOPO + H_3^{2-} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{2-} + ArOH$
(8)	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH (Ar=2,4 \text{ Dinitrofenil})$
(9)	$PhCH_2OCOCI + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl (R=\text{Metil, fenil})$

### 2.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

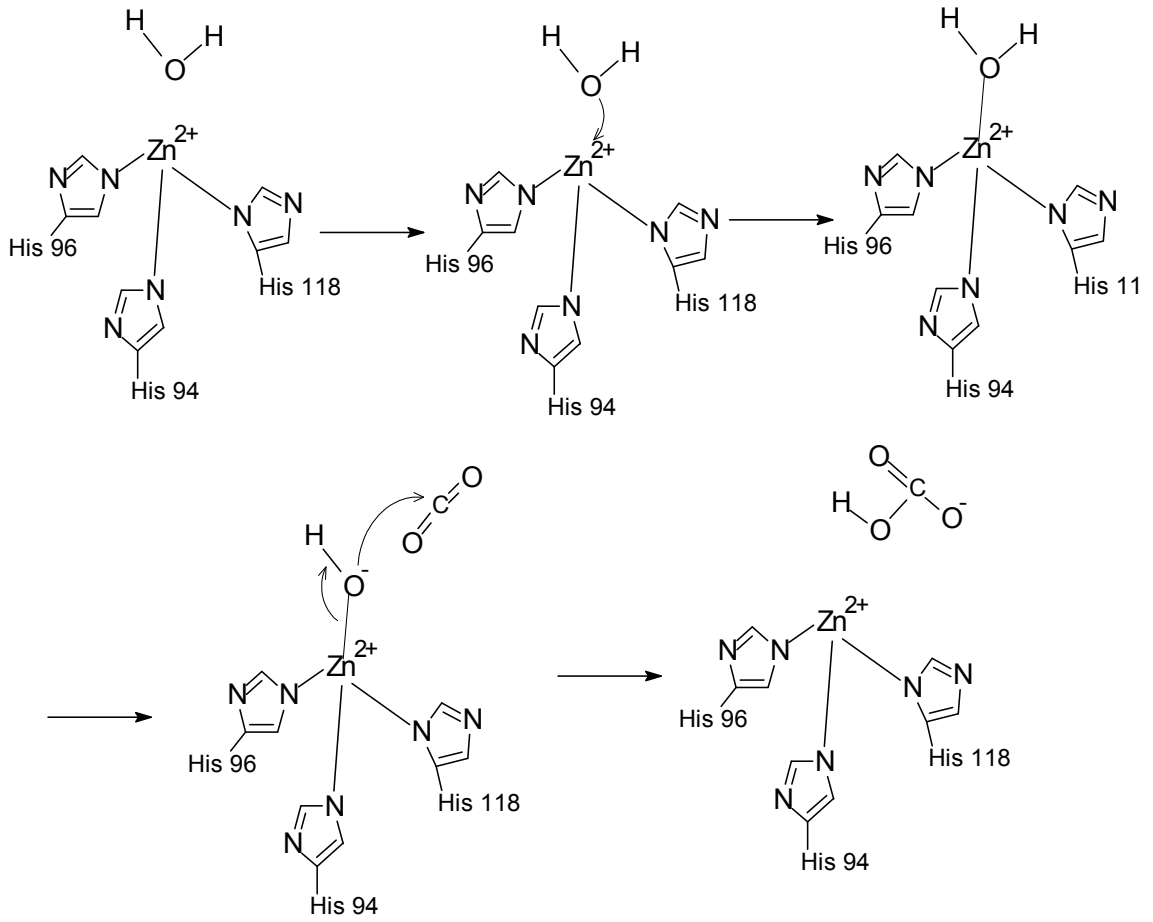
Yıllarca CA enziminin katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi ve çözelti ortamında kararlı olması gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. Aktif bölgenin yanındaki amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir.

CA enziminin reaksiyonları katalizinde  $Zn^{+2}$  iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-Ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir  $H_2O$  veya  $OH^-$  iyonu ve uç histidin rezidüsü (His-94, His-96, His-119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki  $15 \text{ \AA}$  derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu göstermektedir [123].



**Şekil 1.21.** CA Enziminin Aktif Bölgesi ( Büyük küre Zn<sup>2+</sup> iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir) [123].

Zn<sup>+</sup> bağlı H<sub>2</sub>O, Glu-106 rezidüsünün karboksilat grubuna sırayla köprü oluşturan Thr-109 rezidüsünün hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır. Bu etkileşimler, Zn<sup>+</sup> bağlı H<sub>2</sub>O molekülünün nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun bir yerdeki CO<sub>2</sub> molekülüne doğru hareket etmektedir [46-50].



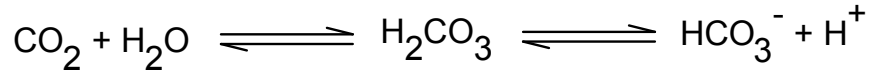
**Şekil 1.22.** CA enziminin CO<sub>2</sub> hidrasyon reaksiyonunu katalizlediği mekanizma [102]

Aktif bölgedeki Zn<sup>+2</sup> iyonuna, hidroksil grubunun bağlanmasıyla, enzimin aktif durumda bulunan bir formu meydana gelir. Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO<sub>2</sub> molekülüne saldırır. Bu reaksiyon sonucunda Zn<sup>+2</sup> iyonuna bağlı durumda HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonu oluşur. Daha sonra, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda, Zn<sup>+2</sup> iyonuna H<sub>2</sub>O molekülü bağlanır ve bu da enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar ( Şekil 1.22) [122,125].

## 1.2.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

### 1.2.6.1. CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi

CA enziminin hidrataz aktivitesi, enzimin CO<sub>2</sub> molekülünün hidrasyonundan, HCO<sub>3</sub> iyonunun dehidratasyonundan ve bazı esterlerin hidrolizinden sorumlu olma özelliğinden yararlanılarak belirlenmektedir.



Yukarıdaki reaksiyonda da görüldüğü üzere, ortamda ilk olarak CO<sub>2</sub> gazı açığa çıkmakta veya harcamakta, diğer taraftan da H<sup>+</sup> konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. İlk durum kantitatif olarak mamomerik yöntemlerle tespit edilebilse de reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözünmesi gibi nedenlerden dolayı bu yöntem geçerli olmamaktadır.

Ortamdaki H<sup>+</sup> konsantrasyonunun artması veya azalması reaksiyon pH'sını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatorele belirlenebilir. Enzim saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri genellikle Wilbur-Anderson yöntemi ile yapılır. Bu yöntemde göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre, brom-timol mavisi indikatore yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO<sub>2</sub> hidrasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süreleri (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın (t<sub>c</sub>)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Buna göre;

$$\text{Enzim Aktivitesi} = [(t_0) - (t_c)] / (t_c)$$

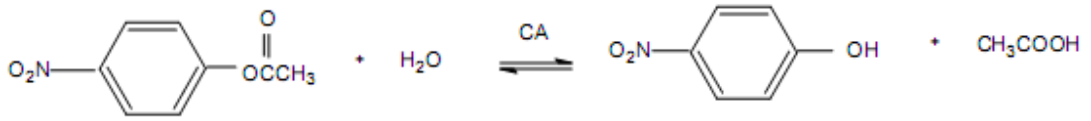
$$\text{Spesifik aktivite} = [10(t_0 - t_c) / (t_c)] / \text{mg Protein}$$

formüllerinden hesaplanabilir[74].



### 1.2.6.2. Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle belirlenmektedir. Bu yöntemde CA enzimi, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitrofenol ve p-nitrofenolata hidroliz eder ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon göstermektedir. Reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir.



348 nm dalga boyu p-nitrofenol ve p-nitrofenolatın aynı absorpsiyon verdiği noktadır (izobestlik). Asidik özellik gösteren fenol grupları ortamın pH değerine göre değişen oranda fenolat ve H<sup>+</sup> iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun absorpsiyonları aynı anda okunabildiği için, bu durum absorpsiyon ölçümlerini etkilemez. p-nitrofenolün molar ekstrikasyon katsayısı,  $\epsilon_{348} = 5.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın molar ekstrikasyon katsayısı,  $\epsilon_{348} = 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ve çok az bir absorpsiyon vardır [102].

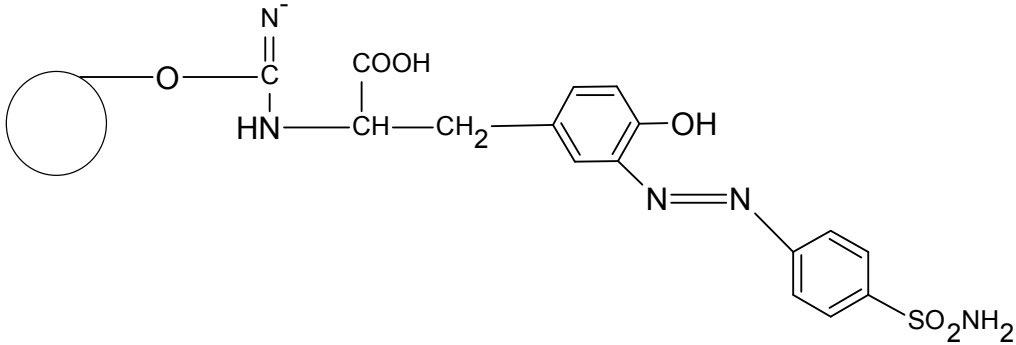
### 1.2.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinitive Kromatografisi İle Saflaştırılması

CA enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan yöntem afinitive kromatografisidir. Bu yöntemle hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek verimle saflaştırılarak elde edilmektedir [127]. CA enziminin afinitive kromatografisi ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tekniğe yönelik çalışmalar 1974 yılında Whitney, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşları, aynı yıl Osborne ve Tashian, 1976 yılında Chanpagnol ve aynı yılı takiben Johansen, 1977 yılında Khalifah ve arkadaşları, 1980 yılında Wistrand ve aynı yılda Keha'nın araştırmalarını takiben 1987 yılında Kaul ve Mattiasson, 1995 yılında Arslan ve arkadaşları, 2000 yılında ise Demir ve arkadaşlarının araştırmaları ile devam etmiştir.

[103,122,127]. Chanpagnol dışında diğer araştırmacılar ligand olarak benzen sulfonamid türevleri, Chanpagnol ise bir heteroaromatik sulfonamid bileşiği olan asetozolamidi kullanmıştır. Bitki CA enzimi dışında ligand olarak benzen sülfonamid türevleri kullanılmıştır. Bunu nedeni, bitki CA enziminin benzen sulfonamidler tarafından çok az inhibe edilmesiyle açıklanmaktadır. Bu olayı uzantı koluna sahip afinite jellerinin yüksek bir kapasiteye sahip oldukları ile açıklanmaktadır. Ayrıca matrikse takılan uzantı kollarının farklılığı da kolon verimi üzerindeki değişik sonuçları beraberinde getirmektedir [102].

### 1.2.8. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose - 4B' nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktiveştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan jelde aynı yöntem kullanılarak Sepharose-4B afinite jelinin CNBr ile aktiveştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozin'e kenetlendirildi. Burada afinite jelinin uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid CA enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır [128].



şekil 1.23. Sepharose-4B-L-Tirozin-p-Amino-Benzosülfonamid [128]

## 2. MATERYEL VE YÖNTEM

### 2.1. MATERYAL

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda sentezlenen tiyocrown eterler; 7,8,10,11,13,14,23,24,26,27,29,30 - dodekahidrodibenzo [i,w] [1,4,15,18,7,12,21,26] tetraoksatetratyosiklooctakosin - 5,16,21,32-tetron **(1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) (A1)**, 6,9,22,25-tetraoksa - 3,12,19,28-tetratyotrisiklo [28.2.2.2<sup>14,17</sup>] heksatyokonta-1(32),14,16,30,33,35-hekzan-2,13,18,29-tetron **(1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) (A2)**, 6,9,23,26-tetraoksa-3,12,20,29-tetratyotrisiklo[29.3.1.1<sup>14,18</sup>]heksatyokonta-1(35),14(36),15,17,31,33-hekzan 2,13,19,30-tetron **(1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) (A3)**, 7,8,10,11,20,21,23,24 - oktahidrodibenzo [f,q] [1,12,4,9,15,20] dioksatetratyosiklodokosin - 5,13,18,26-tetron **(1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) (A4)**, 6,19-dioksa-3,9,16,22 - tetratyotrisiklo [22.2.2.2<sup>11,14</sup>] tiyokonta - 1(26),11,13,24,27,29 - hekseen - 2,10,15,23-tetron **(1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) (A5)** ve 6,20-dioksa-3,9,17,23 - tetratyotrisiklo [23.3.1.1<sup>11,15</sup>] tiyokonta-1(29),11(30),12,14,25,27 - heksan - 2,10,16,2 -tetron **(1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) (A6)** bileşikleridir. Bu altı tiyocrown eterin sentezinde kullanılan reaktifler, ftaloil diklorürler ve trietilenglikolditiyol - dietilenglikolditiyol bileşikleri ticari olarak elde edildi. Çalışmalarda kullanılmadan önce kloroform (Merck) ve piridin (Merk) için uygun saflaştırma ve kurutma metotları uygulandı.

CA enziminin insan kanından saflaştırılması ve aktivasyon ölçümleri için kullanılan Sepharose 4-B afinite jeli, fenol kırmızısı boyar maddesi, Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum karbonat, trihidroksimetil aminometan(Tris), sodyum sitrat dihidrat, sitrikasit, sodyumklorür, sodyumsülfat, sodyum perklorat,

sodyumasetat, hidroklorik asit, Merck A.G'den; sodyum monohidrojen fosfat, sodyumdihidrojen fosfat, metanol, etanol, amonyum persulfat Riel de Haen A.G' den; CO<sub>2</sub> gazı piyasadan sağlanmıştır.

### 2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Tiyocrown eterlerin sentezinde kullanılan alet ve cihazlar aşağıda isimlendirilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

<b>Elektronik Terazı</b>	: Shimadzu Libror AEG-220, tartım kapasitesi 220g,
<b>Manyetik Karıştırıcı</b>	: IKAMAG RH 20.. 2000 devir/dakika hızlı
<b>FT Infrared Spektrofotometresi</b>	: Perkin Elmer Spektrum 100 FT-IR Spektrofotometresi – ATR dedektör
<b>Erime Noktası tayin cihazı</b>	: Elektrotermal 9200
<b>Evaporatör</b>	: Büchi Ratavapor R-114
<b>NMR</b>	: VARIAN 400 MHz ( BOÜ)

Karbonik anhidraz enzimiyle ilgili çalışmamada kullanılan alet ve cihazlar

<b>Buz Makinesi</b>	: Fiocetti Scotsman otomatik buz makinesi
<b>Çalkalayıcı</b>	: Biolab1575'2Bçalkalayıcı
<b>Kromatografi Kolonu</b>	: Pharmacia
<b>Kronometre</b>	: Hanhard Elektronisch Digital Stoppuhr
<b>Magnetik Karıştırıcı Isıtıcı</b>	: ARE Magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
<b>Masa Santrifüjü</b>	: Hettich Zentrifugen EBA12R
<b>OtomatikPipetler</b>	: Eppendorf, Medisis
<b>Peristaltik Pompa</b>	: Pharmacia(ChromatographAttd.S1211)
<b>pH metre</b>	: Orion model 920A

### 2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılmak üzere aşağıda isimlendirilmiş çözeltiler hazırlanmıştır.

**1. Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Yıkama Tamponu;** 0.2 M NaHCO<sub>3</sub> (pH=8.8) 16.8 g (0.02mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL saf suda çözülür. 1M NaOH ile pH=8.8'e ayarlanarak toplam hacmi 1L'ye tamamlanır.

**2. Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Saklama Tamponu;** 0,1M NaHCO<sub>3</sub> (pH=10.0) 8.4 g (0.01 mol) NaHCO<sub>3</sub> 950 mL saf suda çözülür. 1 M NaOH ile pH=10'a ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

**3. Afinite Jeli Dengeleme Tamponu;** 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH=8.7) 14.20g (22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 3.0275g (25 mmol) tris-HCl 950mL saf suda çözülür. 1M HCl ile pH=8.7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

**4. (Hemolizat Tatbikinden Sonra) Afinite Jeli Yıkama Tamponu;** 25mM Tris HCl / 22mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH = 8.7) 3.124 g (22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve 3.0275g (25 mmol) tris-HCl 950 mL saf suda çözülür. 1M HCl ile pH=8.7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

**5. hCA Elüsyon Tamponu;** hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 1M NaCl / 22mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=6.3) 3.55g(25mmol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 29.25g (0.5mol) NaCl alınıp, pH6.3'e getirildikten sonra toplam hacim 500mL'ye saf su ile tamamlandı. hCA-II için ise; 0.1M CH<sub>3</sub>COONa / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH 5.6), 15.31g (0.075 mol) NaClO<sub>4</sub> ve 3.4g (0.2 mol) CH<sub>3</sub>COONa 200 mL saf su içinde çözüldü. 1 N HCl ile pH' sı 5.6'ya getirildikten sonra, toplam hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

**6. CO<sub>2</sub> – Hidrataz Aktivite Tamponu;** 0.15M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0.10 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 10.0)  
15.9 g (0.15 mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 8.4 g (0.1 mol) NaHCO<sub>3</sub> 1L saf suda çözümlenerek çözelti hazırlandı.

**7. CO<sub>2</sub> - Hidrataz Aktivitesi Tamponu;** 0.01256 g fenol kırmızısı ve 0.2184 g NaHCO<sub>3</sub> 1 L saf suda çözümlenerek hazırlanır.

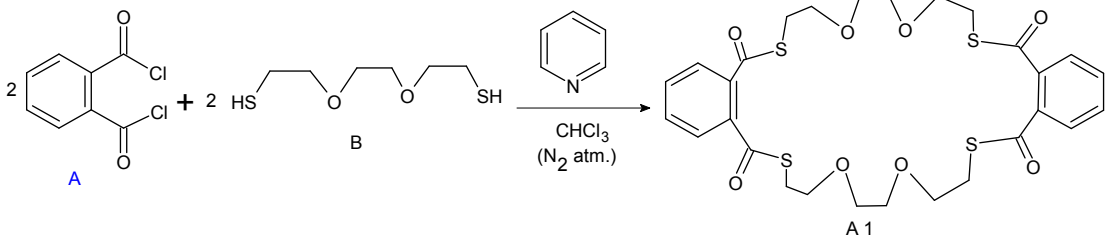
**8. CO<sub>2</sub> – Hidrataz Aktivitesi CO<sub>2</sub> çözeltisi;** 0°C’de yarım saat süreyle saf su içerisinde CO<sub>2</sub> geçirilerek hazırlandı.

## 2.2. YÖNTEMLER

### 2.2.1. Tiyocrown Eter Bileşiklerinin Sentezi

#### 2.2.1.1. 1,2-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-28-Crown-8'in Sentezi (A1)

10 mmol (2.0302 g) *o*-ftaloildiklorür (A), 10 mmol (1.823 g, 1.63 ml) trietilenglikolditiyol (B) ve 20 mmol (1.5 ml) piridin kloroform varlığında 250 ml' lik reaksiyon balonuna alınarak, azot atmosferinde 24 saat refluks edildi. Daha sonra karışı evapore edildi ve balonda kalan katı ürün kolon kromatografisi ile silikajel kolonda n-hegzan-kloroform (1:10); (v/v) çözücü sisteminde saflaştırıldı, 1.528 gr beyaz katı madde elde edildi. (E.N: 85-86 °C, Verim: %48)

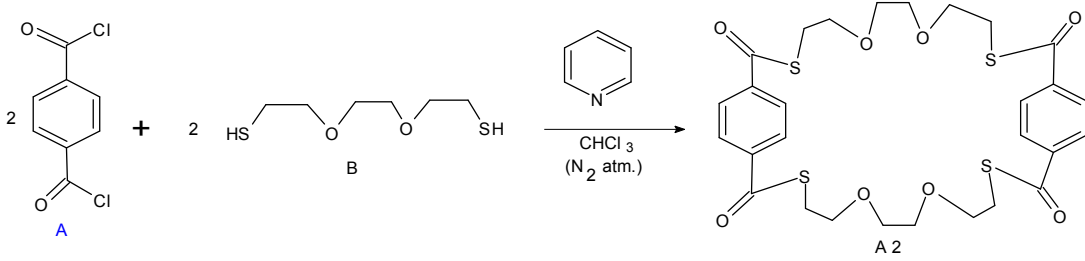


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.62 ppm (2H, t, C-S-C=O), 3.6 ppm (2H, s, C-O-C) 4.25 ppm (4H, t, -C-C-S-C=O), 8.0 (H, d, *o*-benzo), 8.9 (H, d, *p*-benzo)

**FT-IR** ( $\gamma \text{ cm}^{-1}$ ): 680 (C-S-C gerilmesi), 1719 (O=C-S), 1635 (aromatik C=C), 2171 (benzen 1,2 di sübstitüe)

### 2.2.1.2. 1,4-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-32-Crown-8'in Sentezi (A2)

10 mmol (2.0302 g) *p*-ftaloildiklorür (A), 10 mmol (1.823 g, 1.63 ml) trietilenglikolditiyol (B) ve 20 mmol (1,5 ml) piridin kloroform varlığında 250 ml' lik reaksiyon balonuna alınarak, azot atmosferinde 24 saat refluks edildi. Daha sonra karışım evaporatedi ve balonda kalan katı ürün kolon kromatografisiyle silikajel n-hegzan-kloroform (1:10); (v/v) çözücü sisteminde saflaştırıldı, 2.456 gr beyaz katı madde elde edildi. (E.N: 77-78 °C, Verim: %78)



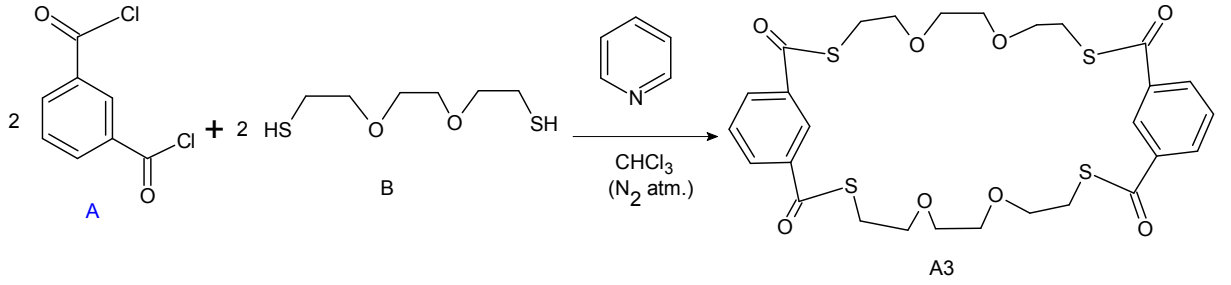
<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.45 ppm ( 2H, t, C-S-C=O), 3,20 ppm (4H, t, -C-C-S-C=O), 3.50 ppm (2H, s, C-O-C) 7.80 (H, s, benzen)

FT-IR (γ cm<sup>-1</sup>): 680 (C-S-C) gerilmesi, 1716 (O=C-S), 1634 (aromatik C-C), 2127 (benzen 1,4 di süstitüe)

### 2.2.1.3. 1,3-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-30-Crown-8'in Sentezi (A3)

10 mmol (2.0302 g) *m*-ftaloildiklorür (A), 10 mmol (1.823 g, 1.63 ml) trietilenglikolditiyol (B) ve 20 mmol (1.5 ml) piridin kloroform varlığında 250 ml' lik reaksiyon balonuna alınarak, azot atmosferinde 24 saat refluks edildi. Daha sonra karışı evaporatedi ve balonda kalan katı ürün kolon kromatografisiyle silikajel n-hegzan-kloroform (1:10); (v/v) çözücü sisteminde saflaştırıldı, 2.15 gr beyaz katı madde elde edildi. (E.N: 80-81 °C, Verim: %68)



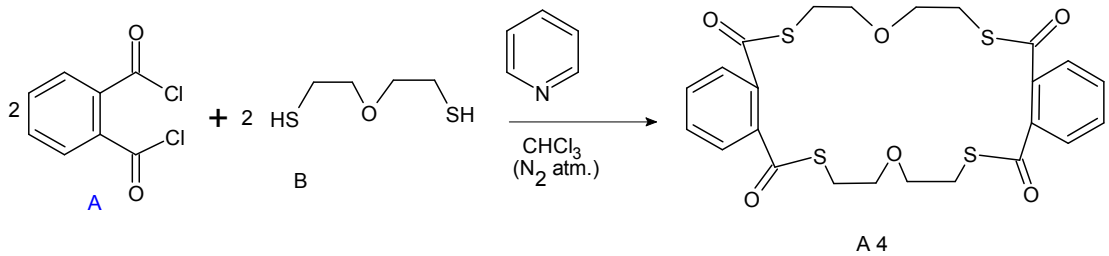


**$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  2.42 ppm (2H, t, C-S-C=O), 3.4 ppm (2H, s, C-O-C) 4.1 ppm (4H, t, -C-C-S-C=O), 7.25 (H, s, o-benzo), 8 (H, d, p-benzo) 8.9 (H, d, p-benzo)

**FT-IR ( $\gamma \text{ cm}^{-1}$ ):** 680 (C-S-C gerilmesi), 1722 (O=C-S), 1635 (aromatik C-C), 2168 (benzen 1,3 di sübstitüe)

#### 2.2.1.4. 1,2-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-22-Crown-6' nın Sentezi (A4)

10 mmol (2.0302 g) *o*-ftaloildiklorür (A), 10 mmol (1.3825 g, 1,24 ml) dietilenglikolditiyol (B) ve 20 mmol (1.5 ml) piridin kloroform varlığında 250 ml' lik reaksiyon balonuna alınarak, azot atmosferinde 24 saat refluks edildi. Daha sonra karışı evaporeedi ve balonda kalan katı ürün kolon kromatografisiyle silikajel n-hegzan-kloroform (1:10); (v/v) çözücü sisteminde saflaştırıldı ve 1.12 gr beyaz katı madde elde edildi. (E.N: 75-76  $^0\text{C}$ , Verim: %44)

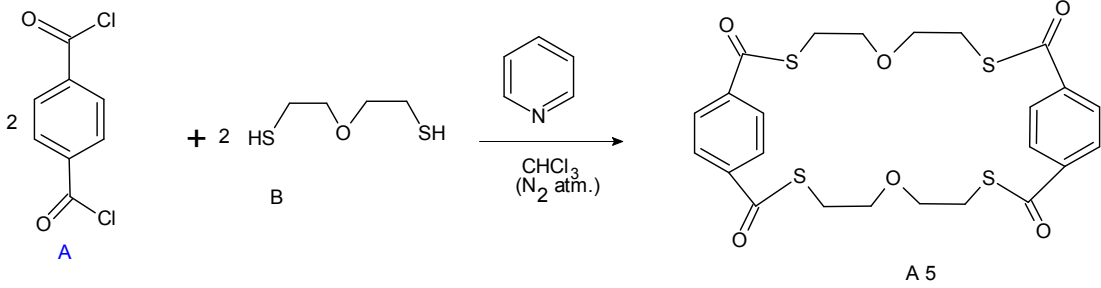


**$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  3.45 ppm (2H, t, C-S-C=O), 4.20 ppm (2H, s, C-O-C), 7.40 (H, d, o-benzo), 7.60 (H, d, p-benzo)

**FT-IR ( $\gamma \text{ cm}^{-1}$ ):** 680 (C-S-C gerilmesi), 1715 (O=C-S), 1635 (aromatik C-C), 2172 benzen 1,2 di sübstitüe

### 2.2.1.5. 1,4-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-26-Crown-6'nın Sentezi (A5)

10 mmol (2.0302 g) *p*-ftaloildiklorür (A), 10 mmol (1.3825 g, 1.24 ml) dietilenglikolditiyol (B) ve 20 mmol (1.5 ml) piridin kloroform varlığında 250 ml' lik reaksiyon balonuna alınarak, azot atmosferinde 24 saat refluks edildi. Daha sonra karışı evaporeedi ve balonda kalan katı ürün kolon kromatografisiyle silikajel n-hegzan-kloroform (1:10); (v/v) çözücü sisteminde saflaştırıldı ve 1.36 gr beyaz katı madde elde edildi. (E.N: 68-69 °C, Verim: %52)

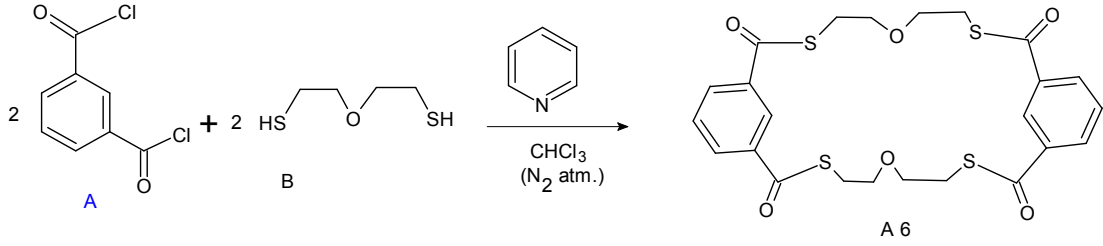


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.35 ppm (2H, t, C-S-C=O), 4.20 ppm (2H, s, C-O-C), 7.80 (H, s, benzen)

FT-IR ( $\gamma \text{ cm}^{-1}$ ): 680 (C-S-C gerilmesi), 1720 (O=C-S), 1635 (aromatik C-C), 2173 (benzen 1,4 di süstitüe)

### 2.2.1.6. 1,3-Dibenzo-tetratiyo-tetrakarbonil-24-Crown-6'nın Sentezi (A6)

10 mmol (2.0302 g) *m*-ftaloildiklorür (A), 10 mmol (1.3825 g, 1.24 ml) dietilenglikolditiyol (B) ve 20 mmol (1.5 ml) piridin kloroform varlığında 250 ml' lik reaksiyon balonuna alınarak, azot atmosferinde 24 saat refluks edildi. Daha sonra karışı evaporeedi ve balonda kalan katı ürün kolon kromatografisiyle silikajel n-hegzan-kloroform (1:10); (v/v) çözücü sisteminde saflaştırıldı ve 1.15 gr beyaz katı madde elde edildi. (E.N: 75-76 °C, Verim: %46)



**<sup>1</sup>H NMR(400 MHZ, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  3.80 ppm ( 2H, t, C-S-C=O), 4.10 ppm (2H, s, C-O-C), 7.25 (H, s, o-benzo), 7.80 (H, d, p-benzo) 8.30 (H, d, p-benzo)

**FT-IR ( $\gamma$  cm<sup>-1</sup>):** 680 (C-S-C gerilmesi), 1720 (O=C-S), 1634 (aromatik C-C), 2056 (benzen 1,3 di süstitüe)

## 2.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCAI ve hCAII ) Saflaştırılması

### 2.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması

Deneyler için antikoagulantlı tüplere sağlıklı insanlardan yaklaşık 20 mL kan alınmış ve kanlar hemen çalışılmıştır. İnsan kanı, eritrositlerin ayrılması amacıyla 15 dakika boyunca 15000 rpm'de +4<sup>0</sup>C sıcaklıkta santrifuj edildi. Serum ve eritrosit tabakaları ayrıldı. Altta kalan eritrositler % 0.9'luk NaCl çözeltisi ile 2 defa yıkayıp üstte kalan kısımlar atıldı. Bu işlemler sonucunda yaklaşık 5 mL eritrosit elde edildi. Elde edilen eritrositler, kendi hacimlerinin 1.5 katı soğuk saf su ile karıştırıldı ve hemoliz olayının tamamlanması için 0<sup>0</sup>C sıcaklıkta karıştırıldı. Elde edilen hemolizat, hücre zarlarının ayrılması için 4<sup>0</sup>C sıcaklıkta 15000 rpm'de santrifuj edildi. İşlem sonrasında tüplerdeki süpernatant alınarak dibe çökmüş olan hücre zarları atıldı. Hemolizatın pH değeri, afinite kolonuna tatbik edilebilmesi için, katı Tris-baz ile pH'ı 8.7 değerine ayarlandı.

### 2.2.2.2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enziminin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1.8×12 cm boyutundaki bir kolona paketlenerek 25 mM Tris-HCl / 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH=7.0) tampon çözeltisi ile dengelendi. Hemolizat kolona tatbik edildikten sonra yıkama tamponu (25 mM Tris-HCl/22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (pH=7.0) ile yıkandı. Böylece CA enziminin büyük bir kısmı kolona tutunmuş ve istenmeyen safsızlıklar ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5.6), 1 M NaCl / 22 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=6.3), hCA-II için ise 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 1.5 ml'lik Etüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 20 mL /saat olarak ayarlanmıştır. Her bir elüat için, UV-görünür' de 280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini ve CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi tayini literatüre uygun biçimde yapıldı [112].

### 2.2.2.3. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini (CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi)

CA enziminin aktivite ölçümleri esnasında Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntem kullanıldı. Bu yöntem, CO<sub>2</sub>'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> sebebiyle pH değerinin 10.0'dan 7.4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Burada indikatör olarak, pH=7.4'de renk değiştiren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH değeri 10.0 olan CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> tamponundan yararlanıldı.

Deney prosedürü şu şekilde gerçekleştirildi; reaksiyon tüpüne önce 2 mL indikatör ve 1.3 mL doymuş CO<sub>2</sub> çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, saflaştırılan enzimden 0.05 mL ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0.4 mL tampon katılarak kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t<sub>c</sub>). Aynı işlemler, her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0.05 ml saf su konularak yapıldı (t<sub>0</sub>). Bu yöntemle göre, karbonik anhidraz (CA) aktivitesi için bir

enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$EU = (t_0 - t_c) / t_c$$

formülüne göre enzim ünitesi hesaplandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sentezlenen Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR ve FT-IR Spektrumları

Aşağıda ismi verilen bileşikler sentez ve saflaştırma (kolon kromatografisi) işlemlerinden sonra <sup>1</sup>H NMR ve FT-IR spektrumları alınmıştır.

**A1** 7,8,10,11,13,14,23,24,26,27,29,30 - dodecahydrodibenzo [i,w] [1,4,15,18,7,12,21,26] tetraoxatetrathiacyclooctacosine - 5,16,21,32-tetrone **(1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8)**

**A2** 6,9,22,25-tetraoxa - 3,12,19,28-tetrathiatricyclo [28.2.2.2<sup>14,17</sup>] hexatriaconta-1(32),14,16,30,33,35-hexaene-2,13,18,29-tetrone **(1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8)**

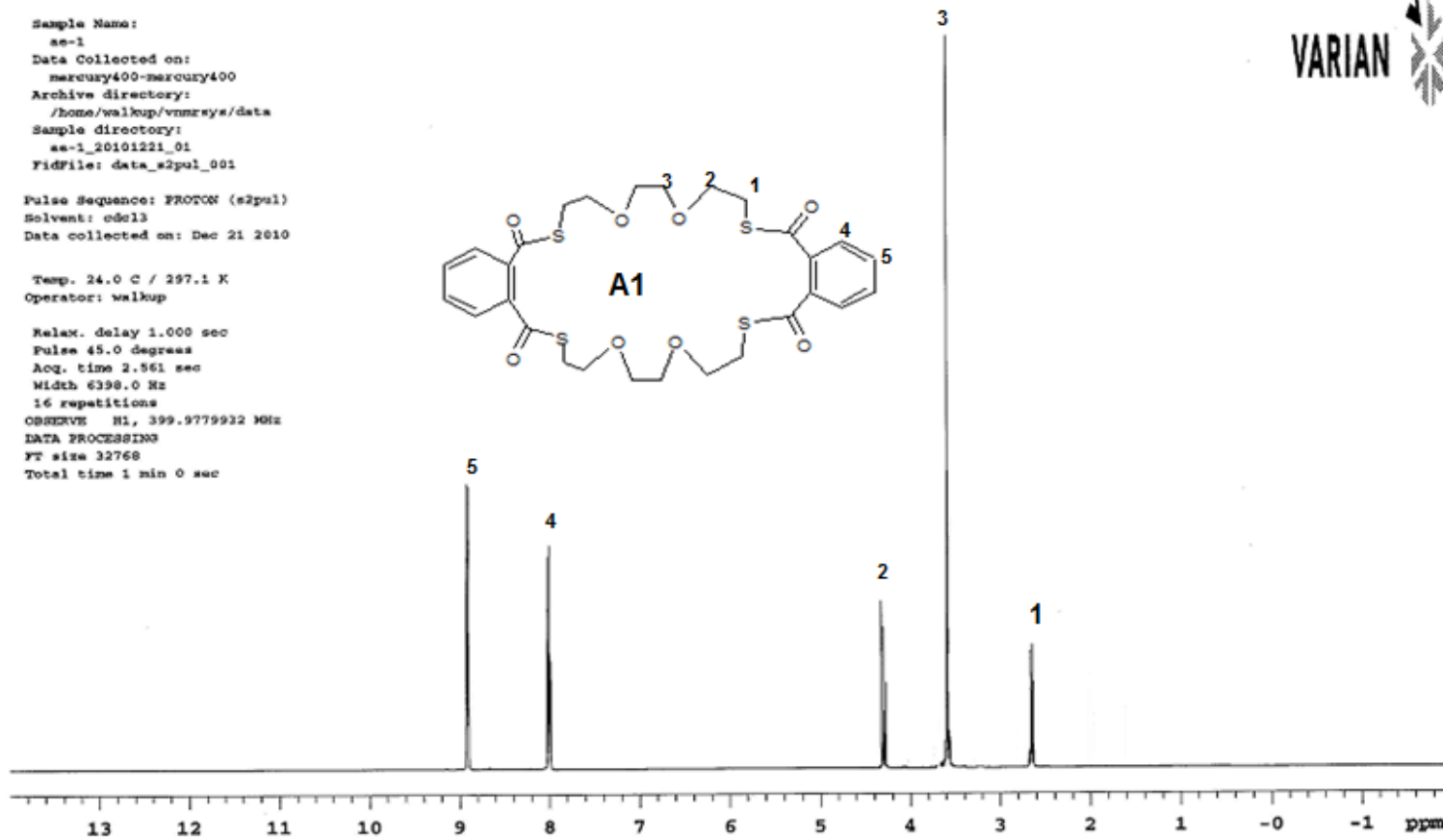
**A3** 6,9,23,26-tetraoxa-3,12,20,29-tetrathiatricyclo[29.3.1.1<sup>14,18</sup>]hexatriaconta-1(35),14(36),15,17,31,33-hexaene-2,13,19,30-tetrone **(1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8)**

**A4** 7,8,10,11,20,21,23,24 - octahydrodibenzo [f,q] [1,12,4,9,15,20] dioxatetrathiacyclodocosine - 5,13,18,26-tetrone **(1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6)**

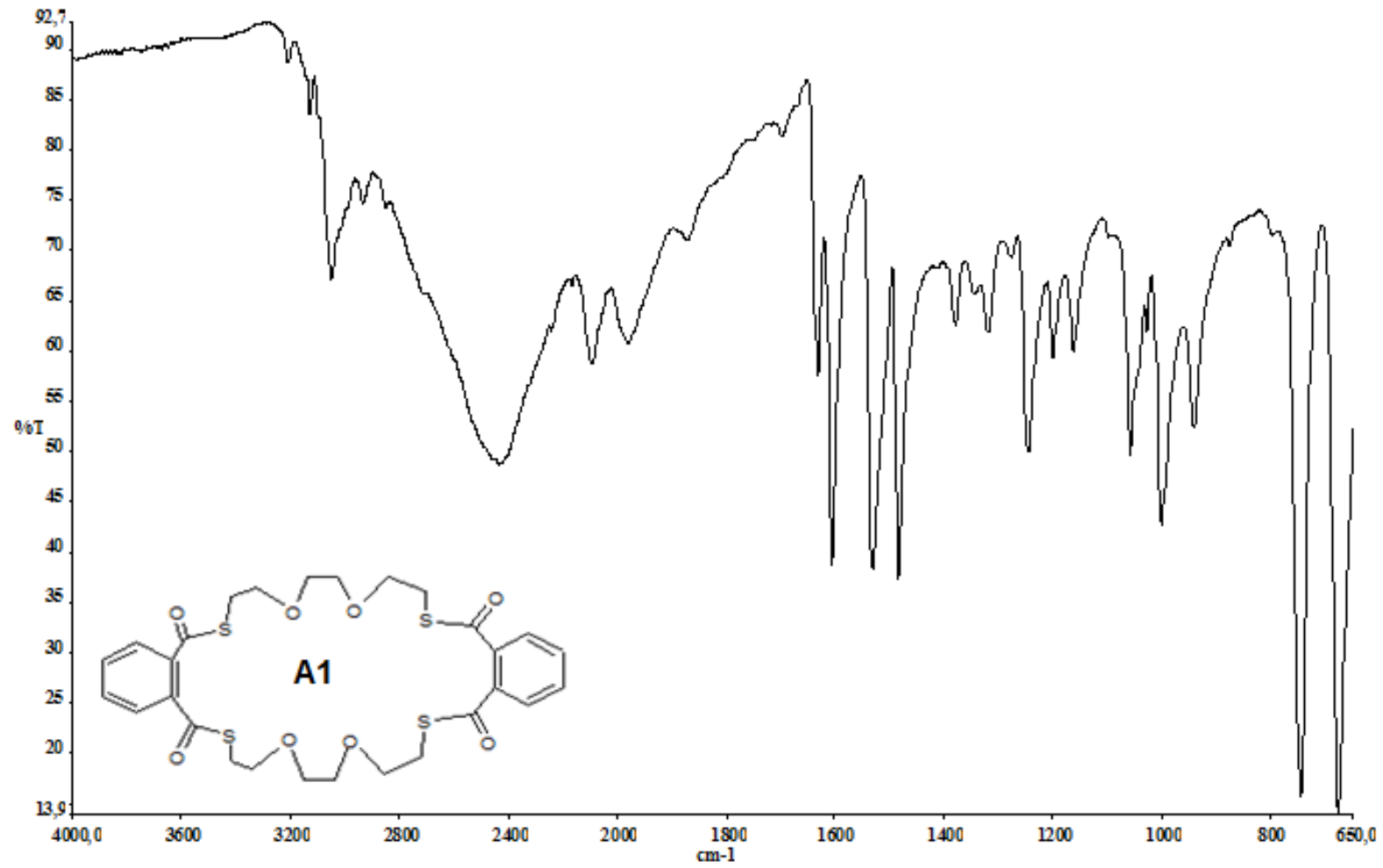
**A5** 6,19-dioxa-3,9,16,22 - tetrathiatricyclo [22.2.2.2<sup>11,14</sup>] triaconta - 1(26),11,13,24,27,29 - hexaene - 2,10,15,23-tetrone **(1-2-DB-TT-TK-26-Crown-6)**

**A6** 6,20-dioxa-3,9,17,23 - tetrathiatricyclo [23.3.1.1<sup>11,15</sup>] triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27 - hexaene - 2,10,16,2 - tetrone **(1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6)**

ae-1  
 Sample Name:  
 ae-1  
 Data Collected on:  
 mercury400-mercury400  
 Archive directory:  
 /home/walkup/vnmrsys/data  
 Sample directory:  
 ae-1\_20101221\_01  
 FidFile: data\_s2pul\_001  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Dec 21 2010  
 Temp. 24.0 C / 297.1 K  
 Operator: walkup  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 2.561 sec  
 Width 6398.0 Hz  
 16 repetitions  
 OBSERVE H1, 399.9779922 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 1 min 0 sec

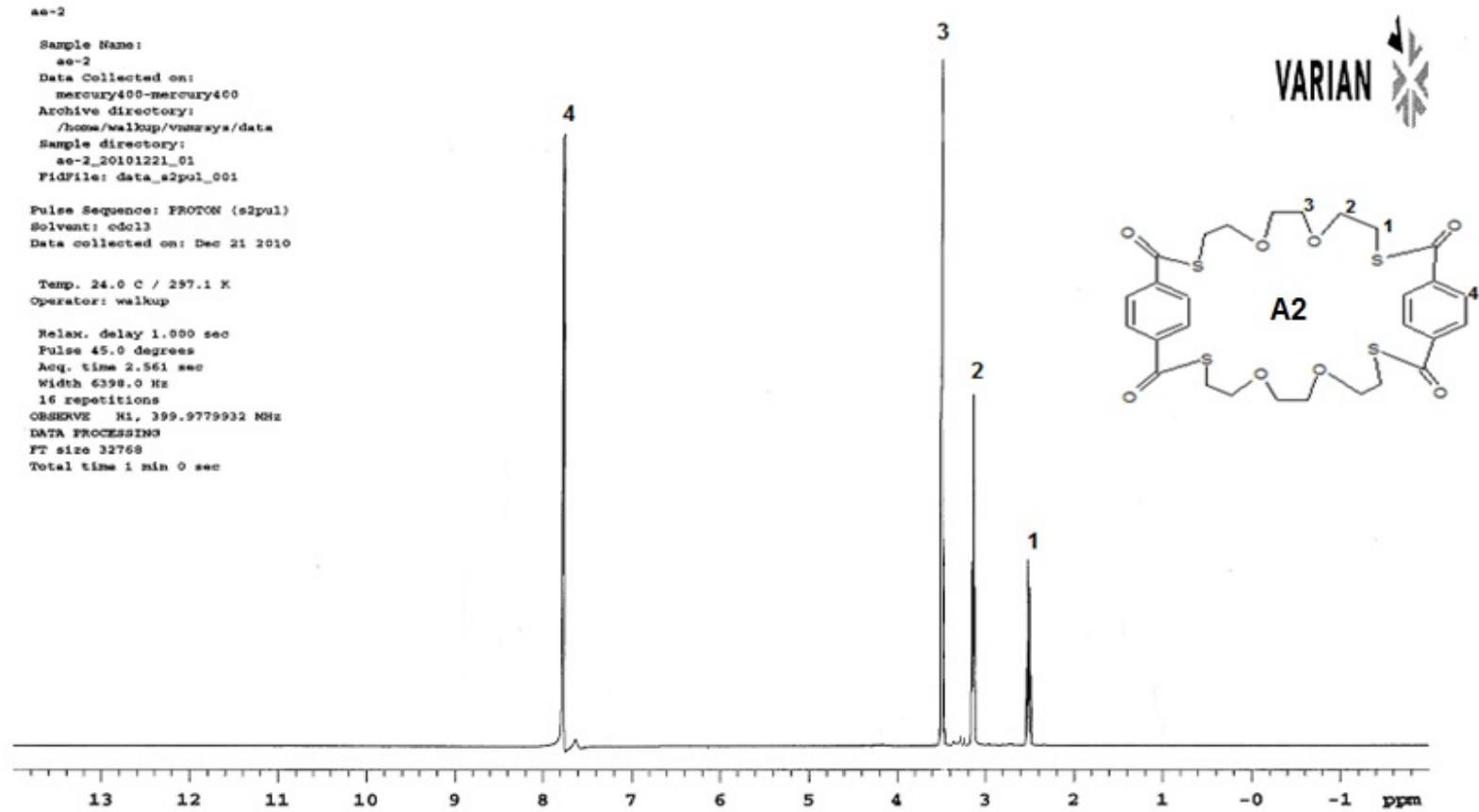


Şekil 3.1. A1 (1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8)' in  $^1\text{H-NMR}$  Spektrumu

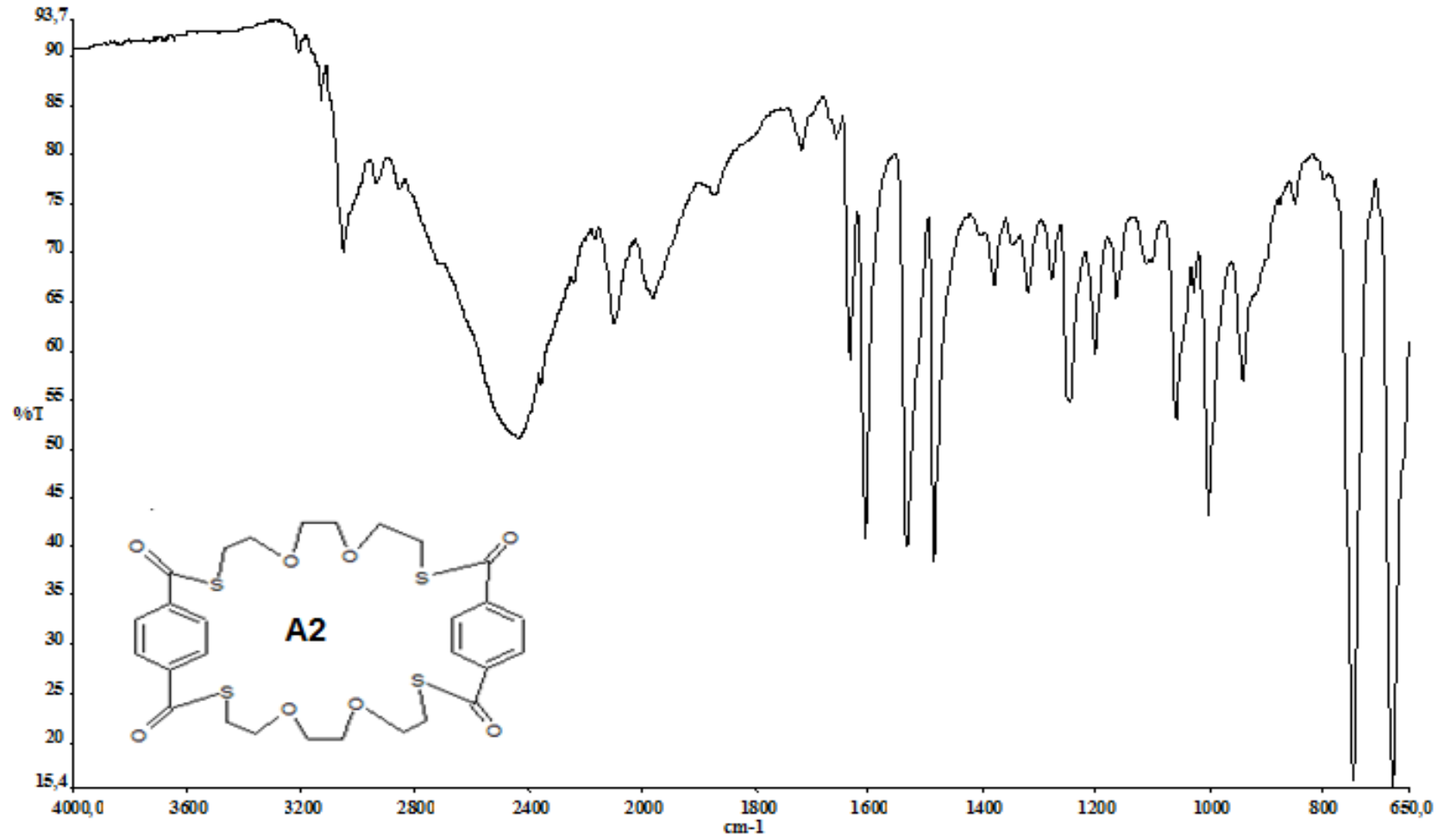


Şekil 3.2. A1 (1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8)' in FT-IR Spektrumu



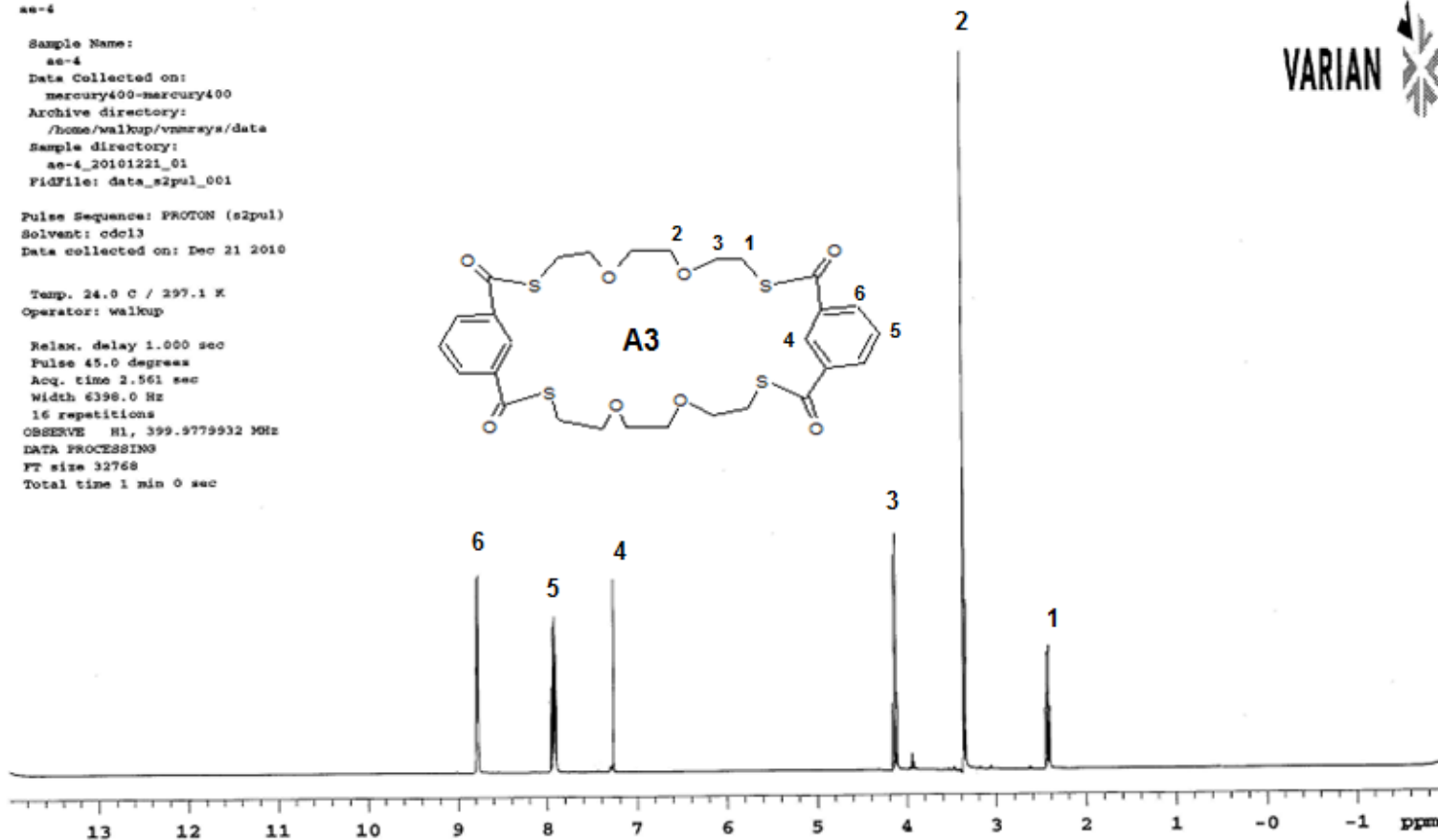


Şekil 3.3. A2 (1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8)' in  $^1\text{H-NMR}$  Spektrumu

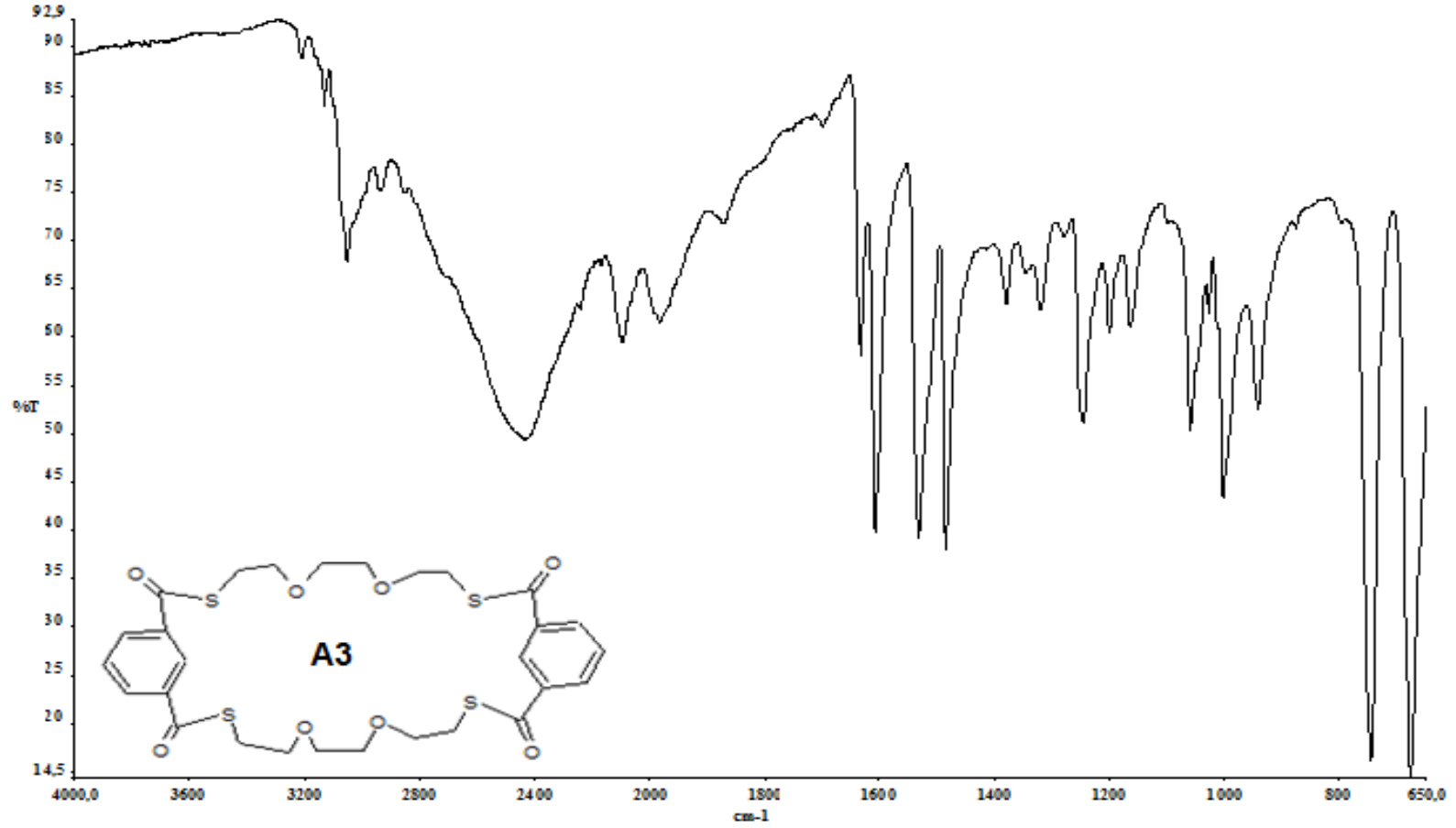


Şekil 3.4. A2 (1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8)'nin FT-IR Spektrumu

aa-4  
 Sample Name:  
 aa-4  
 Data Collected on:  
 mercury400-mercury400  
 Archive directory:  
 /home/walkup/vnmrsvs/data  
 Sample directory:  
 aa-4\_20101221\_01  
 Fidfile: data\_s2pul\_001  
  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Dec 21 2010  
  
 Temp. 24.0 C / 297.1 K  
 Operator: walkup  
  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 2.561 sec  
 Width 6398.0 Hz  
 16 repetitions  
 OBSERVE H1, 399.9779932 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 1 min 0 sec

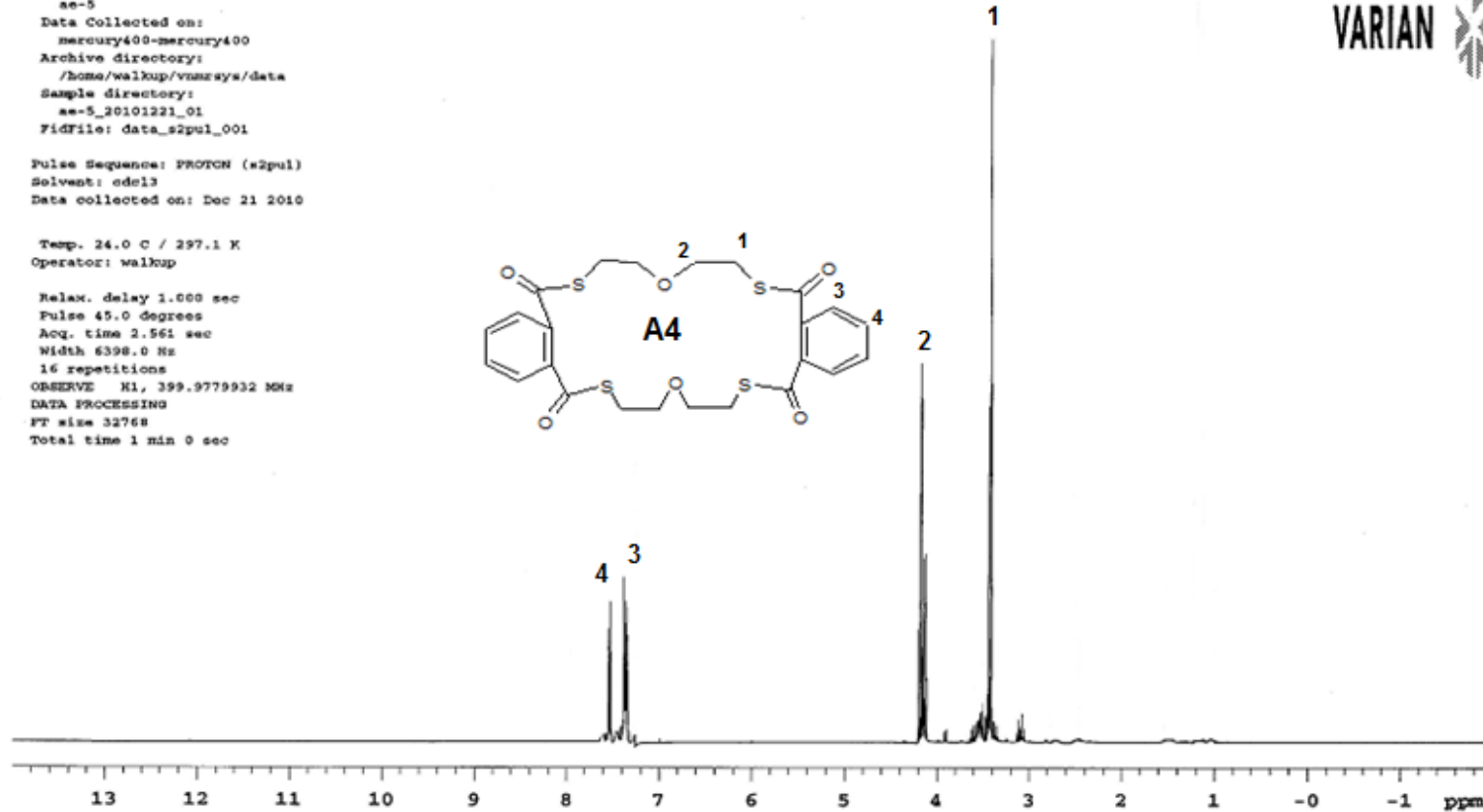


Sekil 3.5. A3 (1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8)' ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

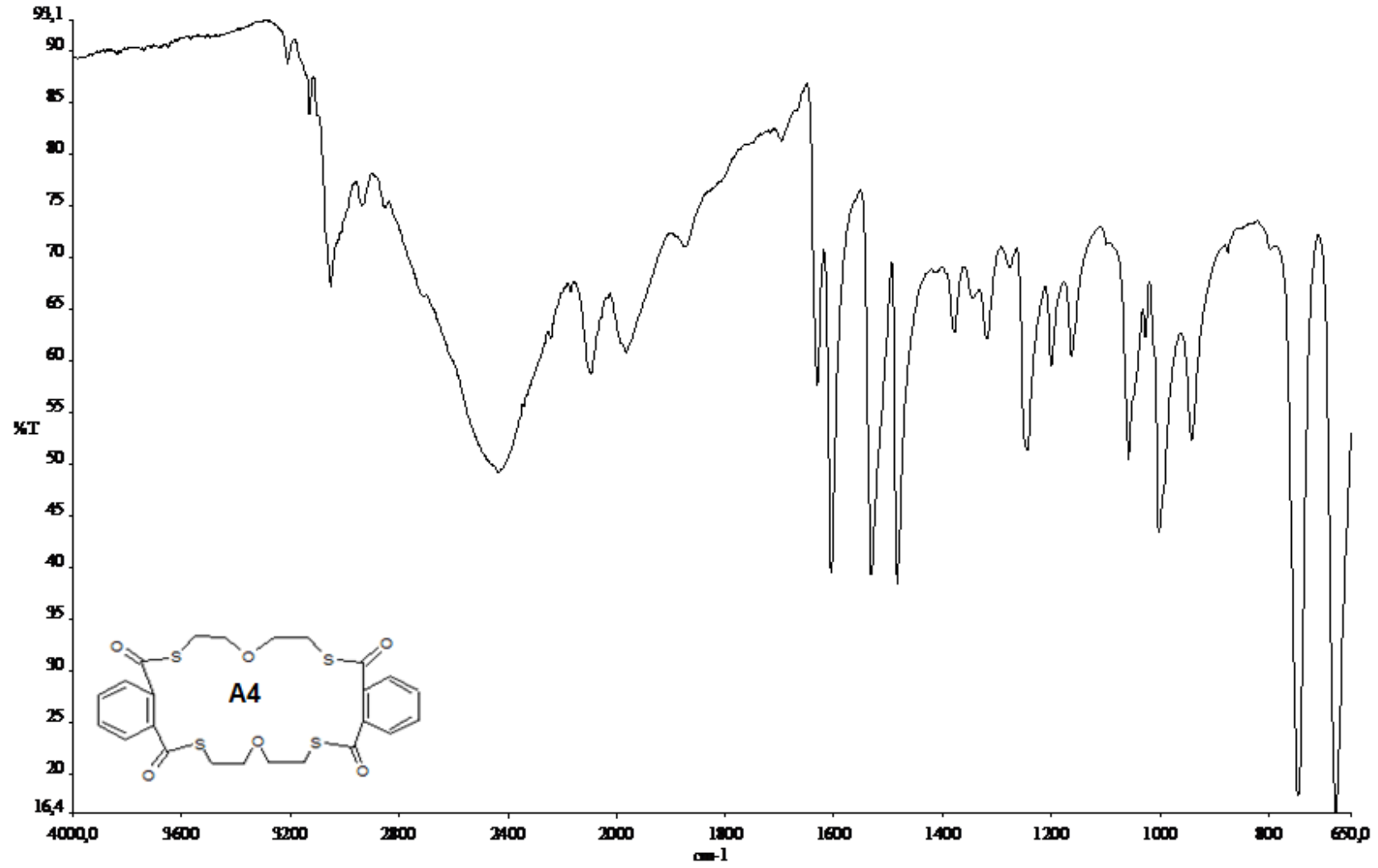


Şekil 3.6. A3 (1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8)' ün FT-IR Spektrumu

ae-5  
 Sample Name:  
 ae-5  
 Data Collected on:  
 mercury400-mercury400  
 Archive directory:  
 /home/walkup/vnmrsw/data  
 Sample directory:  
 ae-5\_20101221\_01  
 Fidfile: data\_s2pul\_001  
  
 Pulse Sequence: PROTON (\*2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Dec 21 2010  
  
 Temp. 24.0 C / 297.1 K  
 Operator: walkup  
  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 2.561 sec  
 Width 6398.0 Hz  
 16 repetitions  
 OBSERVE H1, 399.9779932 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 1 min 0 sec

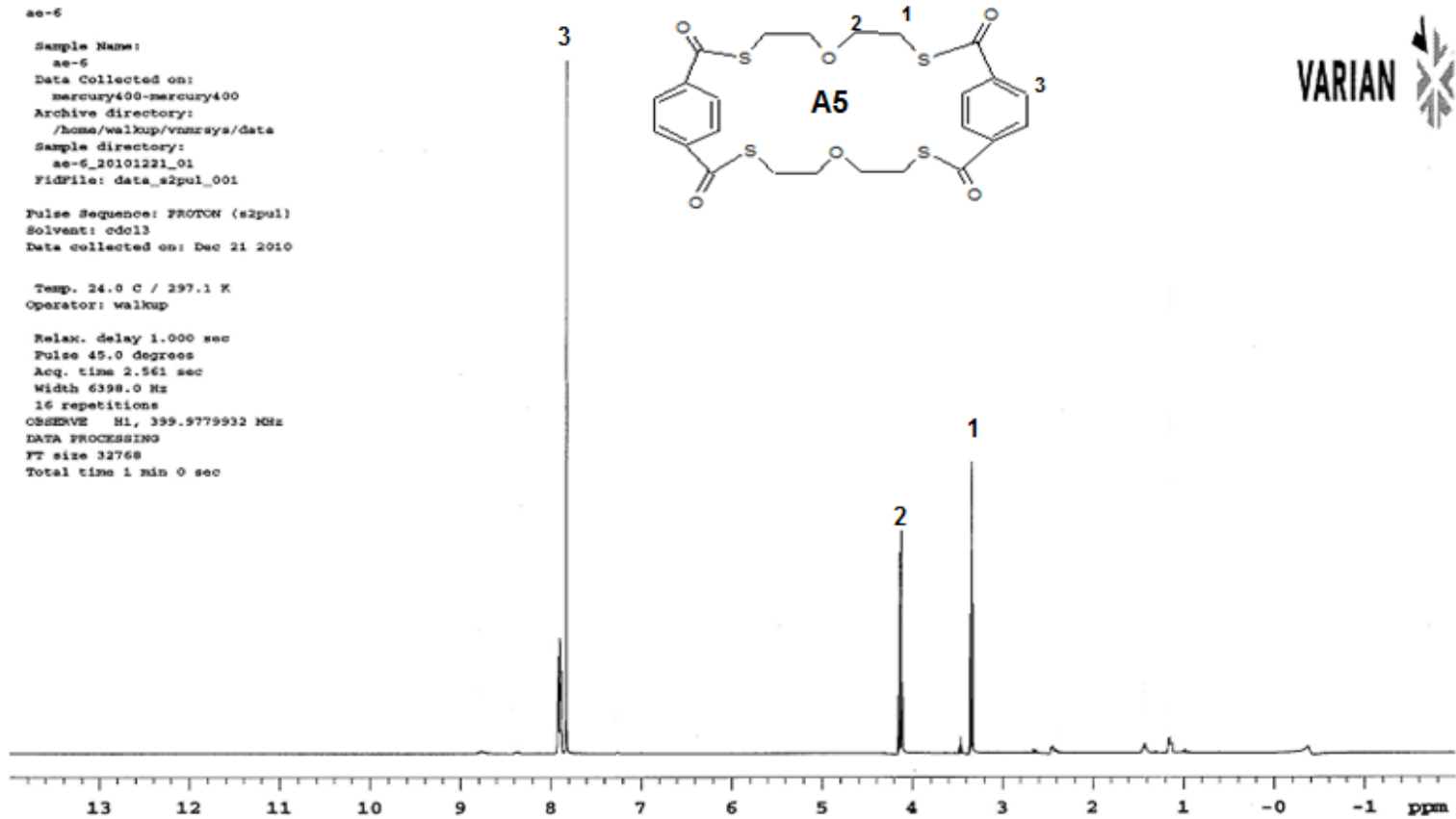


Şekil 3.7. A4 (1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6)' ün <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu



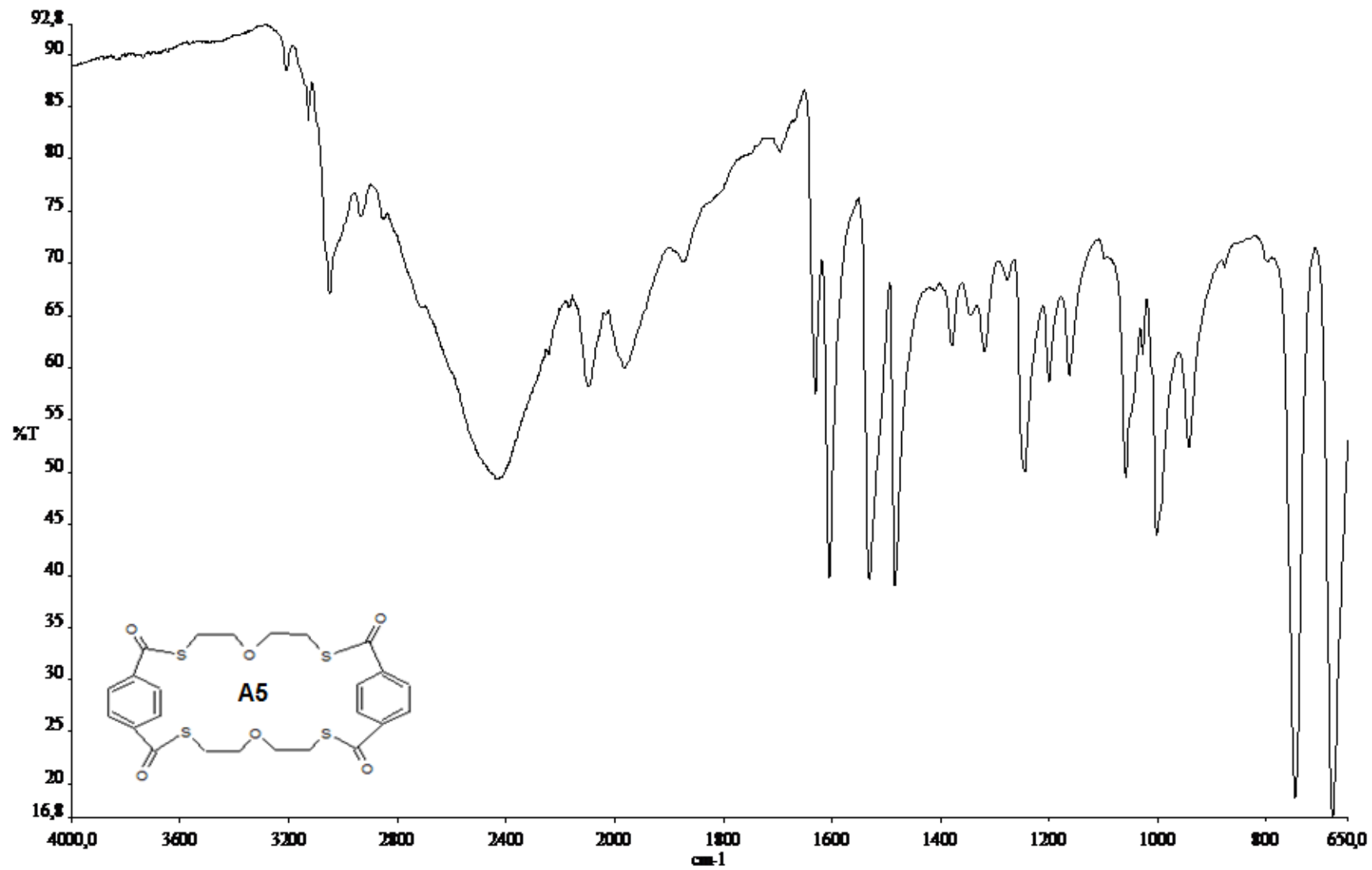
Şekil 3.8. A4 (1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6)' ün FT-IR Spektrumu

ae-6  
Sample Name:  
ae-6  
Data Collected on:  
mercury400-mercury400  
Archive directory:  
/home/walkup/vnmrsva/data  
Sample directory:  
ae-6\_20101221\_01  
FidFile: data\_s2pul\_001  
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Dec 21 2010  
Temp. 24.0 C / 297.1 K  
Operator: walkup  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 2.561 sec  
Width 6398.0 Hz  
16 repetitions  
CROSSPVE HL, 399.9779932 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 32768  
Total time 1 min 0 sec



Şekil

3.9. A5 (1-2-DB-TT-TK-26-Crown-6)' in <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu



Şekil 3.10. A5 (1-2-DB-TT-TK-26-Crown-6)' in FT-IR Spektrumu



ae-7

Sample Name:  
ae-7

Data Collected on:  
mercury400-mercury400

Archive directory:  
/home/walkup/vnmrsws/data

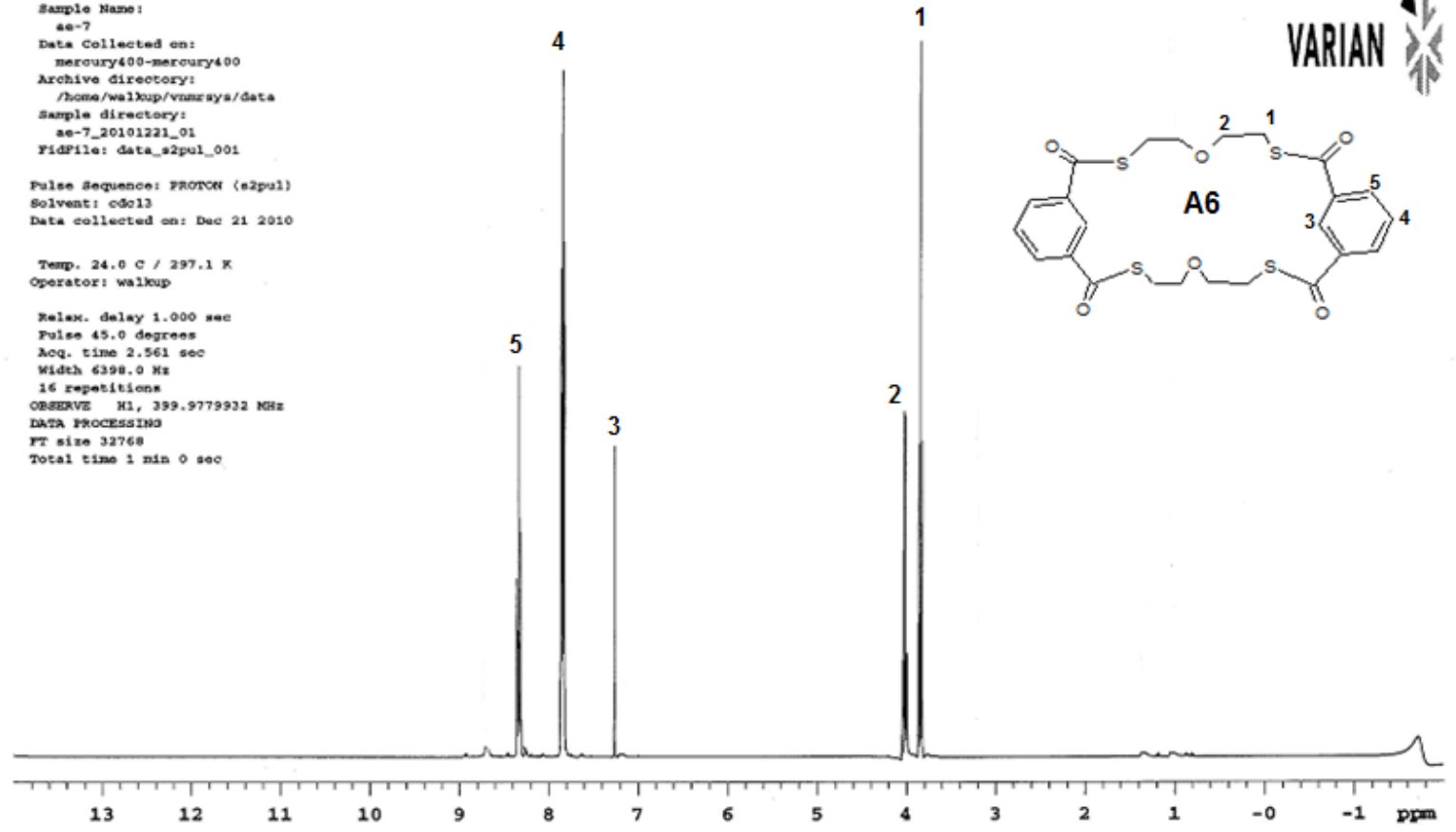
Sample directory:  
ae-7\_20101221\_01

FidFile: data\_s2pul\_001

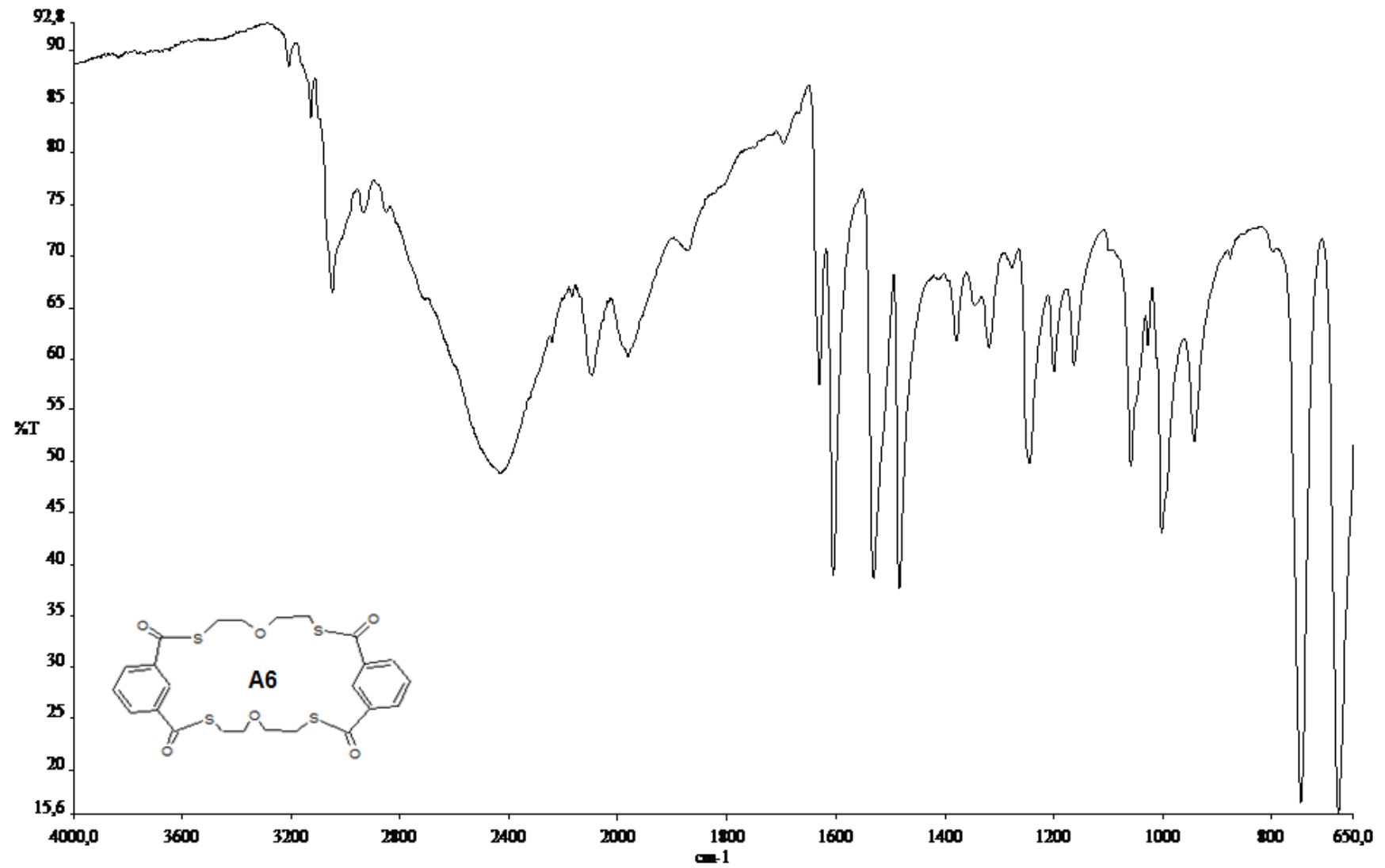
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Dec 21 2010

Temp. 24.0 C / 297.1 K  
Operator: walkup

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 2.561 sec  
Width 6398.0 Hz  
16 repetitions  
OBSERVE M1, 399.9779932 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 32768  
Total time 1 min 0 sec



Şekil 3.11. A6 (1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6)' nin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

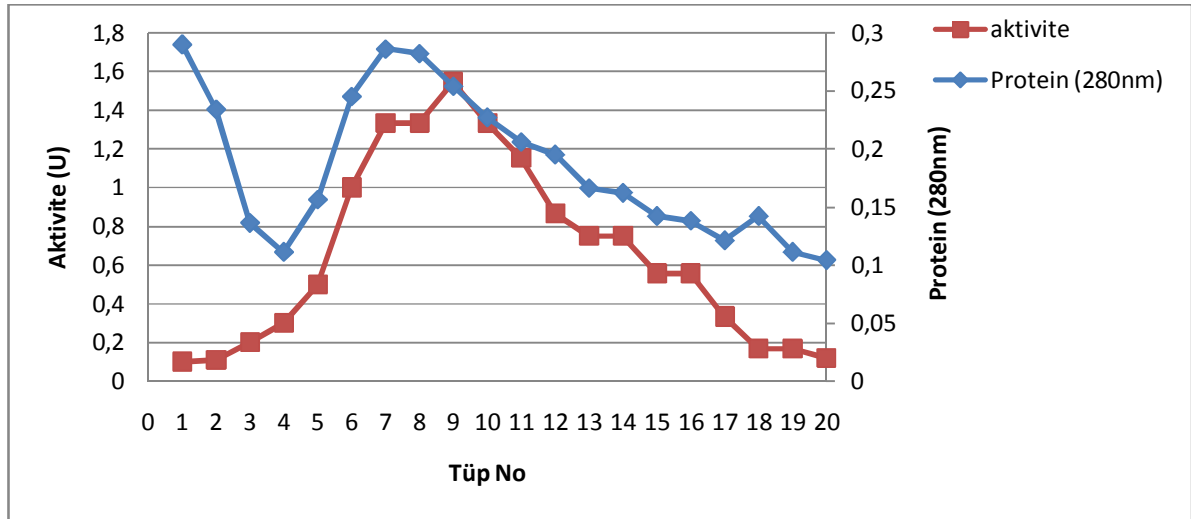


Şekil 3.12. A6 (1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6)' nin FT-IR Spektrumu

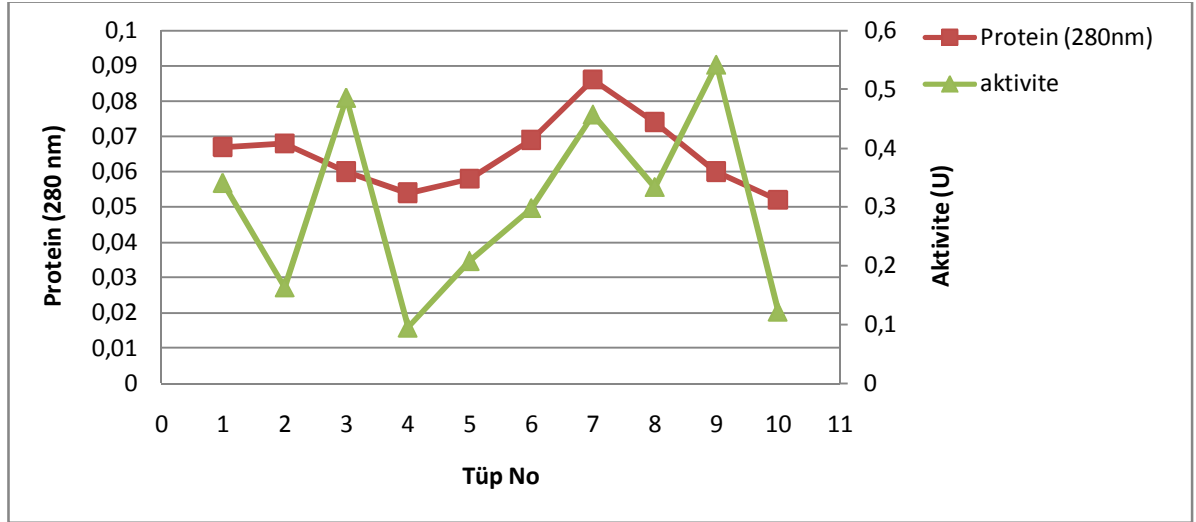
### 3.2. Afinite Kromatografisi ile hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Saflaştırılması

hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5.6), 1 M NaCl / 22 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=6.3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH=5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 1.5 mL'lik fraksiyonlar halinde tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 20 mL /saat olarak ayarlanmıştır.

Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı belirlendi. 280 nm'de en yüksek absorbans ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi (Şekil 3.13 ve 3.14). Birleştirilen tüplerde hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerinde sentezlenen maddelerin inhibisyon etkilerine CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi ile bakıldı.



Şekil 3.13 hCA-I enziminin elüsyon grafiği



Şekil 3.14. hCA-II enziminin elüsyon grafiği

### 3.3. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Aktivite Tayini

Sentezlenen maddelerin hCA-I ve hCA-II enzim aktivitelerine etkilerini belirlemek için kendimden alınan kanla çalışıldı ve afinite kromatografisi ile hCA-I ve hCA-II enzimleri saflaştırıldıktan sonra CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi ile aktivite belirlendi. hCA-I ve hCA-II enzimleri aktivitesi belirlenmesinde, tüpte toplam hacim 4.1 mL'dir. Ortamdaki H<sup>+</sup> konsantrasyonunun artması veya azalması reaksiyon pH'ını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatörle belirlenebilir. Bu yöntemle göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz CO<sub>2</sub> hidrasyon süresi (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süreleri (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın (t<sub>c</sub>)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Sonuçlar, çizelge 3.1 – 3.6'da verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** A1'in hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerindeki etkisi ve IC<sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

pH=10 Tamponu ( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Enzim Çözeltisinin in Hacmi ( $\mu$ L)	Fenol Kırmızısı Çözeltisi ( $\mu$ L)	Saf Su ( $\mu$ L)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	A1 Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Küvetteki A1'in Konsantrasyonu ( mM )	Süre(sn)	Aktivite [(t <sub>0</sub> )-(t <sub>c</sub> )]/(t <sub>c</sub> )	% Aktivite
400	hCA-I	-	2000	400	1300	-	-	23.52	-	-
		50		350		-	-	10.86	1.165	100
				330		20	0.536	13.87	0.695	59.68
				320		30	0.804	14.42	0.631	54.13
				290		60	1.609	15.69	0.499	42.80
				280		70	1.878	16.38	0.435	37.39
				270		80	2.146	17.18	0.369	31.65
				260		90	2.414	21.34	0.102	8.76
				250		100	2.682	22.94	0.025	2.16
				400		hCA-II	-	2000	400	1300
50	300	-	-		20.63		0.367		100	
	250	50	1.34		17.47		0.615		167.25	
	200	100	2.68		15.37		0.836		227.24	
	150	150	4.02		8.95		2.153		585.21	
	300	200	5.37		7.7		2.664		724.34	

**Çizelge 3.2.** A2'nin hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC<sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

pH=10 Tamponu ( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Fenol Kırmızısı Çözeltisi ( $\mu$ L)	Saf Su ( $\mu$ L)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	A2 Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Küvetteki A2'nin Konsantrasyonu ( mM )	Süre(sn)	Aktivite [(t <sub>0</sub> )-(t <sub>c</sub> )]/(t <sub>c</sub> )	% Aktivite
400	hCA-I	-	2000	400	1300	-	-	24	-	-
		50		350		-	-	12.07	0.988	100
				300		50	1.341	13.89	0.727	76.72
				290		60	1.609	14.67	0.635	67.04
				280		70	1.878	14.73	0.629	66.33
				270		80	2.146	15.34	0.564	59.50
				260		90	2.414	16.59	0.446	47.08
				250		100	2.682	16.95	0.415	43.84
400	hCA-II	-	2000	400	1300	-	-	24.76	-	-
		50		350		-	-	18.25	0.356	100
				300		50	1.341	12.88	0.922	258.57
				250		100	2.682	11.95	1.071	300.51
				200		150	4.024	9.58	1.584	444.20
				150		200	5.365	8.18	2.026	568.21

**Çizelge 3.3.** A3'ün hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC<sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

pH=10 Tamponu (µL)	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol KırmızıS1 Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	A3 Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki A3'ün Konsantrasyonu ( mM )	Süre(sn)	Aktivite [(t <sub>0</sub> )-(t <sub>c</sub> )]/(t <sub>c</sub> )	% Aktivite
400	hCA-I	-	2000	400	1300	-	-	17.13	-	-
		50		350		-	-	8.22	1.083	100
				330		20	0.536	9.15	0.872	80.45
				320		30	0.804	9.41	0.820	75.68
				310		40	1.073	9.55	0.793	73.22
				300		50	1.341	9.98	0.716	66.09
				290		60	1.609	10.52	0.628	57.96
				250		100	2.682	11.88	0.441	40.76
				400		hCA-II	-	2000	400	1300
50	350	-	-		16.33		0.297		100	
	300	50	1.341		14.71		0.439		148.09	
	250	100	2.682		13.3		0.592		199.48	
	200	150	4.024		9.55		1.217		410.03	
	150	200	5.365		7.89		1.684		567.14	

**Çizelge 3.4.** A4'ün hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC<sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

pH=10 Tamponu (µL)	Enzim (µL)	Enzim Çözeltisinin Hacmi (µL)	Fenol Kırmızısı Çözeltisi (µL)	Saf Su (µL)	Substrat Çözeltisinin Hacmi (µL)	A4 Çözeltisinin Hacmi (µL)	Küvetteki A4'ün Konsantrasyonu (mM)	Süre(sn)	Aktivite [(t <sub>0</sub> )-(t <sub>c</sub> )]/(t <sub>c</sub> )	% Aktivite
400	hCA-I	-	2000	400	1300	-	-	20.64	-	-
		50		350		-	-	12.48	0.653	100
				330		20	0.53	12.95	0.593	90.81
				310		40	1.07	14.56	0.417	63.86
				300		50	1.34	15.67	0.317	48.50
				275		75	2.01	16.21	0.273	41.79
				265		85	2.28	16.53	0.248	38.02
				250		100	2.68	19.34	0.067	10.28
400	hCA-II	-	2000	400	1300	-	-	20.88	-	-
		50		350		-	-	14.97	0.394	100
				320		30	0.805	12.42	0.681	172.53
				300		50	1.341	10.82	0.929	235.50
				250		100	2.683	9.81	1.128	285.83
				150		200	5.366	8.95	1.332	337.63



**Çizelge 3.5.** A5'in hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC<sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

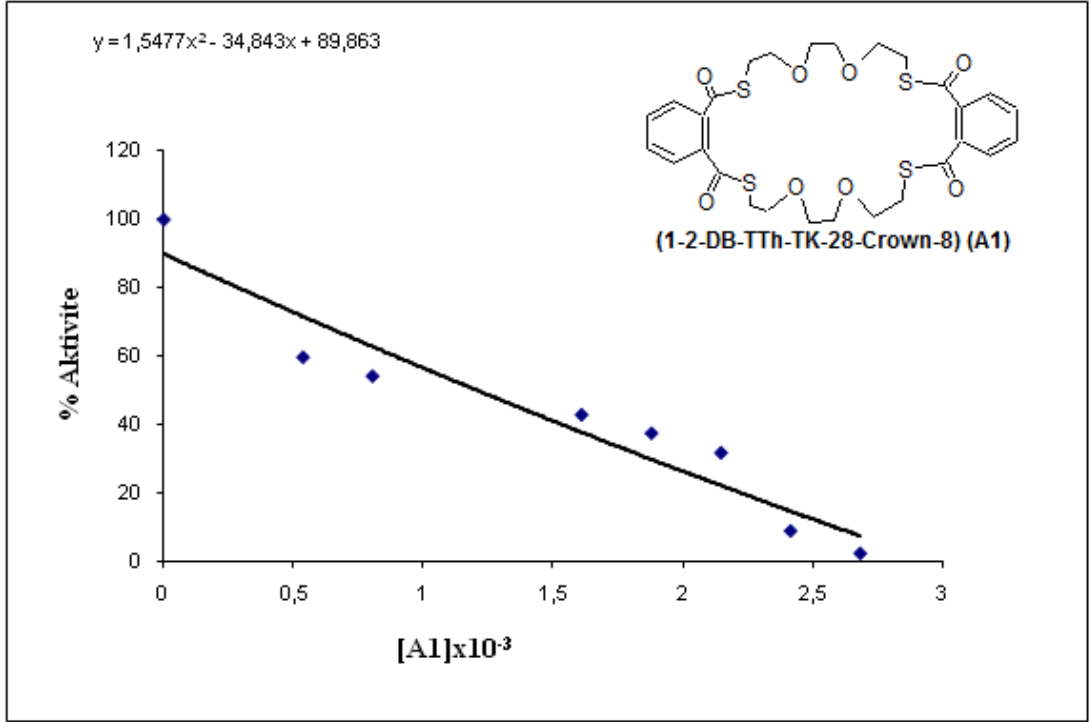
pH=10 Tamponu ( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Fenol Kırmızısı Çözeltisi ( $\mu$ L)	Saf Su ( $\mu$ L)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	A5 Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Küvetteki A5'in Konsantrasyonu ( mM )	Süre(sn)	Aktivite [(t <sub>0</sub> )-(t <sub>c</sub> )]/(t <sub>c</sub> )	% Aktivite
400	hCA-I	-	2000	400	1300	-	-	24.11	-	-
		50		350		-	-	13.81	0.745	100
				330		20	0.536	15.68	0.537	72.08
				320		30	0.804	16.66	0.447	59.95
				310		40	1.073	19.02	0.267	35.88
				300		50	1.341	19.46	0.238	32.03
				290		60	1.61	20.71	0.164	22.01
				250		100	2.683	22.15	0.088	11.86
				400		hCA-II	-	2000	400	1300
50	350	-	-		18.45		0.686		100	
	330	20	0.536		15.89		0.957		139.60	
	300	50	1.341		11.41		1.726		251.64	
	275	75	2.012		9.79		2.177		317.39	
	250	100	2.682		8.43		2.690		392.11	

**Çizelge 3.6.** A6'nın hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerine inhibisyon etkisi ve IC<sub>50</sub> değerlerini bulunmasında kullanılan çözelti konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar.

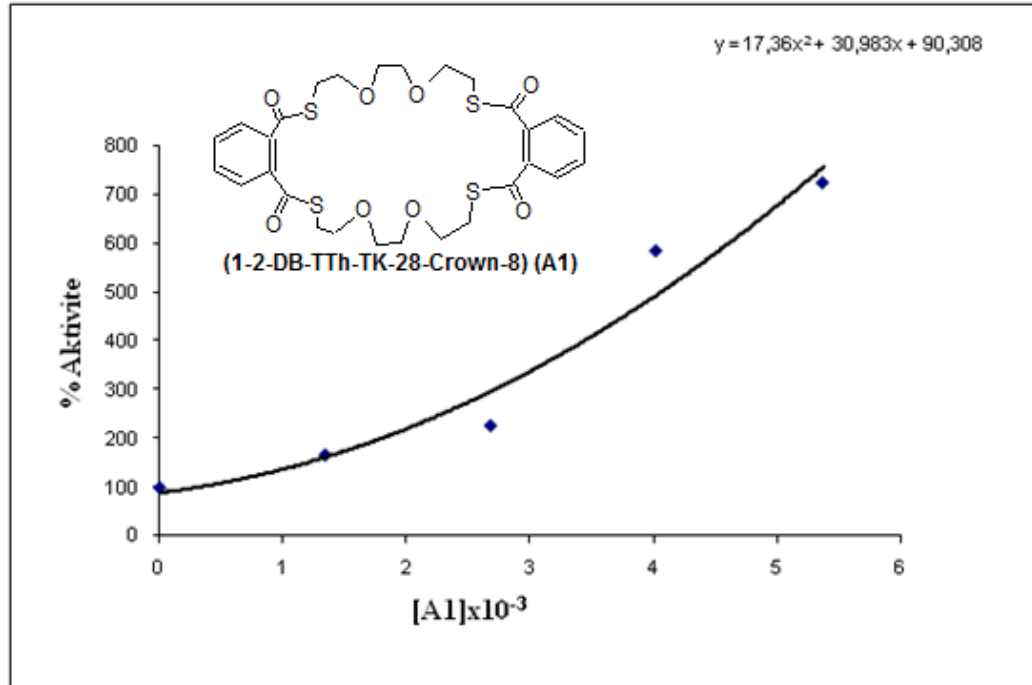
pH=10 Tamponu ( $\mu$ L)	Enzim ( $\mu$ L)	Enzim Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Fenol Kırmızısı Çözeltisi ( $\mu$ L)	Saf Su ( $\mu$ L)	Substrat Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	A6 Çözeltisinin Hacmi ( $\mu$ L)	Küvetteki A6'nın Konsantrasyonu ( mM )	Süre(sn)	Aktivite [(t <sub>0</sub> )-(t <sub>c</sub> )]/(t <sub>c</sub> )	% Aktivite
400	hCA-I	-	2000	400	1300	-	-	21.41	-	-
		50		350		-	-	11.69	0.831	100
				310		40	1.073	14.1	0.518	62.35
				290		60	1.61	15.93	0.344	41.37
				270		80	2.146	16.49	0.298	35.88
				250		100	2.683	17.1	0.252	30.31
				240		110	2.951	20.19	0.060	7.267
400	hCA-II	-	2000	400	1300	-	-	27.76	-	-
		50		350		-	-	18.25	0.521	100
				300		50	1.341	15.14	0.833	159.96
				250		100	2.683	12.58	1.206	231.56
				200		150	4.024	8.16	2.401	460.94
				150		200	5.366	7.97	2.483	476.50

### 3.4. Sentezlenen Tiyocrown Eterlerin hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine Etkileri

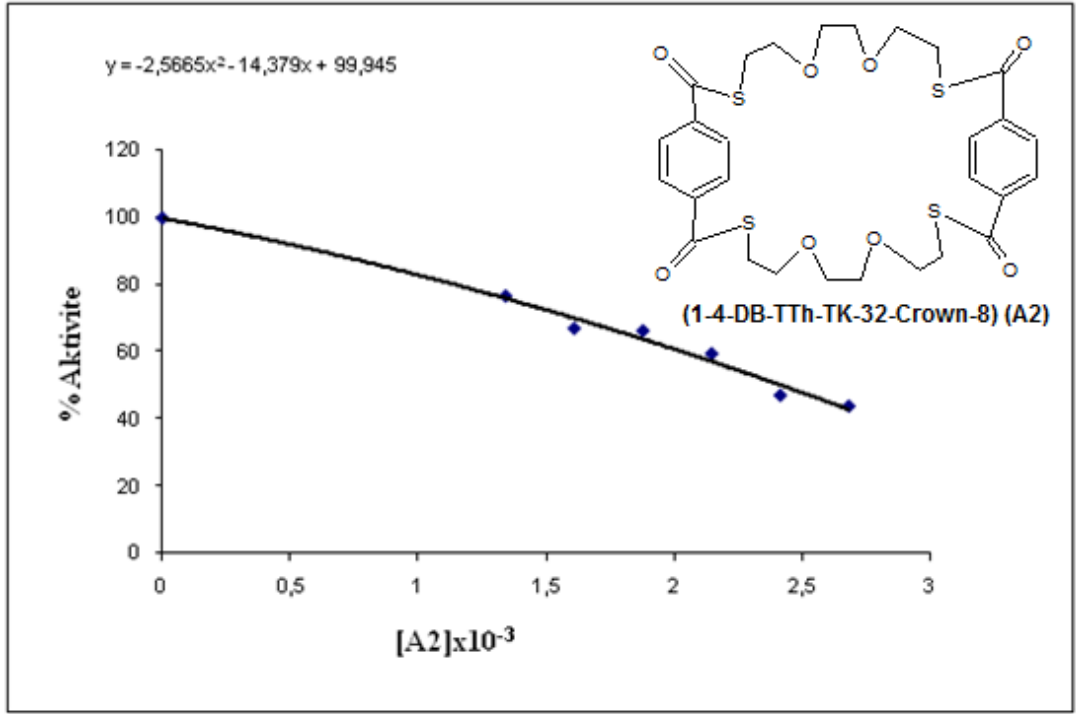
Bu çalışmada kullanılan tiyocrown eterlerin  $IC_{50}$  değerlerini belirlemek için, tiyocrown eter çözeltilerinden değişik hacimlerde alınarak toplam 4.1 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce tiyocrown etersiz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer %100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.05 mL enzim çözeltisi alınıp daha öncede hazırlanmış olan 2.9 mL tampon+substrat+ tiyocrown eter çözeltisine eklendikten sonra, bu yöntemle göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi, enzimsiz  $CO_2$  hidrasyon süresi ( $t_0$ ) ile enzimli reaksiyon süreleri ( $t_c$ ) arasındaki farkın ( $t_c$ )'ye bölünmesiyle elde dilmektedir. Elde edilen verilerle % aktivite hesaplandı. % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.15 - 3.26). Bu grafiklerden yararlanılarak sentezi gerçekleştirilen her bir tiyocrown eter için  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı (Çizelge 3.26).



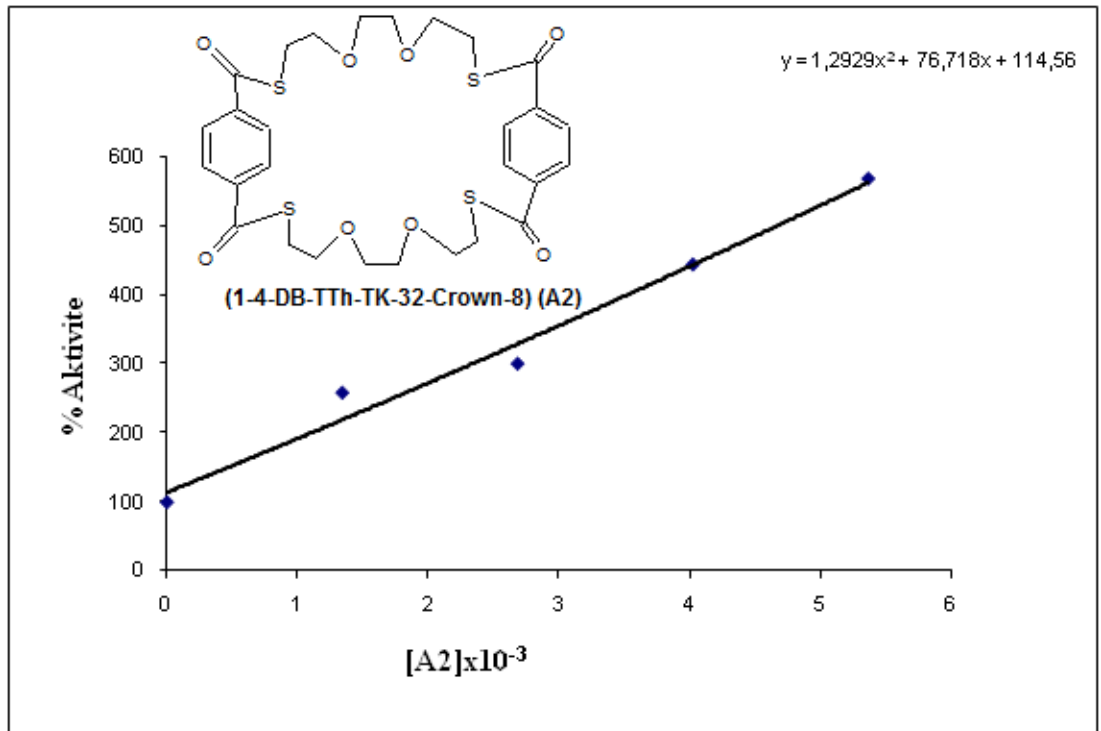
**Şekil 3.15.** Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine (1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) A1'in % aktivite-[I] grafiği



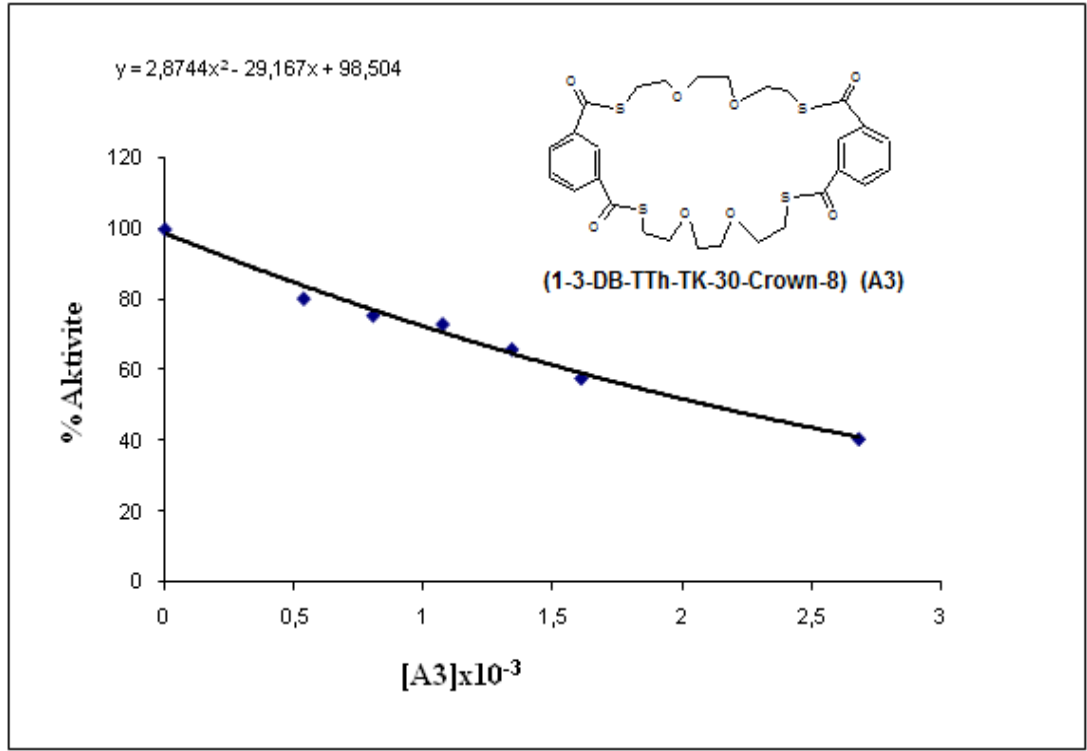
**Şekil 3.16.** Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine (1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) A1'in % aktivite-[I] grafiği



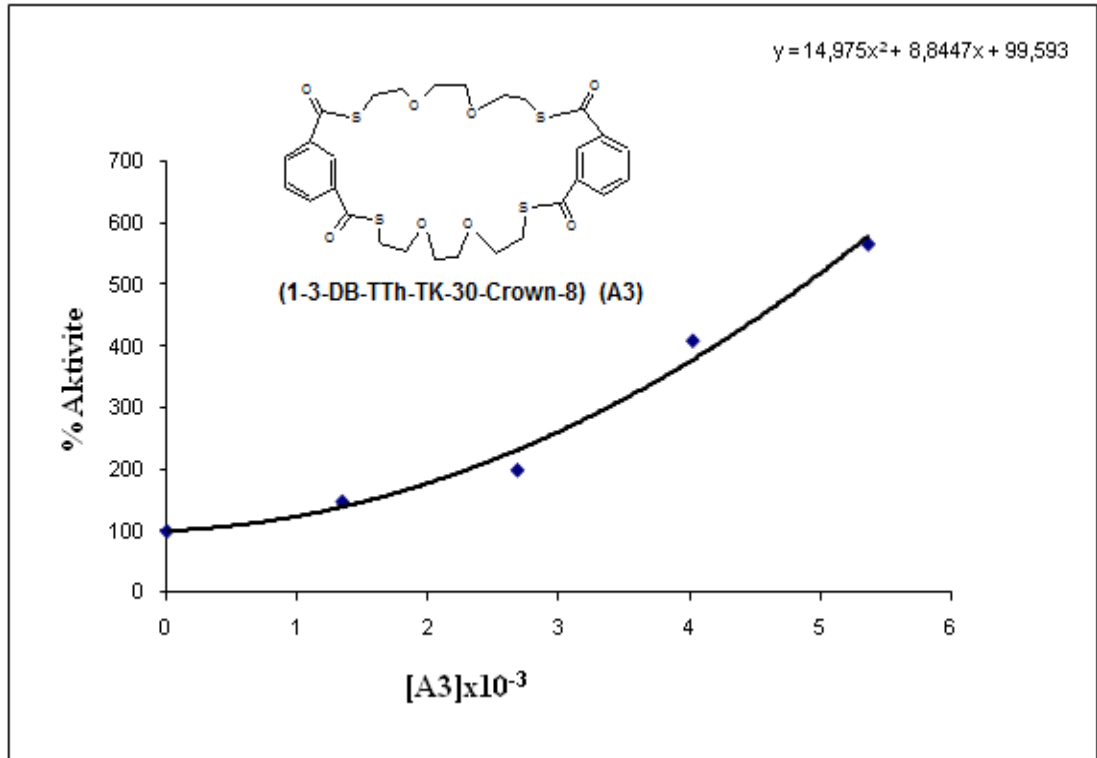
**Şekil 3.17.** Safaştırılmış hCA-I enzimi üzerine (1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) A2'nin % aktivite-[I] grafiği



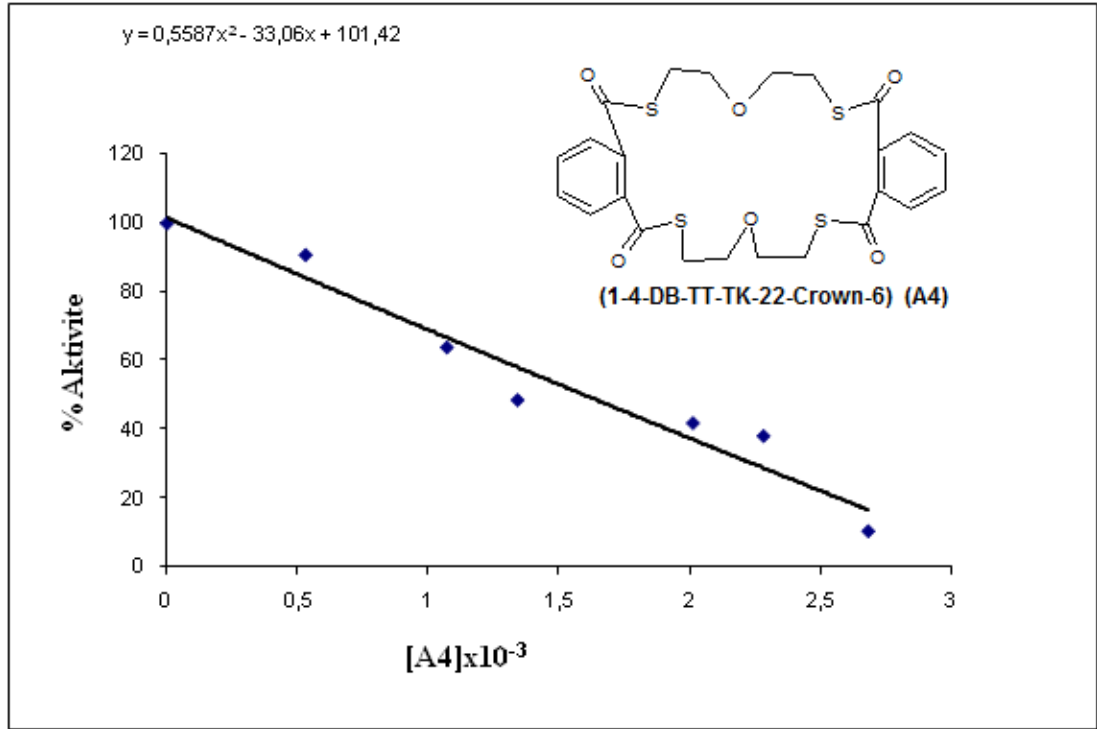
**Şekil 3.18.** Safaştırılmış hCA-II enzimi üzerine (1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) A2'nin % aktivite-[I] grafiği



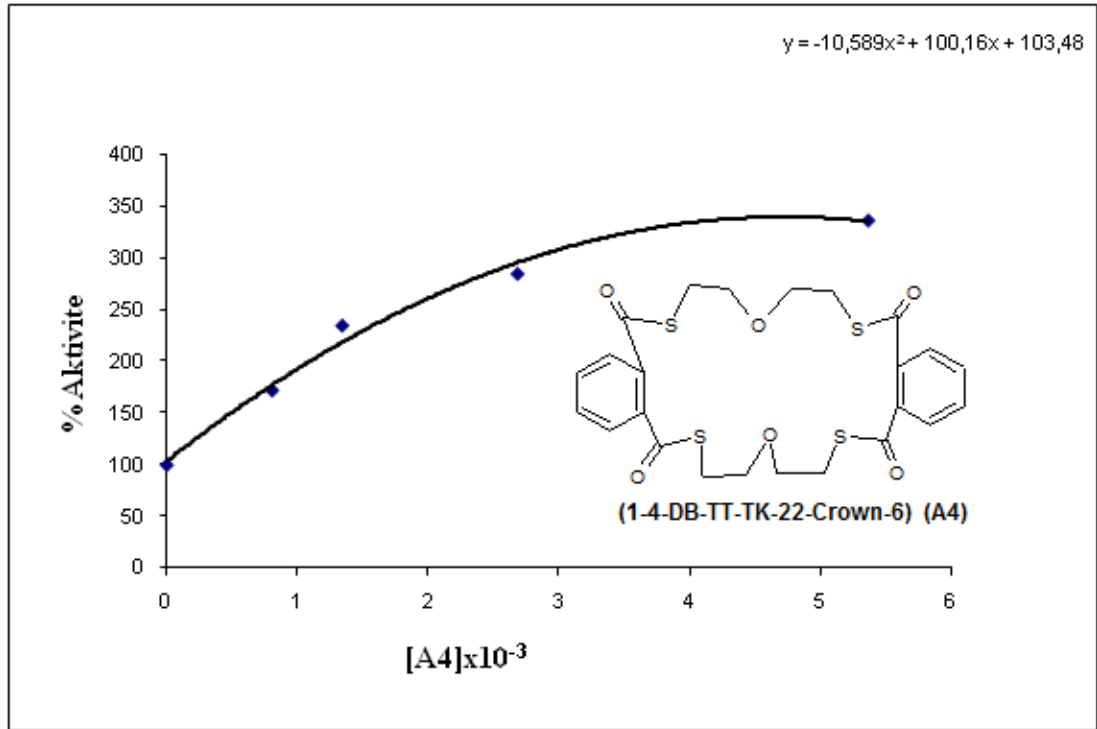
**Şekil 3.19.** Safaştırılmış hCA-I enzimi üzerine (1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) A3'ün % aktivite-[I] grafiği



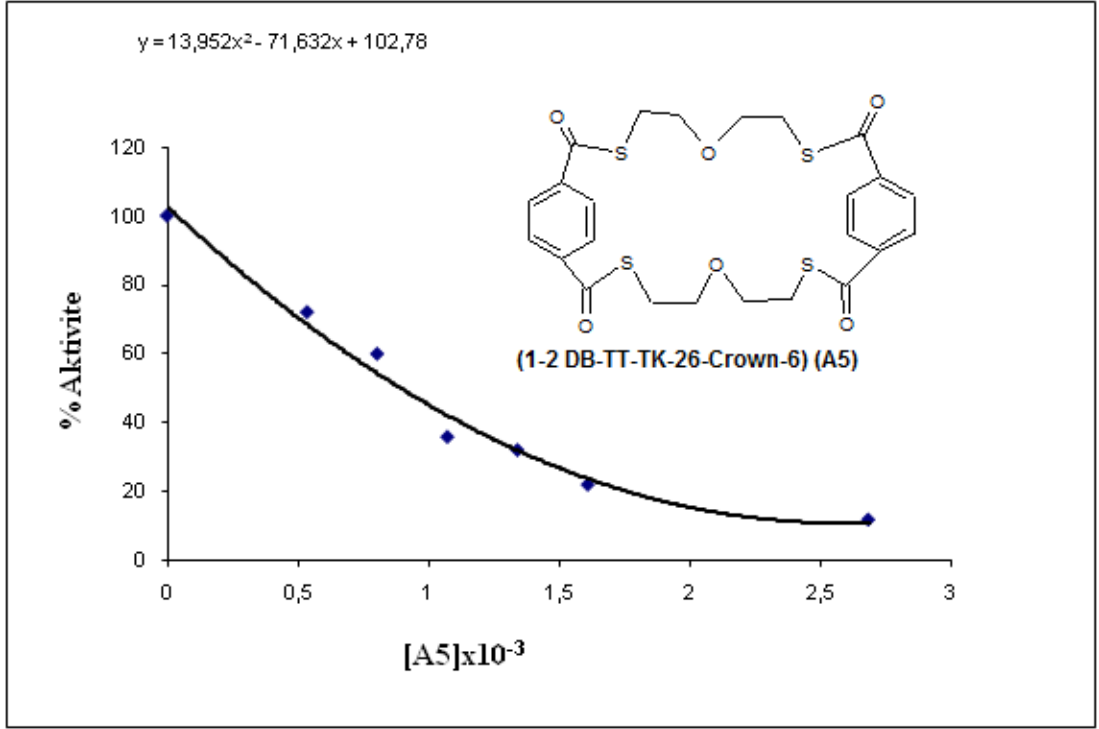
**Şekil 3.20.** Safaştırılmış hCA-II enzimi üzerine (1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) A3'ün % aktivite-[I] grafiği



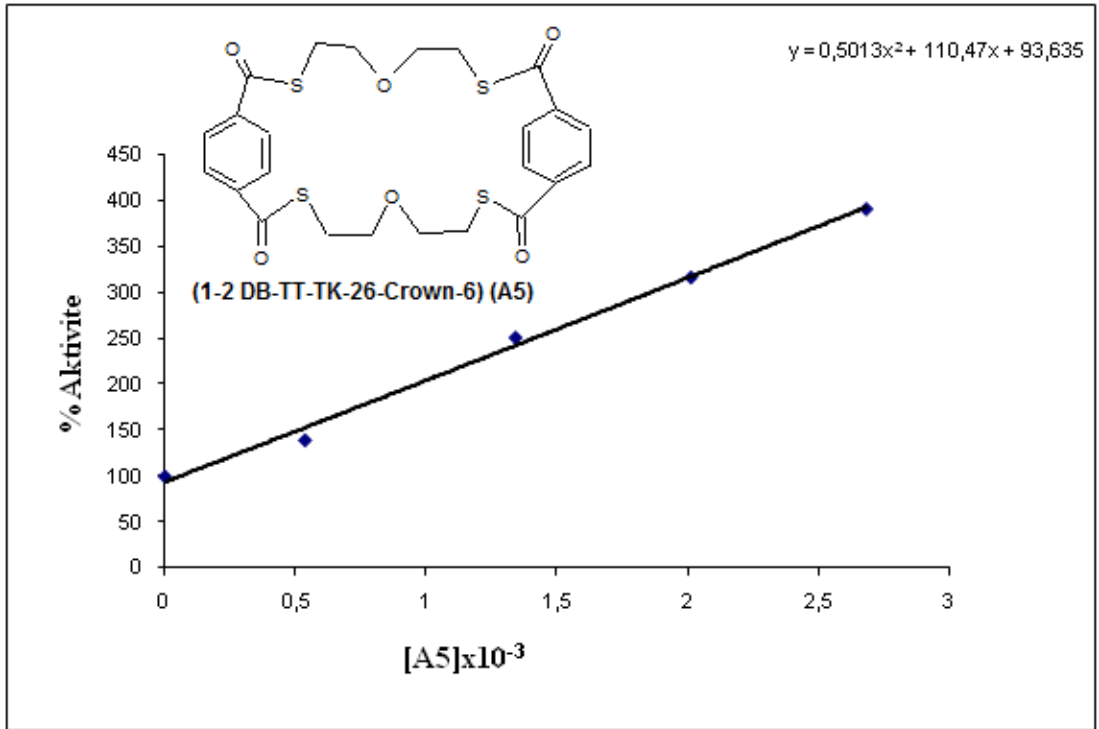
**Şekil 3.21.** Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine (1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) A4'ün % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.22.** Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine (1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) A4'ün % aktivite-[I] grafiği

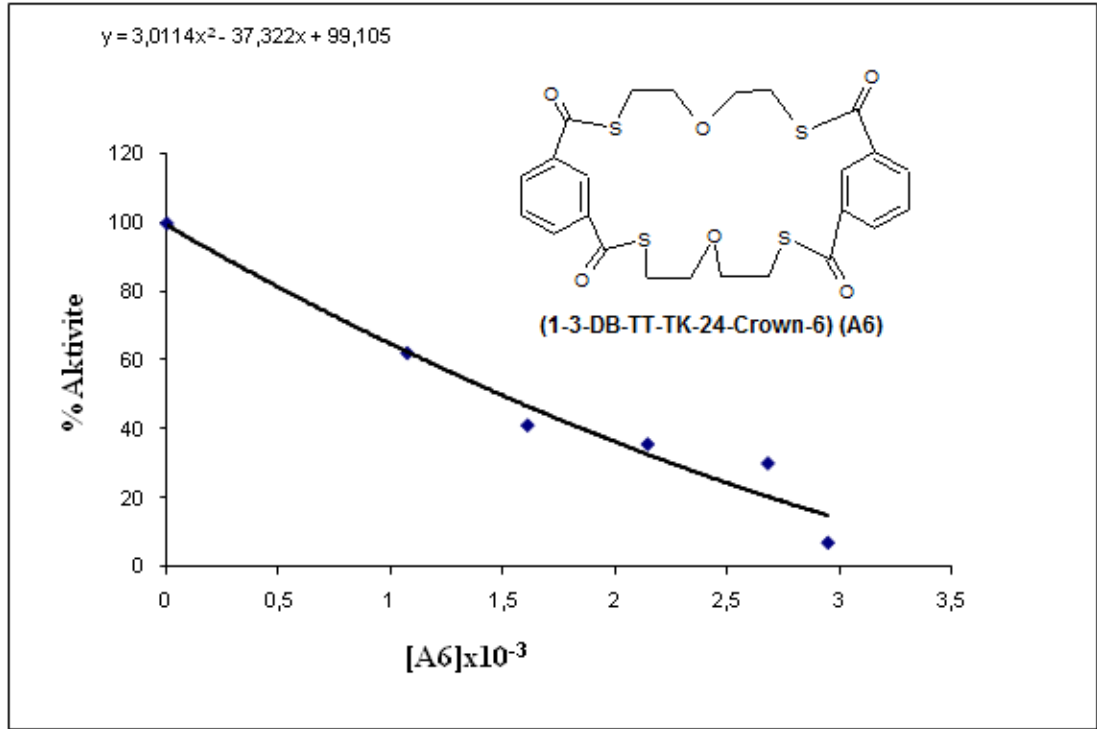


**Şekil 3.23.** Saflaştırılmış hCA-I enzimi üzerine (1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) A5'in % aktivite-[I] grafiği

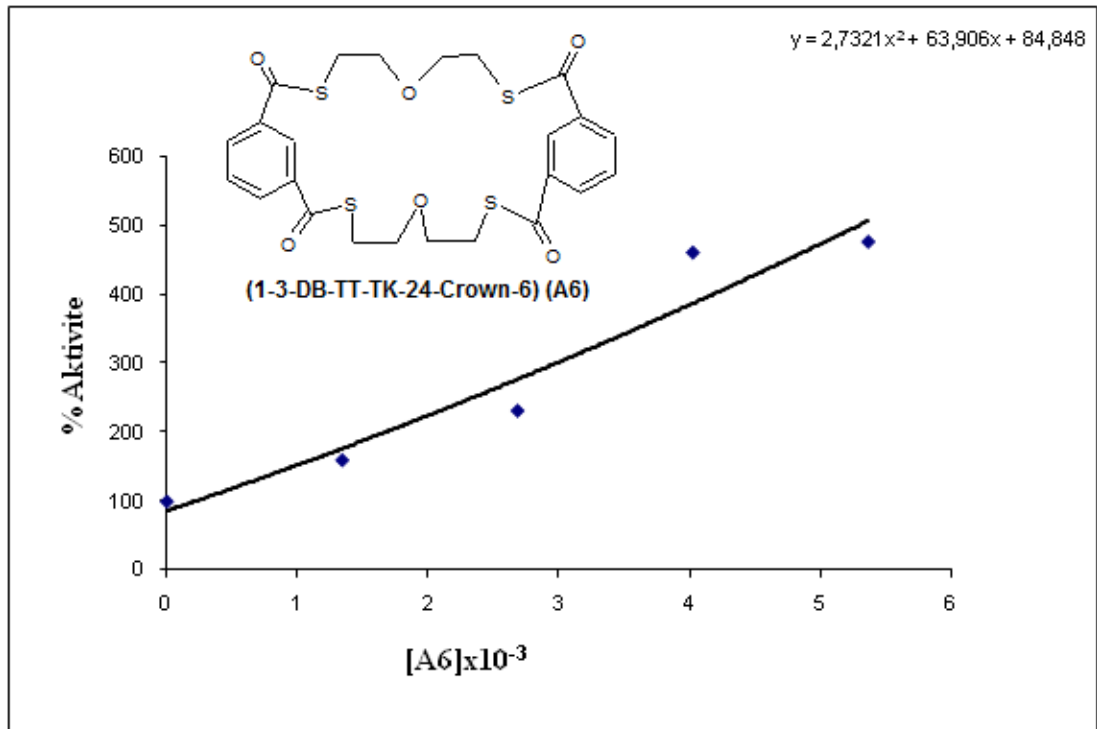


**Şekil 3.24.** Saflaştırılmış hCA-II enzimi üzerine (1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) A5'in % aktivite-[I] grafiği

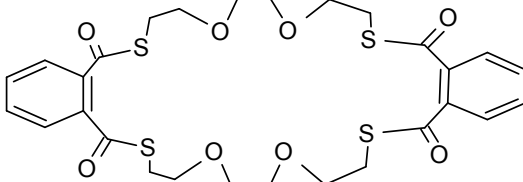
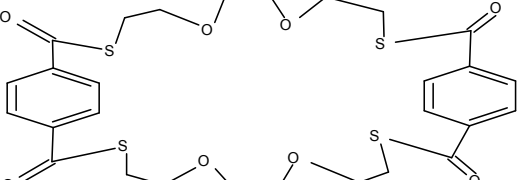
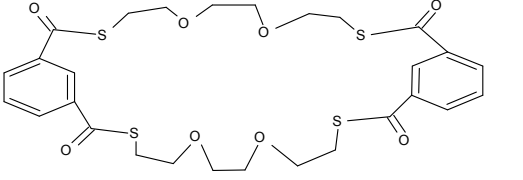
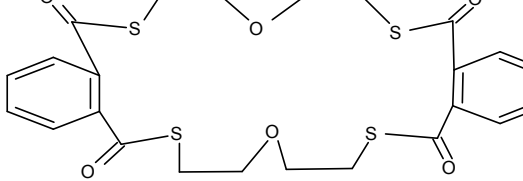
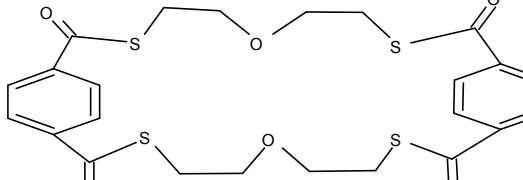
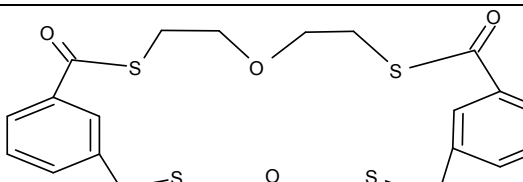




**Şekil 3.25.** Safaştırılmış hCA-I enzimi üzerine (1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) A6'nın % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 3.26.** Safaştırılmış hCA-II enzimi üzerine 1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) A6'nın % aktivite-[I] grafiği

Sentezlenen Tiyocrown Eterler	Enzim	
	hCA-I	hCA-II
 <p><b>(1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) (A1)</b></p>	1.22	*
 <p><b>(1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) (A2)</b></p>	1.61	*
 <p><b>(1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) (A3)</b></p>	2.11	*
 <p><b>(1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) (A4)</b></p>	1.66	*
 <p><b>(1-2-DB-TT-TK-26-Crown-6) (A5)</b></p>	0.84	*
 <p><b>(1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) (A6)</b></p>	1.45	*

**Şekil 3.26.** hCAI ve hCAII enzimlerinin IC<sub>50</sub> değerleri

(\*) = İnhibisyon göstermedikleri için IC<sub>50</sub> değeri hesaplanamaz.

#### 4. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışma makrohalkalı thiyocrown eterlerin sentezleri ve sentezlenen bileşiklerin biyokimyasal inhibizyonu çalışmaları olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır.

Birinci bölümde diasitklorür ile etilenglikoldithiyol türevleri piridin varlığında kloroform içinde azot atmosferinde *Esterleşme- Halka kapama* reaksiyonu kullanılarak makrohalkalı tiyocrown eterlerin sentezleri gerçekleştirilmiştir. Sentelenen bileşikler sırasıyla; 7,8,10,11,13,14,23,24,26,27,29,30 - dodekahidrobenzo [i,w] [1,4,15,18,7,12,21,26] tetraoksatetratyosiklooktakosin - 5,16,21,32-tetron **(1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8) (A1)**, 6,9,22,25-tetraoksa - 3,12,19,28-tetratyotrisiklo [28.2.2.2<sup>14,17</sup>] heksatıyokonta-1(32),14,16,30,33,35-hekzan-2,13,18,29-tetron **(1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8) (A2)**, 6,9,23,26-tetraoksa-3,12,20,29-tetratyotrisiklo[29.3.1.1<sup>14,18</sup>]heksatıyokonta-1(35),14(36),15,17,31,33-hekzan 2,13, 19,30-tetron **(1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8) (A3)**, 7,8,10,11,20,21,23,24 - oktahidrobenzo [f,q] [1,12,4,9,15,20] dioksatetratyosiklodokosin - 5,13,18,26-tetron **(1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6) (A4)**, 6,19-dioksa-3,9,16,22 - tetratyotrisiklo [22.2.2.2<sup>11,14</sup>] tiyokonta - 1(26),11,13,24,27,29 - heksaen - 2,10,15,23-tetron **(1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) (A5)** ve 6,20-dioksa-3,9,17,23 - tetratyotrisiklo [23.3.1.1<sup>11,15</sup>] tiyokonta-1(29),11(30),12,14,25,27 - heksan - 2,10,16,2 -tetron **(1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) (A6)** bileşikleridir. Literatür tarama sonucunda tasarlanan bileşikler Muhammed Seyyed ve arkadaşlarının yöntemleri kullanılarak tamamen orijinal bileşikler sentezlenmiştir[91].

Makrohalkalı tiyocrown halka kapatma reaksiyonlarına bir göz atıldığında bütün yöntemlerde reaksiyon süresinin uzun olduğu göze çarpar. Asitklorürlerle esterleşme reaksiyonları ise nisbeten hızlıdır [129].

Halkalaşma reaksiyonları sonunda elde edilen **A1** bileşiği için; FT-IR ( $\gamma$   $\text{cm}^{-1}$ ) spektrumuna bakıldığında  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmesi gereken  $-\text{C-SH}$  bandı kaybolması ve  $680 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-S-C gerilmesi,  $1719 \text{ cm}^{-1}$  O=C-S tiyoesterkarbonil piki,  $1635 \text{ cm}^{-1}$  aromatik C=C gerilmesi,  $2171 \text{ cm}^{-1}$  1,2 di süstitüe benzen overtonları gözlenmiş,  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$  spektrumuna bakıldığında  $\delta$  2.45 ppm (2H, t, C-S-C=O), 3,20 ppm (4H, t, -C-C-S-C=O), 3.50 ppm (2H, s, C-O-C) 7.80 (H, s, benzen) pikleri gözlenmiştir. Aynı biçimde **A2** bileşiği için de; FT-IR ( $\gamma$   $\text{cm}^{-1}$ ) spektrumuna bakıldığında  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmesi gereken  $-\text{C-SH}$  bandı kaybolması ve  $680 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-S-C gerilmesi,  $1716 \text{ cm}^{-1}$  O=C-S tiyoesterkarbonil piki,  $1634 \text{ cm}^{-1}$  aromatik C=C gerilmesi,  $2127 \text{ cm}^{-1}$  1,4 di süstitüe benzen overtonları gözlenmiş,  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$  spektrumuna bakıldığında,  $\delta$  2.62 ppm (2H, t, C-S-C=O),  $\delta$  3,6 ppm (2H, s, C-O-C)  $\delta$  4.25 ppm (4H, t, -C-C-S-C=O), 8.0 ppm (H, d, *o*-benzo), 8.9 ppm (H, d, *p*-benzo) pikleri gözlenmiştir. **A3** bileşiği için de; FT-IR ( $\gamma$   $\text{cm}^{-1}$ ) spektrumuna bakıldığında  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmesi gereken  $-\text{C-SH}$  bandı kaybolması ve  $680 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-S-C gerilmesi,  $1722 \text{ cm}^{-1}$  O=C-S tiyoesterkarbonil piki,  $1635 \text{ cm}^{-1}$  aromatik C=C gerilmesi,  $2168 \text{ cm}^{-1}$  1,3 di süstitüe benzen overtonları gözlenmiş,  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$  spektrumuna bakıldığında  $\delta$  2.42 ppm (2H, t, C-S-C=O), 3.4 ppm (2H, s, C-O-C) 4.1 ppm (4H, t, -C-C-S-C=O), 7.25 (H, s, *o*-benzo), 8 (H, d, *p*-benzo) 8.9 (H, d, *p*-benzo) pikleri gözlenmiştir. **A4** bileşiği için de; FT-IR ( $\gamma$   $\text{cm}^{-1}$ ) spektrumuna bakıldığında  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmesi gereken  $-\text{C-SH}$  bandı kaybolması ve  $680 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-S-C gerilmesi,  $1715 \text{ cm}^{-1}$  O=C-S tiyoesterkarbonil piki,  $1635 \text{ cm}^{-1}$  aromatik C=C gerilmesi,  $2172 \text{ cm}^{-1}$  1,2 di süstitüe benzen overtonları gözlenmiş,  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$  spektrumuna bakıldığında  $\delta$  3.45 ppm (2H, t, C-S-C=O), 4.20 ppm (2H, s, C-O-C), 7.40 (H, d, *o*-benzo), 7.60 (H, d, *p*-benzo) piklerinin gözlenmiştir. **A5** bileşiği için de; FT-IR ( $\gamma$   $\text{cm}^{-1}$ ) spektrumuna bakıldığında  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmesi gereken  $-\text{C-SH}$  bandı kaybolması ve  $680 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-S-C gerilmesi,  $1720 \text{ cm}^{-1}$  O=C-S tiyoesterkarbonil piki,  $1635 \text{ cm}^{-1}$  aromatik C=C gerilmesi,  $2173 \text{ cm}^{-1}$  1,4 di süstitüe benzen overtonları gözlenmiş,  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$  spektrumuna  $\delta$  3.35 ppm (2H, t, C-S-C=O), 4.20 ppm (2H, s, C-O-C), 7.80 (H, s, benzen) piklerinin gözlenmiştir. Ve **A6** bileşiği için de; FT-IR ( $\gamma$   $\text{cm}^{-1}$ ) spektrumuna bakıldığında  $2500 \text{ cm}^{-1}$  de gözlenmesi gereken  $-\text{C-SH}$  bandının kaybolması ve  $680 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-S-C gerilmesi,  $1720 \text{ cm}^{-1}$  O=C-S tiyoesterkarbonil piki,  $1634 \text{ cm}^{-1}$  aromatik C=C gerilmesi,  $2056 \text{ cm}^{-1}$  1,3 di

süstitüe benzen overtonları gözlenmesi, <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>) spektrumuna δ 3.80 ppm ( 2H, t, C-S-C=O), 4.10 ppm (2H, s, C-O-C), 7.25 (H, s, *o*-benzo), 7.80 (H, d, *p*-benzo) 8.30 (H, d, *p*-benzo) piklerinin gözlenmiştir. Bütün bu bulgular, sentezlenen bu altı bileşiği yapısal olarak tamamen doğrulamaktadır.

Sentezlenen bileşiklere ait erime noktaları, FT-IR ve <sup>1</sup>H NMR spektrumlarından hedeflenen bileşiklerin elde edildiği anlaşılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin yapısında bulunan fonksiyonel gruplar yönünden zengin olması (substitue benzen, thioester ve eter); bileşiklerin metal kompleksleşmelerinde ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılabileceği öngörülmektedir.

Yapılan çalışmanın ikinci bölümünde ise, sentezlenen bileşiklerin CA enzimi üzerinde etkileri araştırılmıştır. CA' nın fizyolojik önemi giriş bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi genel olarak metabolik CO<sub>2</sub> transportunun yanı sıra birçok dokuda H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarının birikiminde de önemli rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensi sayılabilir. Bu dokuların dışında histokimyasal yöntemlerle tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA enzimine rastlanmıştır [98-101].

Söz konusu enzimin farklı dokulara dağılmış birçok izoformu tesbit edilmiştir. Bunlarda CA-I ve CA-II ençok üzerinde çalışılan yapılarıdır. Özellikler hCA-II'nin inhibisyonu glaucoma hastalığının tedavisinde en eski, günümüzde ise en çok kullanılan yöntemdir. Bu amaçla birçok bileşik sentezlenmiş ve söz konusu enzim üzerinde inhibisyon etkileri saptanmıştır[103,105,106] Ancak sentezlenen bileşiklerin birçoğu önemli yan etkilere sahip olması, tedavide büyük bir olumsuzluğu ortaya çıkarmaktadır. Yan etkilerin önemli bir bölümü, sülfonamid türevlerinin diğer izoenzimlerle etkileşmesidir. Bunun için sadece bir izoenzimi spesifik bileşiklerin tasarlanması, glaucoma tedavisi için son derece önem arz etmektedir. Bu nedenle yeni bileşiklerin sentezi yıllardan beri araştırmaların ilgi alanlarından biri olmuştur ve olmayada devam etmektedir

Son yıllarda SA dışında CA izoenzimleri için farklı bileşiklerde sentezlenmiş ve etkileri araştırılmıştır [130,131]. Söz konusu çalışmada sülfonamidlere alternatif tiyocrown eter türevleri sentezlenmiştir.

Araştırmamızda kullanılan enzim olan karbonik anhidraz insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Bu amaçla Sepharose-4-B-L-tirozin-p-aminobenzosülfonamid kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir.

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B' nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite Jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinitejelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır [91]. Söz konusu jel kullanılarak hCAI ve hCAII izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCAI izoenziminin elüsyonu için; 1M NaCl / 22mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 6.3), hCAII için ise 0.1 M CH<sub>3</sub>COONa / 0.5 M NaClO<sub>4</sub> (pH = 5.6) elüsyon tamponları hazırlanmıştır [112].

Karbonik anhidrazın aktivite tayini CO<sub>2</sub>-Hidrataz adı verilen, Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi kullanılarak yapılmıştır [129]. Bu yöntemle, CO<sub>2</sub> molekülünün su ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> molekülünün H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonlarını ayırarak, ortamın pH' ını değiştirme süresi ölçülmektedir [116].

Araştırmamızda kullanılan bileşikler, A1 (1-2-DB-TTh-TK-28-Crown-8), A2 (1-4-DB-TTh-TK-32-Crown-8), A3 (1-3-DB-TTh-TK-30-Crown-8), A4 (1-4-DB-TT-TK-22-Crown-6), A5 (1-2 DB-TT-TK-26-Crown-6) ve A6 (1-3-DB-TT-TK-24-Crown-6) moleküllerinin hepsi hCAI enzimini inhibe ederken hCAII enzimini ise aktive ettiği saptanmıştır. Bu bileşiklerin hCAI enzimi için IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla

1.22 – 1.61 – 2.11 – 1.66 – 0.84 – 1.45 mM olarak tespit edilmiştir. En güçlü inhibitörün A5 olduğu bu değerlere bakılarak anlaşılmaktadır. A3' ün ise diğer tiyocrown eterlere nazaran daha zayıf bir inhibitör olduğu anlaşılmaktadır.

Bileşiklerin tamamının hCA-II'yi aktive etmesi son derece dikkat çekicidir. Çünkü, hCA-I ve hCA-II enzimlerinin aktif bölgelerinin belirli ölçüde benzerlik göstermesi söz konusu bileşiklerke tamamen farklı şekilde etkileşmesiyle bir çelişki ortaya çıkarmaktadır. Bu durum izoenzimlerin aminoasit dizilişlerinin farklılığıyla açıklanabilir. Aynı bileşiklerin enzimle aktif bölge dışında farklı gruparlada etkileştiği düşünülebilir. Ancak bu konuda daha güçlü ifadelerin kullanılabilmesi için mutlaka inhibisyon mekanizmalarının belirlenmesi gerekir.

Söz konusu bileşiklerin tarafımızdan ilk kez biyomoleküller üzerinde etkisinin araştırılması çalışması yapıldığı için, karşılaştırma için literatürde herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Fakat sülfonamidlerle kıyaslandığında zaman [103,105,106], hCA-I lere karşı ilgilerinin çok daha düşük olduğu görülmektedir.

Sentezlenen bileşikler doğal olarak glaucoma tedavisinde direkt bir katkı yapabileceğini söylemek mümkün değildir. Çünkü ilgili enzimi aktive etmektedir.

hCAII enzimi eritrositlerde, özellikle gözde bulunarak önemli fizyolojik fonksiyon göstermektedir. hCAII, göz içi sıvısının oluşmasında ve dolayısıyla göz tansiyonunun kontrolünde kritik bir enzimdir [93]. Bu enzim üzerine sentezlenen bileşikler beklenen aksine aktivasyon göstermişlerdir. Glaucoma hastalığı, yüksek göz içi basıncıyla ortaya çıkarak döşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidraz enziminin inhibisyonu ile gloucaomalı hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir [92]. Araştırmamızda sentezlenen bu altı bileşiğinde hCAI enzimini inhibe ederken hCAII yi aktive etmektedir, bu maddelerin kullanımı hCAII nin aktivitesini artırması, hastalar açısından çok ciddi sonuçlar doğurabilecek niteliktedir [102]. Ancak, araştırmamızda sentezlenen bileşiklerin sadece bir enzimi inhibe etmesi son derece önemli bir bulgudur. Çünkü, bu durumun sadece bir izoenzime spesifik bileşiklerin tasarlanmasında önemli katkılar sağlayacağını düşünmekteyiz.

Yüksek lisans olarak sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Esterleşme-Halka kapama yöntemiyle 6 farklı tiyocrown eter sentezi gerçekleştirilmiş ve yapıları detaylıca aydınlatılmıştır.
- Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-amino-benzosülfonamid kimyasal yapısına sahip jel kullanılarak, tek basamakta yüksek verimde hCA-I ve hCA-II izoenzimleri saflaştırılmıştır.
- Saflaştırılan izoenzimlerin, söz konusu bileşiklere afiniteleri araştırılmıştır.
- Sentezlenen bileşiklerin tamamı hCA-I enzimini inhibe ederken, hCA-II enzimini aktive etmiştir.
- Son olarak, söz konusu çalışmanın sadece bir izoenzime spesifik olması, ilaç sentezi için önemli katkılar sağlayacağı düşüncesindeyiz.



## 5. KAYNAKLAR

- [1] a) Ray, P.C. J.Am.Chem.Soc. 117, (1920), 1090.  
b) Ray, P.C. .Am.Chem.Soc. 121, (1922), 1279.  
c) Ray, P.C. J.Am.Chem.Soc. 123, (1923), 2174.
- [2] a) Bennett, G.M. J.Chem.Soc. 121, (1922), 2139.  
b) Bennett, G.M. J.Chem. Soc. 127, (1925), 910.
- [3] Meadow, J.R., Reid, E.E. J.Am.Chem.Soc. 56, (1934), 2177
- [4] Rosen, W., Busch, D.H. J.Am.Chem.Soc. 91, (1969), 4694
- [5] a) Black, D.St.C. McLean, I.A. Tetrahedron Lett. 23, (1969), 3961.  
b) Black, D.St.C. McLean, I.A.Aust.J.Chem. 22, (1969), 3961.  
c) Black, D.St.C. McLean, I.A.Aust.J.Chem. 24, (1971), 1401.
- [6] Frensch, V.K and Vogtle, F. Tet. Lett., 30, (1977), 2573.
- [7] Alberts, A.H. and Cram, D. F., J. Chem. Soc, Chem. Comm., 28, (1976), 958.
- [8] D. Pelissad and R. Louis, Tet. Lett., 45, (1972), 4589
- [9] Chiu, J. J., Grewal, R. S., Hart, H. and Ward, D. L., J. Org. Chem., 58, (1993),1553
- [10] Bradshaw, J. S., Maas, G. E., Izatt, R. M. and Christensen, J. J. Chem. Rev., 79, (1979), 37.
- [11] Izatt, R.M., Lamb, J. D., Maas, G. E., Asay, R. E., Bradshaw, J. S. and Christensen, J. J., J. Am. Chem. Soc. 99, (1977), 2365.
- [12] Bradshaw, J. S., Hansen, L. D., Nielsen, S. F., Tompson, M. D., Reeder, R. N., Izatt, R.M., et al. J. Chem. Soc. Chem. Comm., 874, (1975), 2586.
- [13] Bradshaw, J. S., Bishop, C. T., Nielsen, S. F., Asay, R. E., Mashidas, D. R., Flanders, E.D., et al. J. Chem. Soc., Perkin I, 25, (1976),2568.
- [14] Asay, R. E., Bradshaw, J. S., Nielsen, S. F., Tompson, M. D., Snow, J. W., Mashidas, D. R.K. et al. J. Heterocyclic Chem., 14, (1977), 85
- [15] Maas, G. M., Bradshaw, J. S., Izatt, R. M. and Christensen, J. J., J. Org. Chem.,

42, (1977), 3937

- [16] Tompson, M. D., Bradshaw, J. S., Nielsen, S. F., Bishop, C. T., Cox, F. T., Fore, P. E., et al. *Tetrahedron*, 33, (1977), 3317.
- [17] Fore, P. E., Bradshaw, J. S. and Nielsen, S. F., *J. Heterocyclic Chem.*, 15, (1978), 269.
- [18] Bradshaw J. S. and Tompson, M. D., *J. Org. Chem.*, 43, (1978), 2456.
- [19] Izatt, R. M., Lamb, J. D., Asay, R. E., Maas, G. E., Bradshaw, J. S., Christensen, J. J., et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 99, (1977), 6134.
- [20] Matsushima, K., *Tet. Lett.*, 36, (1979), 3445.
- [21] Edema, J. J., Buter, J., Kellogg, R. M., Spek, A. L. and Bolhuis, F. V., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 12, (1992), 1558.
- [22] Adams, R.D., Falloon, S.B., *Chem. Rev.* 95, (1995), 2587.
- [23] (a) Adams, R.D., Falloon, S.B., *J. Am. Chem. Soc.* 116, (1994), 10540.  
(b) Adams, R.D., Cortopassi, J.E., Falloon, S.B., *Organometallics* 14, (1995), 1748.  
(c) Adams, R.D., Falloon, S.B., *Organometallics* 14, (1995), 4594.  
(d) Adams, R.D., Falloon, S.B., Perrin, J.L., Queisser, J.A., Yamamoto, J.H., *Chem. Ber.* 129, (1996), 313.
- [24] Adams, R.D., Queisser, J.A., Yamamoto, J.H. *Organometallics* 15, (1996), 2489.
- [25] Adams, R.D., Perrin, J.L., Queisser, J.A., Wolfe, J.B., *Organometallics* 16, (1997), 2612.
- [26] (a) Cooper, S.R. in S.R. Cooper (Ed.), *Crown Compounds, Toward Future Applications*, VCH, New York, 15, (1992), 458.  
(b) Blake, A.J., Schroder, M., *Adv. Inorg. Chem.* 1, (1990) 35.  
(c) Adams, R.D., Falloon, S.B., McBride, K.T., *Organometallics* 13, (1994), 4870.  
(d) Adams, R.D., Falloon, S.B., McBride, K.T., Yamamoto, J.H., *Organometallics* 14, (1995), 1739.  
(e) Adams, R.D., Layland, R., McBride, K.T., *Organometallics* 15, (1996), 5425.
- [27] (a) Brunner, H., Zettlmeier, W., *Handbook of Enantio selective Catalysis*, VCH, Weinheim, Germany, 58, (1993), 256.  
(b) Knowles, W.S., *J. Chem. Ed.* 63, (1986), 222.  
(c) Bosnich, B., Fryzuk, M.D., *Top. Inorg. Orgnm. Stereochem.* 12, (1981), 119.
- [28] A.F. Hill, J.D.E.T. Wilton-Ely, *Organometallics* 16, (1997), 4517.

- [29] Takagi, M., Ueno, K., In, Vogtle, F., Weber, E., editors, topics in current chemistry, host guest complex chemistry III. Springer, Berlin, 39, (1984). 558.
- [30] Katayama, Y., Nita, K., Ueda, M., Nakamura, H., Takagi, M., synthesis of Chromogenic crown ethers and liquid–liquid extraction of alkali metal ions. *Anal Chim Acta* 173, (1985),209.
- [31] Kaifer, A., Gustowski, D.A., Echegoyen, L., Gotto, V.J., Schultz, R.A., Cleary TP, et al. Electrochemical switching of crown ethers survey of cation binding by neutral reduced forms of one-two- armed carbon- and nitrogen-pivot crown ethers. *J Am. Chem Soc* 80, (1958), 4596.
- [32] Kimura, K., Tanaka, M., Kitazawa, S., Shono, T., Highlylithium selective crown ether dyes for extraction photometry. *Chem Lett* 8, (1985), 1239.
- [33] Bartch, R.A., Czech, B.P., Kang, S.I., Stewart, L.E., Walkowiak, W., Charewicz, W.A., Heo, et al. High lithium selectivity in competitive alkali metal solvent extraction by lipophilic crown carboxylic acids. *J Am. Chem. Soc.* 107, (1985), 4997.
- [34] Nakashima, K., Yamawaki, Y., Nakatsuji, S., Akiyama, S., Kaneda, T., Misumi, S. Complexation of crowned dinitrophenylazophenol with alkali alkaline earth metal ions and its application to the colorimetric determination of Rb(I) Cs(I). *Chem. Lett.* 8, (1985), 1415.
- [35] Bubnis, B.P., Pacey, G.E., Alkali metal ion extraction using crown ethers possessing a chromogenic group. *Tetrahedron Lett* 25, (1984), 1107.
- [36] Cooper, S.R. *Acc. Chem.Res.* 21, (1988), 141
- [37] Pedersen, C.J., *J. Am. Chem. Soc.* 89, (1967), 7017.
- [38] Izatt, R.M., Pawlak, K., Bradshaw, J.S., Bruening, R.L., *Chem. Rev.* 91, (1991), 1721
- [39] Craig, A.S., Katakay, R., Matthews, R.C., Parker, D., Ferguson, G., Lough, A., Adams, H., Bailey, N. Schneider, H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (1990) 1523.
- [40] Bradshaw, J.S., Izatt, R.M., *Acc. Chem. Res.* 30, (1997), 338.
- [41] Krylova, K., Kulatilleke, C.P., Hegg, M.J., Salhi, C.A., Ochrymowycz, L.A., Rorabacher, D.B., *Inorg. Chem.* 38, (1999), 4322.
- [42] Van de Water, L.G.A., Driessen, W.L., Glenny, M.W., Reedijk, J., Schröder, M., *React. Funct. Polym.* 51, (2002), 33.
- [43] Van de Water, L.G.A., Ten Hoonte, F., Driessen, W.L., Reedijk, J.,

- Sherrington, D.C., *Inorg. Chim. Acta* 303, (2000), 77.
- [44] Caltagirone, C., Bencini, A., Demartin, F., Devillanova, F.A., Garau, A., Issia, F., Lippolis, V., Mariani, P., Papke, U., Tei, L., Verani, G., *Dalton Trans.* 54, (2003) 901.
- [45] Blake, A.J., Bencini, A., Caltagirone, C., De Flippo, G., Dolci, L.S., Garau, A. F., Lippolis, V., Mariani, P., Papke, U., Tei, L., Verani, G., *Dalton Trans.* 65, (2004), 2771
- [46] Love, J.B., Vere, J.M., Glenney, M.W., Blake, A.J., Schröder, M., *Chem. Commun.* 25, (2001) 2678.
- [47] Glenney, M.W., Blake, A.J., Wilson, C., Schröder, M., *Dalton Trans.* 45, (2003) 1941.
- [48] Gerber, D., Chongsawangvirod, P., Leung, A.K., Ochrymowycz, L.A., *J. Org. Chem.* 42, (1977), 2644.
- [49] Butter, J., Kellog, R.M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 16, (1980), 466.
- [50] Blower, P.J., Cooper, S.R., *Inorg. Chem.* 26, (1987), 2009.
- [51] Butter, J., Kellog, R.M., Van Bolhuis, M., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 89, (1991), 910.
- [52] Champness, N.R., Bruce, D.W., Schröder, M., *New J. Chem.* 23, (1999), 671
- [53] Liu, R.C.W., Fung, P.S., Xue, F., Mak, T.C.W., Ng, D.K.P., *J. Chem. Res.* 8, (1998), 414
- [54] Pavlishchuk, V.V., Strizhak, P.E., *Chem. Heterocycl. Comp.* 25, (1989), 553.
- [55] Tanaka, M., Nakamura, M., Ikeda, T., Ikeda K., Ando, H., Shibutani, Y., Yajima, S., Kimura, K., *J. Org. Chem.* 66, (2001), 7008.
- [56] (a) Black, D.St.C., McLean, I.A., *Aust. J. Chem.* 24, (1971), 1401  
(b) Black, D.St.C., McLean, I.A., *Tetrahedron Lett.* 45, (1969), 3961  
(c) Shinkai, S., Shigematsu, K., Honda, Y., Manabe, O., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 57, (1984), 2879.
- [57] Selmann, D., Zapf, L., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 23, (1984), 807.
- [58] Lachkar, M., Guillard, R., Atmani, A., de Cian, A., Fischer, J., Weiss, R., *Inorg. Chem.* 37, (1998), 1575
- [59] Blake, A.J., Danks, J.P., Harrison, A., Parsons, S., P. Schooler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 25, (1998), 2335.

- [60] Gryko, D.T., Gryko, D., Jurczak, J., *Synlett.* 8, (1999), 1310.
- [61] Witulski, B. *Synlett.* 8, (1999), 1223
- [62] a) Pedersen, C.J. *J. Org. Chem.* 36, (1971), 254.  
 b) Pedersen, C.J.; Frensdorff, H.K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 11, (1972), 649
- [63] Review, Bradshaw, J.S. Hui, J.Y.K. *J. Heterocycl. Chem.* 11, (1974), 649
- [64] Ochrymowycz, L.A.; Mak, C.P., Michna, J.D. *J. Org. Chem.* 39, (1974), 2079
- [65] Butter, J., Kellogg, R.M., *J. Org. Chem.* 46, (1981), 4481
- [66] J Butter, J., Kellogg, R.M., *J. Org. Synth.* 65, (1987), 150
- [67] Wolf, R.E. Jr., Hartman, J.R. Ochrymowicz, L.A. Copper, S.R. *Inorg. Synth.* 25, (1989), 122.
- [68] a) Gisin, B.F., *Helv. Chim. Acta*, 56, (1973), 1476.  
 b) Wang, S.S., Gisin, B.F.; Winter, D.P.; Makofske, R.; Kulesha, I.D.; Tzougraki, C., Meienhofer, J. *J. Org. Chem.* 42, (1977), 1286
- [69] Strijtveen, B., Kellogg, R.M. *J. Org. Chem.* 51, (1986), 3664
- [70] Van Keulen, B.J.; Kellogg, R.M. Piepers, O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 16, (1979), 285.
- [71] Kruizinga, W.H., Kellogg, R.M., *J. Am. Chem. Soc.* 103, (1981), 5183
- [72] Vriesema, B.K., Buter, J.; Kellogg, R.M. *J. Org. Chem.*, 49, (1984), 110
- [73] Vögtle, F., Klieser, B., *Synthesis* 25, (1982), 294.
- [74] a) Reinhoudt, D.N., De Jong, F., Thomasen, H.P.M. *Tetrahedron Lett.* 25, (1979), 2067.  
 b) Van der Ley, M., Oosterink, H.J., Hall, R.H., Reinhoudt, D.N. *Tetrahedron* 37, (1981), 3661.
- [75] a) Illuminati, G., Mandolini, L. *Acc. Chem. Res.* 14, (1981), 95.  
 b) Cacciapaglia, R., Mandolini, L. *Chem. Soc. Rev.* 15, (1993), 221.
- [76] Illuminati, G. Mandolini, L.; Masci, B. *J. Am. Chem. Soc.* 105, (1983), 555
- [77] Mandolini, L. Masci, B. *J. Am. Chem. Soc.* 106, (1984), 168.
- [78] Cooper, S.R., Rawle, S.C., *Structur Bonding* 1, (1990), 72.
- [79] Loeb, S.J., Shimizu, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 25, (1991), 1119.

- [80] Blake, A.J., Pasteur, E.C., Reid, G., Schroeder, M. *Polyhedron* 45, (1991), 1545.
- [81] J.Butter, R.M. Kellogg, *J. Org. Chem.* 46, (1987), 4481
- [82] Edama, J.J.H., Stock, H.T., Buter, J., Kellogg, R.M., Bolhuis, F. Van, Meetsma, A., Kooijman, H., Spek, A.L. Submitted for publication in *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 15, (2001), 548
- [83] Truce, W.E., Birum, G.H., McBee, E.T. *J. Am. Chem. Soc.* 74, (1952), 3594
- [84] Grossert, J.S., Langler, R.F. *Can. J. Chem.* 55, (1997), 407
- [85] Bloch, I., Hohn, F. *Chem. Ber.* 55, (1921), 54.
- [86] Mann, F.G., Pope, W.J. *J. Chem. Soc.* 123, (1923), 1172.
- [87] Edama, J.J.H., Buter, J., Kellogg R.M. to be published in *Inorg. Chem.* 53, (1998), 1548.
- [88] de Groot, B., Loeb, S.J. *Inorg. Chem.* 28, (1989), 3573.
- [89] de Groot, B., Loeb, S.J. *Inorg. Chem.* 30, (1991), 3103.
- [90] Crown ethers with solely oxygen heteroatoms in their cyclic backbone are Named oxocrown ethers here, as to distinguish them from thiocrown ethers. *Inorg. Chem.* 65, (1996), 4583.
- [91] Seyedi, S. M., Shadkam, M. and Ziafati, A. (2005) 'A Convenient Synthesis of New Macrocyclic Thioether-Esters and Ether-Esters: Extraction Properties of These Esters for Alkali, Alkaline Earth, and Transition Metal Cations', *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. 8, (1960), 180
- [92] a) Cacciapaglia, R., Mandolini, L. *Chem.Soc.Rev.* 65, (1993), 221.  
b) DeSousa Healy, M., Rest, A.J. *Adv.Inorg.Chem.Radiochem.* 1, (1978), 21.
- [93] Schrauzer, G.N., Ho, R.K.Y.; Murillo, R.P. *J.Am.Chem.Soc.* 92, (1970), 3508.
- [94] Smith, R.J., Admans, G.D., Richardson, A.P.; Küppers, H.J., Blower, P.J. *J.Chem.Soc., Chem. Commun.* 54, (1991), 475.
- [95] a) Selmann, D., Frank, P. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 25, (1986), 1107.  
b) Selmann, D., Frank, P.; Knoch, F. *J.Organomet.Chem.* 339, (1988), 345.
- [96] Selmann, D. Kleine-Kleffmann, U *J. Organomet. Chem.* 247, (1983), 307.
- [97] Çiçek, B., Çakır, Ü. and Erk, Ç. " The Determination of Crown-Cation

Complexation Behavior in Dioxane /Water Mixtures by Conductometric Studies"  
Polymers for Advanced Technologies 9, (1998),1.

- [98] Supuran, C.T. and Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr. Med. Chem.*, 1, (2001), 61.
- [99] Wistrand, P. J., "The Importance of Carbonic Anhydrase B and C for the Unloading of CO<sub>2</sub> by the Human Erythrocyte", *Acta Physiol. Scand.*, 2, (1981), 343.
- [100] Holmes, R.,S., "Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidence for A, B and C Isozymes in Avian and Mammalian Tissues", *Eur. J. Biochem.*, 78, (1977), 511.
- [101] Chegwiddden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., "In the Carbonic Anhydrase New Horizons", *Birkhauser Verlag, Basel*, 65, (2000), 343.
- [102] Arslan, O., "Glaucoma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlarinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması", *Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D, Erzurum*, (1994)
- [103] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemiran H., Kührevioğlu, İ.Ö., "A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography", *Turk J. Med Sci.*, 26, (1995), 163.
- [104] Hewett-Emmett, D. "In the Carbonic Anhydrase New Horizons", *Birkhauser Verlag, Basel*, 29, (2000), 67
- [105] Winum, J., Y., Innocenti, A., Nasr, Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., and Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Inhibition of Cytosolic / tumor associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, IX, V and XII with N-hydroxy sulfonamides a New Zinc-Binding Function In the Design inhibitors" *Elsevier Science*, 15, (2005), 2353.
- [106] Winum, J., Y., Innocenti, A., Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., Gagnard, V., and Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Interaction of Isozymes I, II, IV, V and IX with Organic Phosphates and Phosphonates" *Elsevier Science*, 15, (2005), 1683.
- [107] Deutsch, H.F., "Carbonic Anhydrase", *Int. J. Biochem.*, 19, (1987), 100.
- [108] Geers, C., and Gros., G., "Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle", *Physiological Reviews*, 80, (2000), 681.
- [109] Keha, E. E., Kūfrevioğlu, Ö.İ., "Biyokimya", *Derya Kitabevi, Trabzon*, 23, (1993), 34
- [110] Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., La Nove, K.F., and Lynch, C.J.,

- “Differentiation-Dependent Expression of CA and the Role of Carbonic Anhydrase Isozymes in Pyruvate Carboxylation in Adipocytes”, *FASEBJ.*, 10, (1996), 481.
- [111] Lakkis, M. M., Bergenhem, N.C.N., and Tashian, R.E., “Expression of Carbonic Anhydrase of Mouse VII in E. Coli and Demonstration of its CO<sub>2</sub> Hydratase Activity”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, (1996), 268
- [112] Mastrolorenzo A., Zuccati, G., Massi, D., Gabrielli, M.G., Casini, A., Scossafava, A., Supuran C.T., “Immunohistochemical study of carbonic anhydrase isozymes in human skin” *European Journal of Dermatology*, 13, (2003), 440.
- [113] Bayram, T., “Köpek Eritrositlerinden Afinitive Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D (2002)
- [114] Sugrue, M. F., “The Preclinical Pharmacology of Dorzolami dehydrochloride, Topical CA Inhibitor”, *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12,(1996), 363.
- [115] Tripp, B. C., Smith, K., and Ferry, J. G., “Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme”, *The Journal of the Biological Chemistry*, 52, (2001), 48615.
- [116] Maren, T. H., Conroy C. W., Wynns, G.C. and Godman, D.R., “Renal and Cerebrospinal Fluid Formation Pharmacology of a High Molecular Weight Carbonic Anhydrase Inhibitor” *J. Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280,(1997),98.
- [117] Svastova, E., Hulikova, A., Casini A., Rafajova, M., Scozzafava, A. and Supuran, C., T., “Hypoxia Activates the Capacity of Tumor Associated Carbonic Anhydrase IX to Acidify Extracellular pH”, *FEBS*, 577, (2004), 439.
- [118] Türeci, Ö., Mahin, U., Vollmar, E.etal. Human Carbonic anhydrase XII: cDNA Cloning, Expression and Chromosomal Localization of a Carbonic Anhydrase Genethatis Over expressed in Some Renal Cell Cancers” *Proc. Atl Acad. Sci. USA*, 95, (1998), 7608.
- [119] Fiore, A., De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini A., Scozzafava, A. and Supuran, C., T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors. Zonisamide is an Active Inhibitor of the Cytosolic Isozyme II and Mitochondrial Isozyme V Solution and X-Ray Crystallographic Studies”, *Elsevier Science*, 15, (2005), 2315.
- [120] Kaiser, E.T., and Lo, K. W., “The Carbonic Anhydrase Catalysed Hydrolysis of 2-Hydroxy-5-Nitrotoluen Sulfonic Sulfate”, *J.Am. Chem. Society.*, 1, (1969), 4912.



- [121] Jabusch, J. R. and Deutsch, H. F., "Localization of the Lycines Actlated in Ubiquitin Reacted with p-Nitrophenyl Acetat", Arch. Biochem. Bioophys., 238, (1989),170
- [122] Özensoy, Ö., "Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması "Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Kimya A.B.D (2000)
- [123] Fiore, A. ,De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini A., Scozzafava, A., and Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. X-Ray Crystal Structure of a Benzene sulfonamide strong CA II and CA IX Inhibitor Bearing a Pentauoro phenyl aminothioureido Tail in Complex with Isozyme II", Elsevier Science, 15, (2005),1937.
- [124] Voet's Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc. 1, (1990), 156
- [125] Stams, T., Chen, Y., Bariack Sjodin, P. A., Hurt J. D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D. W., Protein Sci. 7, (1998), 556
- [126] Wilbur, K. M. and Anderson, N. G., "Electrometric and Colrimetric Determination of Carbonic Anhydrase", J.Biol.Chem., 176, (1948), 14770
- [127] Cuatrecasas, P., "Protein Purification by Affinity Chromatography, Derivatizations of Agorose and Polyacrylamide Beads", J.Biol.Chem. 245, (1970), 3059.
- [128] Beyaztaş, S., "Bazı Gelişim Düzenleyici Maddelerin, Paraoksonaz ve Karbonik Anhidraz İzoenzimler Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D. (2006)
- [129] Yıldız, A. "Okso-tiyo Crown Eterlerin Sentezi ve Karakterizasyonu" Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D (2008)
- [130] Bayram, T., Arslan, O., Ugras, H. I., Cakir, U. and Ozensoy, O. 'Purification of carbonic anhydrase from dog erythrocytes and investigation of in vitro inhibition by various compounds', Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 22:6, (2007), 739 – 744
- [131] Basaran, I., Sinan, S., Cakir, U., Bulut, M., Arslan, O. and Ozensoy, O. 'In vitro inhibition of cytosolic carbonic anhydrases I and II by some new dihydroxycoumarin compounds', Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 23:1, (2007), 32 - 36