T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MORFOLİN GRUBU İÇEREN YENİ SÜLFONAMİT BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ ve ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Seda TÜRKOĞLU

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2018

Doç. Dr. Mustafa DURGUN danışmanlığında, Seda TÜRKOĞLU'nun hazırladığı **"Morfolin Grubu İçeren Yeni Sülfonamit Bileşiklerinin Sentezi ve Antikanser Etkilerinin İncelenmesi''** konulu bu çalışma 29/06/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr.Mustafa DURGUN …….

Üye : Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ …….

Üye : Doç. Dr. Gülay ZENGİN …….

Bu Tezin Kimya Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALGIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 12167

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 3
2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi 3
2.2.1. Kanser ilişkili CA'lar 5
2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Etki Mekanizmsaı 5
2.4. Antitümör Olarak Sülfonamitler 8
3. MATERYAL ve YÖNTEM 11
3.1. Materyal 11
3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler 11
3.1.2. Kullanılan kimyasallar 11
3.1.3. Kullanılan cihazlar 12
3.2.Yöntem 13
3.2.1. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (MMH-1) sentezi 13
3.2.2. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (MMH-2) sentezi 14
3.2.3. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (S-1) sentezi 15
3.2.4. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (S-2) sentezi 16
3.2.5. Biyolojik çalışma 17
3.2.5.1. Hücreler ve kültür koşulları 17
3.2.5.2. Bileşiklerin uygulanması ve sitotoksik etkinliklerinin saptanması 17
3.2.5.3. MTT hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi 18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 19
4.1. Sentezlenen Maddelerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması 19
4.1.1. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (MMH-1) 19
4.1.2. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (MMH-2) 20
4.1.3. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (S-1) sentezi 21
4.1.4. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (S-2) 23
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Çalışmaları 25
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 27
KAYNAKLAR 29
ÖZGEÇMİŞ 32
EKLER 33
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT-IR Spektrumları 33
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin ^{1}H NMR Spektrumları 35
EK 3 Sentezlenen Bileşiklerin ^{13}C NMR Spektrumları 37
EK 4 Sentezlenen Bileşiklerin LC-MS/MS Spektrumları 39

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MORFOLİN GRUBU İÇEREN YENİ SÜLFONAMİT BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ ve ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Seda TÜRKOĞLU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa DURGUN
Yıl: 2018, Sayfa :39

Bu çalışmada; birinci basamakta; sırasıyla, sülfanilamit (4-aminobenzensülfonamit) ve 4-(2-aminoetil)benzensülfonamit ile bazik koşullarda (piridin) 2-bromopropionilbromit'in reaksiyonu sonucu 2-bromo-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit **(MMH-1)** ve 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(MMH-2)** sentezlenmiştir. İkinci basamakta; sırasıyla, 2-bromo-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit (MMH-1) ve 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (MMH-2) ile bazik koşullarda (piridin) morfolin'in reaksiyonu sonucu 2-morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit **(S-1)** bileşiği ve 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(S-2)** bileşiği sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları FT-IR, 1H NMR, 13C NMR, Kütle spektroskopisi ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatılmıştır. Çalışmada kullanılan bileşiklerin ve kemoterapik maddenin (5-Fu), kanser ve normal hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi de incelenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER : Sentez, spektroskopi, karbonik anhidraz inhibitörleri, sülfonamit, antikanser

ABSTRACT

MSc Thesis

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF ANTICANCER EFFECTS OF NEW SULFONAMIDE COMPOUNDS CONTAINING MORPHOLINE GROUP

Seda TÜRKOĞLU

HarranUniversity
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa DURGUN
Year: 2018, Page: 39

In this study; in the first step; the 2-bromo-N- (4-sulfamoylphenyl) propanamide **(MMH-1)** and 2-bromo-N-(4-sulfamoylphenethyl)propanamide **(MMH-2)** were synthesized by the reaction of 2-bromopropionylbromide with sulfanilamide (4-aminobenzenesulphonamide) and 4- (2-aminoethyl) benzenesulfonamide in basic condition (pyridine), respectively. In the second step; the 2-morpholino-N-(4-sulfamoylphenyl)propanamide **(S-1)** compound and 2-morpholino-N-(4-sulfamoylphenethyl)propanamide **(S-2)** were synthesized by the reaction of 2-bromo-N- (4-sulfamoylphenyl) propanamide **(MMH-1)** and 2-bromo-N-(4-sulfamoylphenethyl)propanamide **(MMH-2)** with morpholine in basic condition (pyridine), respectively. The structures of the obtained compounds were clarified by FT-IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, mass spectroscopy and elemental analysis methods. The cytotoxic effect of the compounds used in the study and the chemotherapeutic agent (5-FU), cancer and normal cells was also examined.

KEY WORDS: Synthesis, spectroscopy, carbonic anhydrase inhibitors, sulfonamide, anticancer

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında ve tüm aşamasında bilimsel bilgi, beceri ve deneyimleri ile her türlü desteği büyük bir özveri ile gösteren ve çok emeği geçen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa DURGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elde edilen bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki Sitotoksisite etkilerini inceleyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU'ya teşekkür ederim. Tez çalışmalarım boyunca teşvik edip, desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme de tüm kalbimle teşekkür ederim.

Ayrıca bize bu çalışmamız da maddi olarak destekte bulunan HÜBAK' a teşekkürlerimi sunuyorum.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. hCA II'nin aktif kısmının uygun geometrik şekli……..……4
Şekil 2.2. Karbonik anhidraz inhibitör mekanizmasının şematik gösterimi (A: Tetrahedral Yapı – Yerdeğiştirme; B: Trigonal-bipramit Yapı – Katılma)…….……6
Şekil 3.1. MMH-1 bileşiğinin sentezi……...13
Şekil 3.2. MMH-2 bileşiğinin sentezi……..……14
Şekil 3.3. S-1 bileşiğinin sentezi……..……15
Şekil 3.4. S-2 bileşiğinin sentezi……...…16

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4. 1. Bileşiklerin hücreler üzerindeki IC_{50} (µg/ml) değerleri. 26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

LC-MS	Sıvı Kramotografisi - Kütle Spektroskopisi
THF	Tetra Hidrofuran
$CHCl_3$	Kloroform
CH_2Cl_2	Diklorometan
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
FT-IR	Infrared Spektroskopisi
GİB	Göz İçi Basıncı
hCA	Human Carbonic Anhydrase
IC_{50}	Enzimin %50'sini İnhibe Eden İnhibitörün Molar Konsantrasyon
KAE	Karbonik Anhidraz Enzimi
KAİ	Karbonik Anhidraz İnhibitör
TLC	Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
TEA	Tri Etil Âmin
4AEBS	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide

1. GİRİŞ

Sülfonamitler, $-SO_2NH_2$ grubu içeren organik bileşikler olup, antimikrobiyal özellik gösteren antibakterial aktiviteye sahip bileşiklerdir (Domagk, 1935). Sülfonamidlerin keşfi kemoterapötik ajanların en ilginç döneminin başlangıcı olmuştur. (Cribb ve ark., 1996). 1935 yılında prontosil adlı boyanın in vivo olarak aktif bir bileşik olan süfanilamid'e metabolize olarak farelerdeki streptokok enfeksiyonlarını önlediği bulunmuştur. Böylece sülfonamidler insanlarda sistemik bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi için kullanılan ilk kemoterapötikler olma ünvanını almışlardır (Carey, 2003). 1935 yılından bugüne kadar, biyolojik aktivite özelliğinin iyileştirilmesi amacına yönelik olarak, daha etkili ve daha az toksisite olan çeşitli türevde sülfonamitler sentezlenmiştir.

Sülfonamid grubu, biyolojik açıdan aktif moleküllerde bulunan bir farmakofor olarak düşünülmektedir. $-SO_2NH_2$ fonksiyonel grubuna farklı grup ve sübstitüentler takılarak elde edilen yeni sülfonamitler farklı enzimler için inhibitör özelliği göstermekte ve birçok hastalığın tedavisi için kullanılmaktadır. Örnek olarak, karbonik anhidraz inhibitörleri olarak asetazolamit, dorzolamit bileşikleri (Becker, 1954; Maren, 1995), HIV-I *aspartil proteas* inhibitörü olan ve AIDS hastalığının tedavisinde kullanılan Amprenavir bileşiği (Adkins ve Faulds, 1998), Romatoid artrit (eklem rahatsızlığı) tedavisinde kullanılan Celecoxib bileşiği (Penning ve ark., 1997) halen ilaç olarak (sülfonamit türevleri halinde) kullanılmaktadır. Ayrıca sülfonamit türevleri bakteriyel enfeksiyonlar, hipertansiyon ve gut önlenmesi ve tedavisinde, antitümör, ağrı kesici, epilepsi, antifungal, antiülser, diüretik ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Brzozowski ve ark., 2011; Rami ve ark., 2011; Isık ve Özdemir Kocak, 2006). Bu bileşikler, aynı zamanda önemli bir sitosolik izoenzim I ve II inhibitörleridir (Pastorekova, 2004).

Yapılan bu çalışmanın ilk aşamasında sülfanilamit (4-Aminobenzen sülfonamit) ile 2- Bromopropionil bromitin reaksiyona girmesi sonucu **(MMH-1)** (2-

Bromo –N- (4 –Sülfamoil fenil) propanomit bileşiği sentezlenmiştir. Yine 2-Bromopropionil bromit ile 4-(2-aminoetil)benzen sülfonamitin tepkimeye girmesiyle **(MMH-2**) bileşiği sentezlenmişitr. Çalışmanın ikinci aşamasında sentezlenen (**MMH-1)** bileşiği bazik ortamda morfolin ile tepkimeye girerek 2-morfolino-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit **(S-2)** bileşiği sentezlenmiştir. (**MMH-2)** bileşiği ise bazik ortamda morfolin ile tepkimeye girerek 2-morfolino-N-(4-sülfamoilfenetil)propanamit **(S-2)** sentezlenmiştir. Sentezlenen **(MMH-1)**, **(MMH-2)**, **(S-1)** ve **(S-2)** bileşiklerinin yapıları FT-IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, Kütle spektroskopisi ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatılmıştır

Ayrıca, Pozitif kontrol olarak kullanılan kemoterapik madde 5-Fu (5-florourasil) ve elde edilen bileşiklerin PC3 *(İnsan Prostad Kanseri Hücre Hattı),* HT-29 *(İnsan Kolon Kanser Hücre Hatları),* HeLa *(İnsan Servikal (Rahim Ağzı) Kanser Hücre Hatları),* DLD-1 *(İnsan Kolon Kanser Hücre Hatları),* ECC-1 *(İnsan Rahim İçi Kanser Hücre Hatları),* DU-145 *(İnsan Prostad Kanseri Hücre Hattı),* PNT1-A *(Normal Prostad Epitel Hücre Hattı),* HEK-293 *(Normal İnsan Emriyonik Böbrek Hücre Hattı) üzerindeki* sitotoksik etkisi MTT metoduyla ölçülmüştür.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Şu anda kliniklerde karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılan asetazolamit ve dorzolamit sülfonamit türevleridir. Ayrıca AIDS hastalığının tedavisinde kullanılan Amprenavir bileşiği (Adkins ve Faulds, 1998), Romatoid artrit (eklem rahatsızlığı) tedavisinde kullanılan Celecoxib bileşiği (Penning ve ark., 1997) halen ilaç olarak (sülfonamit türevleri halinde) kullanılmaktadır.

Ayrıca sülfonamit türevleri antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, antiülser, diüretik ilaçların gelişmesinde yol gösterici ve antibiyotik olarak halen kliniklerde kullanılmaktadır. Tümor tedavisinde de halen klinik denemelerde sülfonamit türevleri olan asetazolamit, methazolamit, ethoxazolamit, diklorofenamit, dorzolamit ve brinzolamit kullanılmaktadır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Isık ve Özdemir Kocak, 2006; Rami ve ark., 2011). Sülfonamitler, antibakteriyal ajanlar olarak dünyada çok yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca sentezlenmiş olan sülfonamit türevlerinin kompleksleri de yapılmıştır. Bu konu ile de ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (Arslan, 2001; Ozbek ve ark., 2007).

2.2. Karbonik Anhidraz Enzimi

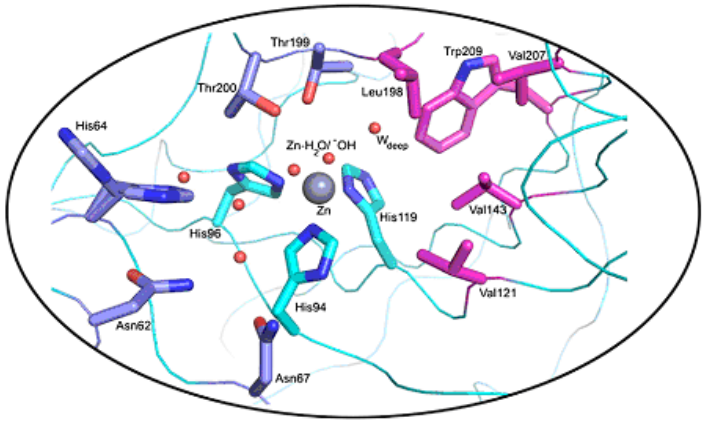
Karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1) enzimi ilk defa 1933 yılında Roughton ve Meldrum tarafından kanın eritrositlerinde bulunmuştur. Karbonik anhidraz enzimi Zn(II) tipi enzimlerinden olup, CO_2 nin hidratasyonunda çift yönlü etki yapar ve CO_2' yi bikarbonat iyonuna dönüştürür (Denklem 2.1) (Maren, 1967; Coleman, 1998).

$$CO_2 + H_2O \overset{CAE}{\rightleftharpoons} H_2CO_3 \overset{CAE}{\rightleftharpoons} HCO_3^- + H^+ \qquad (2.1)$$

CO_2 difüzyonla kırmızı kan hücrelerine geçtiğinde kırmızı kan hücrelerinde bulunan bu enzim sayesinde CO_2 hızlı biçimde karbonik asite dönüşür. Karbonik asit ise proton (H^+) ve bikarbonat (HCO^-_3) iyonlarına ayrılarak yeniden kana geçer ve kanın pH'ının dengelenmesini sağlayarak tabii bir tampon çözelti gibi çalışır.

Karbonik anhidrazın birçok canlı türünde çok sayıda izoenzimi vardır. Bugüne kadar memeli hayvanlar için; eritrositlerde (CA-I ve CAII), iskelet kasında (CA-III), insan böbreginde (CA-IV), belirli dokuların mitokondrilerinde (CA-V), tükürük bezlerinde (CA-VI) ve sitozolde (CA-VII) karbonik anhidraz izoenzimleri belirlenmistir. Genelde tek polipeptid yapıya sahip olan bu izoenzimlerin yanında bitkilerde oligomerik yapıda CA izoenzimlerine rastlanmıstır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

İnsanları da 16 farklı karbonik anhidraz izoenzimi tespit edilmiş ve bu izoenzimlerin hücre içindeki yerleşimlerine göre CA, I, II, III, VII ve XIII olmak üzere beş tanesi sitozoliktir. CA-IV, CA-IX, CA XII ve CA XIV ise membrana bağlıdır. CA-VA ve VB mitokondriyal, CA-VI tükürük ve süt de salgılanır ve üç tanesi nonkatalitiktir (VIII, X, XI) (Supuran ve Scozzafava, 2001, 2007). hCA II'nin aktif kısmının uygun geometrik şekli Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. hCA II'nin aktif kısmının uygun geometrik şekli

hCA IX, hCA XII, hCARP VIII gibi bazı izoenzimler, onkojenez (tümör oluşumu) ve tümör ilerlemesinde rol almakta, tümörlerde çok bol miktarda

bulunmaktadır. Rahim boynu, göğüs, mesane ve küçük olmayan hücreli akciğer kanserlerinde, hCA IX ve hCA XII enzimlerinin etkisiyle (asitlenmesi sonucu), kanserli hücrelerin bulundukları doku dışında doğrudan ya da kan-lenf damarlarıyla başka bölgelere sıçramaktadır. Ayrıca bu enzimler mide-bağırsak mukozası ve mide-bağırsak ile ilgili dokularda da mevcuttur (Cecchi ve ark., 2004; Supuran ve Scozzafava, 2001, 2007).

2.2.1. Kanser ilişkili CA'lar

CA IX insan tümörlerinin çoğunda tümör büyümesiyle bağlantısı olan bir transmembran proteindir. Hipoksi hücre içinde veya dışında oksijen basıncının azalması demektir. Tümör hipoksisi kanser teşhisinde önemli bir belirteçtir.Sağlıklı dokularda kandaki O_2 oranı % 2-9 arasında olup kanser hücresinde bu oran % 2'nin altındadır (Bertout ve ark., 2008). Tümör hücreleri hipoksik ortamda çeşitli adaptasyonlardan geçerek büyürler.İlk olarak Otto Warburg 1924 yılında yaptığı çalışmada hücreler oksijensiz kalınca bir adaptasyondan geçerek ilkel bir şekilde enerjisini oksijenden değil glikozdan karşılayabildiğini kanıtladı.Yani kanser hücreleri oksijen olmadan da yaşayabiliyordu.Kanser hücrelerinin çok hızlı büyümeleri çok yüksek miktarda glikoz kullanımını gerektiriyor ve glikozu laktik aside dönüştürür.Laktik asit ise asit-baz dengesinde ve pH dengesinde bir olumsuzluğa yol açar.Hipoksi glikozun TCA siklusuna girişine engel olup glikozdan enerji üretimini sağlar.Ayrıca hücre sağkalımı için lipit üretimini uyarır.Hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF) hücre sağkalımı,anjiyogenez,adezyon ve metabolizmanın düzenlenmesinde rol alır. Tümör hücreleri düşük oksijen konsantrasyonlarına maruz kaldıklarında çoğu faktörü kontrol eden HIF- 1'in ekspresyonunu artırırlar. HIF-1'in aktivasyonu hücrenin oksijensiz ortamda yaşayabilmesi için önemli bir adaptasyondur (Huang ve Zhang, 2014).

2.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Etki Mekanizmsaı

Karbonik anhidraz inhibitörleri uzun yıllardır araştırılmakta olup çok sayıda CAİ günümüzde kullanılmaktadır.Hastalıkların tedavisinde kullanılmaya

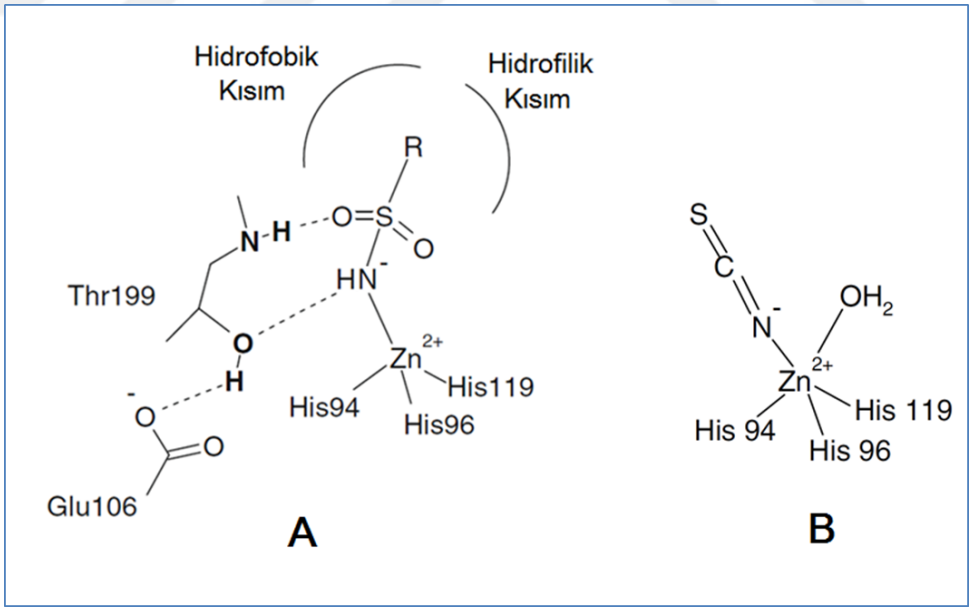
başlamasında glokom hastalığı için yapılan çalışmalar etkili olmuştur.Bu çalışmalarda CA enziminin katalizlediği mekanizmaların aydınlatılması ve çeşitli dokularda CA enziminin var olduğunun anlaşılması etkili olmuştur.Yapılan araştırmalar neticesinde CA enzimi için çok sayıda inhibitör sentezlenmiştir.Sentezlenen bu CAİ başta glokom tedavisinde olmak üzere , pozitron emisyon tomografisi (PET) ve magnetik rezonans (MRI) belirlenmsinde teşhis materyali;ağrı kesici,epilepsi,antitümör ve nörolajide ilaç olarak; antiülser,diüretik ve antibiyotik , obezite önleyici gibi ilaçların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. (Supuran ve Scozzafava, 2001, 2007; Lindskog, 1997).

$$E\text{-}Zn^{+2}—OH_2 + I \rightleftharpoons E\text{-}Zn^{+2}—I + H_2O$$

(Tetrahedral Yapı – Yerdeğiştirme)

$$E\text{-}Zn^{+2}—OH_2 + I \rightleftharpoons E\text{-}Zn^{+2}—OH_2(I)$$

(Trigonal-bipramit Yapı – Katılma)



Şekil 2.2. Karbonik anhidraz inhibitör mekanizmasının şematik gösterimi (A: Tetrahedral Yapı – Yerdeğiştirme; B: Trigonal-bipramit Yapı – Katılma)

CAİ'leri enzimleri bağlama bölgelerine göre ikiye ayrılırlar:

a) Enzimin aktif bölgesindeki Zn^{+2} ile kompleks oluşturan inhibitörler: Sülfonamitler, Sülfamat-sülfamitler bu grubun ana sınıfını oluşturur.
b) Metal merkezine direkt bağlanmayan inhibitörler: Fenoller, poliaminler, bazı karboksilatlar,sülfokumarinler.Kumarinler ve bazı laktonların ön ilaç inhibitörü olduğu anlaşılmıştır.

CAİ hakkındaki çalışmalar bu bilgiler ışığında devam etmektedir. Devam eden çalışmalarda ''kuyruk yaklaşımı'' ile enzimin aktif bölgesinde daha fazla dış bağlanma bölgeleri olan CAİ'i elde edilmeye çalışılmaktadır.

Durgun (2004) yaptığı çalışmada, 4-(3-metil piperazinopropanoilamino) benzensülfonamit, 4-(3-morfolinopropanoilamino)benzensülfonamit, 4-(3-pirolidinopropanoilamino)benzensülfonamit ve 4-(3-metilpiperidino propanoilamino) benzensülfonamit bileşiklerini sentezlemiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları aydınlatılmış ve bölme katsayısı, sudaki çözünürlükleri gibi çeşitli fiziksel özellikleri de incelenmiştir. Yine, Durgun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sülfanilamit ve 4-(2-aminoetil)benzensülfonamit ile benzaldehit türevlerinin kondensazyon reaksiyonu sonucu imin sülfonamit türevleri sentezlenmiştir. İmin bileşiklerinin $NaBH_4$ ile indirgenme reaksiyonu sonucu amin sülfonamit türevleri elde edilmiştir. Bileşiklerin yapıları elementel analiz, spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşikler, insan karbonik anhidraz izoformları: sitosolik izoenzim hCA I ve II, ayrıca, transmembran tümör-bağlantılı izoenzim hCA IX ve XII karşı inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Genellikle yeni amin bileşikleri, imin bileşikleri ve kliniklerde kullanılan bileşikler ile kıyaslandığında daha yüksek inhibitör özelliği göstermiştir (Durgun, 2014; Durgun ve ark., 2015 ve 2016).

2.4. Antitümör Olarak Sülfonamitler

Kanser, hücre veya bir grup hücrenin kontrolsüz büyüme, istila ve bazen metastazı olduğu hastalık sınıfıdır. Kanser, insan için risk oluşturur ve her yaştan insanı etkiler(URL-1).

Aromatik ve heterosiklik sülfonamitler tarafından CA inhibisyonu 45 yıldan daha uzun bir süredir glokom, konjesif kalp yetmezliği, dağ hastalığı(yükseklik), mide hastalığı, ülser ve diüretik rahatsızlıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kliniksel olarak kullanılmasına rağmen sülfonamitlerin antitümör ilaç olarak kullanımı bugüne kadar oldukça azdır. Bir kaç klasik klinik ajanlar (sülfonamit sınıfında) asetazolamit, metazolamit, etokzolamit içerir. Teicher ve arkadaşları (1993) bu türevlerden biri olan ve çeşitli CA izoenzimi inhibitörü olan asetazolamitin farklı sitotoksik ajanlarla (alkiller ajanları, nükleosit analoglar, platin türevleri vb.) antikanser terapilerinde potansiyel bir modulatör olduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedeni muhtemelen CA inhibisyonundan kaynaklanan içtümör asitlenmesinden dolayıdır (Supuran ve Scozzafava, 200; 2001).

Kültür içinde insan kanser hücrelerinin büyümesinin inhibisyonunu sağlayan spesifik sülfonamit CA inhibitörleride Chegwidden ve Spencer (1995) tarafından araştırılmaktadır. Klinikte kullanılan asetazolamit, metazolamit yada etoksozolamit gibi sülfonamit CA inhibitörlerinin insan lenfoma hücrelerinde ki büyümeyi inhibe ettiğini ve bu inhibisyonun 0,5 μμ etoksozolamitte ; 0,25 μμ asetazolamitte olduğunu göstermişlerdir.Nükleotit öncüllerinin ilavsiyle inhibisyonun daha çok olmasının nedeni nükleotit sentezi için bikarbonat varlığını azaltmasına bağlamışlardır (HCO_3^- karbonil fosfat sentezini sağlayan substrattır.) (Chegwidden ve Spencer, 1995). Pastorek ve grubu 10 μμ asetazolamitin hücre dışında bazı böbrek kanser hücrelerinin vücutta yayılmasını azalttığını, bunu da muhtemelen CA II ve CA XII izoenzimlerinin inhibisyonu ile yaptığını göstermişlerdir (Parkilla ve ark., 2000).

ABD'deki Doğal Kanser Enstitüsü'nün düzenlediği bir programda birkaç yüz güçlü sülfonamit CA inhibitörlerinin (aromatik ve heterosiklik) 60 kanser hücresine

karşı inhibisyon etkilerinden bahsedilmiş özellikle 3-7 nolu türevlerin ilginç olduğunu tanımlamışlardır.Bu bileşiklerin çoğunun diğer klasik sülfonamitlere göre (yukarda belirtilen 3,1, 7) daha iyi tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermişlerdir.3-7 türevleri çeşitli kanser hücrelerine karşı (lösemi,kolon,CNS,böbrek,prostat,ve göğüs kanseri gibi) düşük mikroorganizmalar aralığında GI_{50} değerleri göstermiştir.Bu cesaretlendirici sonuçlar bize yeni türev sınıflarını dizayn etmede yardımcı olacaktır.Bu nedenle amin,imin,ve hidroksit grupları içeren basit yeni aromatik ve heterosiklik sülfonamitler CA inhibisyonu için geliştirilmektedir (Casini ve ark., 2002).

Bu amaçla N,N-dialkiltiokarbonil sülfonamit 8 – 9 - 10 tipinde maddeler sentezlenmiştir. Bu sülfonamitlerden bazıları kan kanseri, yumurtalık, kolon, CNS, böbrek, prostat, göğüs ve melanom kanser hücrelerinde 10-75 nμ aralığındaki GI_{50} ile inhibisyon özelliği göstemişlerdir. Tümör büyümesinin inhibisyonuna ait mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Bazı hipotezler vardır. Chegwidden ve Spencer (1995) bu bileşiklerin nükleotitlerin sentezi için bikarbonat sağlanmasını azalttığını öne sürmüşlerdir. Bunlar klasik inhibitörler olan asetazolamit, metazolamit ya da etoksozolamit'dir. Böyle bir mekanizma CA II ve CA V 'te olabilir. Bir başka alternatif mekanizma Teicher ve arkadaşları (1993) tarafından gösterilen CA inhibisyonunun bir sonucu olarak hücre içi çevresindeki asitlenmeyi içerir.Burada asetazolamit ile farklı ilaçların birleşmesinin antikanser aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir.Rapor ettikleri sülfonamitlerin tümör hücrelerinde bulunan CA IX, CA XII, ve CA IV izoenzimlerinin aktivitesini de etkileyeceği başka bir olasılıktır.Bahsi geçen bütün mekanizmalrın olabileceğinin mümkün olduğundan bahsetmişlerdir (Casini ve ark., 2002).

Mohamed ve arkadaşları (2008) mikrodalga yöntemiyle sülfanilamit içeren Schiff bazı bileşiği sentezlenmiş ve kimyasal yapıları spektroskopik tekniklerle belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin antitümör özellikleri insan meme ve akciğer kanseri hücreleri üzerinde hücre sayım testi ile taranmıştır. Bazı test edilen bileşikler, 90 ila 166 μM IC_{50} aralığı ile meme kanserine (MCF-7) karşı kuvvetli ve seçici bir etki göstermiştir. Geniş spektrumlu aktivite ile ilgili olarak, bazı bileşikler, 96 ile 140

μM IC_{50} aralığında insan göğsü ve insan akciğer hücrelerine karşı kuvvetli antitümör aktivite göstermiştir.

Mirian ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada, yeni sentezlenmiş sülfonamit türevlerinin sitotoksik etkileri, HeLa, MDA-MD-468 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerinde MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Test edilen sülfonamitlerin tümü, 100-1000 μm konsantrasyon aralığında HeLa ve MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Bu sülfonamidler, 10-100 μm konsantrasyonda MDA-MB-468 hücre hattına karşı sitotoksite etki göstererek ve hücre canlılığını % 50'den daha azaltmıştır.

Ren ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, bir dizi N-sülfonil-3,7-diokso-5p-kolan-24-amid, ursodeoksikolik asit türevleri sentezlenmiştir. Bileşiklerin in vitro antitümör aktivitesi HCT-116, MCF-7, K562 ve SGC-7901 hücre hatları üzerinde çalışılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

- Çeşitli ebatlarda balonlar, huniler, geri soğutucular, erlenmayerler, değişik soğutucular, damlatma beherler, büretler, kılcal borular, hunileri, ayırma hunileri.
- Manyetik ısıtıcılı karıştırıcılar.
- Soğutucu olarak su buz banyosu.
- Sıcaklık ölçümleri için dijital termometre (-10 ile 200 ^{o}C arası).
- İnce Tabaka Kromotografisi (TLC) için TLC Aliminyum Plakalar DC-Alufolien 60F 254 TLC (Merck).

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

- **Sülfanilamit:** Bileşiklerin sentezinde baslangıç maddesi olarak kullanıldı (Sigma-Aldrich).
- **4-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide:** Bileşiklerin sentezinde baslangıç maddesi olarak kullanıldı (Sigma-Aldrich).
- **2-Bromopropionil bromit:** Yeni bileşiklerin sentezinde baslangıç maddesi olarak kullanıldı(Sigma-Aldrich).
- **Morfolin:** Bileşiklerin sentezinde son basamakta kullanıldı (Sigma-Aldrich).
- **Etil alkol:** Kristallendirme aşamalarında kullanıldı (Merck).
- **Metil alkol:** TLC analizlerinde çözücü olarak kullanıldı (Merck).
- **Tetrahidrofuran (THF):** Sentez basamaklarında çözücü olarak kullanıldı (Merck).
- **Etilasetat:** TLC analizlerinde ve ürünlerin saflastırılmasında kullanıldı (Merck).

- **Dietileter:** Bölme katsayısı ölçümlerinde (Peter) ve sentezlenen maddelerin kristallendirilmesinde kullanıldı (Merck).
- **Trietilamin (TEA):** Baz olarak kullanıldı (Sigma-Aldrich).
- **Piridin:** Baz olarak kullanıldı (Sigma-Aldrich).
- **Diklormetan (DCM):** TLC anlizlerinde çözücü olarak kullanıldı (Merck).
- **Hekzan:** TLC anlizlerinde çözücü olarak kullanıldı (Ak Kimya).

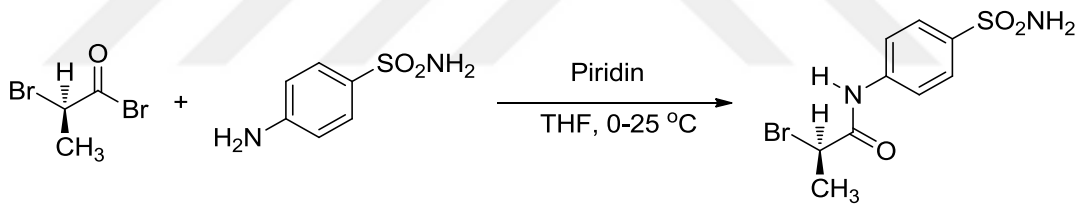
3.1.3. Kullanılan cihazlar

- **^{1}H NMR:** Agilent 400 MR, 400 MHz NMR Spektrometre Harran Üniversitesi Merkezi Laboratuarı.
- **^{13}C NMR:** Agilent 400 MR, 100 MHz NMR Spektrometre Harran Üniversitesi Merkezi Laboratuarı.
- **İnfrared Spektrometresi:** Perkin Elmer Spektrum Two UATR IR spektrometre.
- **Elementel Analiz:** CHNS-932 LECO İnönü Üniversitesi Bilmsel ve Teknoloji Merkezi
- **Kütle Spektrometresi:** Shimadzu LCMS 8040 Model Sıvı Kromatografi-3'lü Quadropole Kütle Spektrometresi (LC–MS /MS) Harran Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi.
- **Erime Noktası Tayin Cihazı:** Stuart Scientific Melting Point Apparatus.
- **Dönerli Buharlaştırıcı:** Heidolph Laborota 4003 Rotary Evaporator
- **UV Lambası:** Camag UV-Lamp (254-366 nm).
- **Hassas Terazi:** Sartorius CP 224 S.

3.2.Yöntem

3.2.1. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (MMH-1) sentezi

2-bromo-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit **(MMH-1)** bileşiğini sentezlemek için; Kuru tetrahidrofuran (40 mL) içerisinde çözünmüş 2-bromopropionil bromit (2.15 g, 10.00 mmol) bileşiği, kuru tetrahidrofuran (30 mL) içerisinde çözülmüş sülfanilamit (1.72 g, 10.00 mmol) ve piridin (1.19 g, 15.00 mmol) çözeltisine damla damla 1 saat boyunca 0 ^{o}C'de ilave edildi. İlave işlemi bittikten sonra reaksiyonun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra reaksiyon oda sıcaklığında 20 saat boyunca devam ettirildi. Yapılan TLC (DKM/Metanol) analizinde reaksiyonun tamamlandığı görüldü. Çöken amin tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Oluşan yağımsı ürün $NaHCO_3$ (2%) ve HCl (5%) ile yıkandı. Daha sonra oluşan ürün etanolde kristallendirildi ve beyaz ürün elde edildi. (Durgun ve ark., 2017)

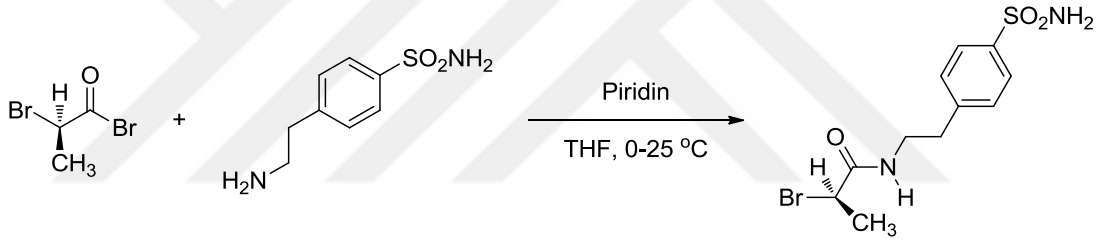


Şekil 3.1. MMH-1 bileşiğinin sentezi

Verim: (70%); **E.N.:** 217-219 ˚C; $C_9H_{11}BrN_2O_3S$ (307.16 g/mol) **Hesaplanan (%):** C, 35.19; H, 3.61; N, 9.12; S, 10.44. **Bulunan (%):** C, 35.10; H, 3.67; N, 9.19; S, 10.35. **FT-IR (U-ATR, cm^{-1}):** 3333, 3207 (NH_2), 3129 (Amit-N-H), 3071 (Ar-C-H), 2927, 2980 (Alifatik-C-H), 1683 (Amit-C=O), 1331 (asimetrik), 1160 (simetrik) (S=O), 541 (C-Br); **^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 400 MHz, δ ppm):** 10.66 (1H, s, H-N-C=O), 7.71-7.77 (4H, m, *J*= 8 Hz, -Ar-H), 7.27 (2H, s, SO_2NH_2), 4.66-4.71 (1H, q, *J*= 8 Hz, Br-CH-), 1.72-1.74 (3H, d, *J*= 8 Hz, -CH_3); **^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 100 MHz, δ ppm):** 168.44 (C=O), 141.89 (Ar-C-NH-), 139.37 (Ar-C-SO_2NH_2), 127.22 (Aromatik), 119.39 (Aromatik), 44.56 (CH-Br), 21.64 (CH_3); **LC-MS/MS Mass(m/z):** 307.8 [M+H].

3.2.2. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (MMH-2) sentezi

2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(MMH-2)** bileşiğini sentezlemek için; Kuru tetrahidrofuran (40 mL) içerisinde çözünmüş 2-Bromopropionil bromit (2.15 g, 10.00 mmol) bileşiği, kuru tetrahidrofuran (30 mL) içerisinde çözülmüş 4-(2-aminoetil)benzensülfonamit (2.00 g, 10.00 mmol) ve piridin (1.19 g, 15.00 mmol) çözeltisine damla damla 1 saat boyunca 0 ^{o}C'de ilave edildi. İlave işlemi bittikten sonra reaksiyonun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra reaksiyon oda sıcaklığında 20 saat boyunca devam ettirildi. Yapılan TLC (DKM/Methanol) analizinde reaksiyonun tamamlandığı görüldü. Çöken amin tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Oluşan yağımsı ürün $NaHCO_3$ (2%) ve HCl (5%) ile yıkandı. Daha sonra oluşan ürün etanolde kristallendirildi ve beyaz ürün elde edildi.

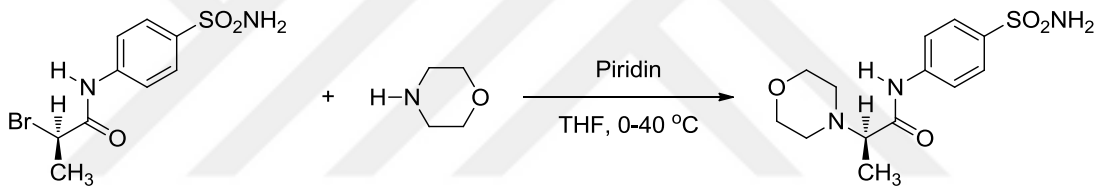


Şekil 3.2. MMH-2 bileşiğinin sentezi

Verim: (70%); **E.N.:** 159-161 ˚C; $C_{11}H_{15}BrN_2O_3S$ (335.22 g/mol) **Hesaplanan (%):** C, 39.41; H, 4.51; N, 8.36; S, 9.57. **Bulunan (%):** C, 39.33; H, 4.58; N, 8.47; S, 9.51. **FT-IR (U-ATR, cm^{-1}):** 3342, 3296 (NH_2), 3211 (Amit-N-H), 3095 (Ar-C-H), 3004, 2872 (Alifatik-C-H), 1655 (Amit-C=O), 1337 (asimetrik), 1161 (simetrik) (S=O), 554 (C-Br); **^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 400 MHz, δ ppm):** 8.33 (1H, s, H-N-C=O), 7.36-7.38 (2H, m, *J*= 8 Hz, -Ar-H), 7.70-7.72 (2H, m, *J*= 8 Hz, -Ar-H), 7.28 (2H, s, SO_2NH_2), 4.40-4.45 (1H, q, *J*= 8 Hz, Br-CH-), 3.27-3.32 (2H, m, N-CH_2); 2.76-2.79 (2H, d, *J*= 8 Hz, Ar-CH_2); 1.59-1.61 (3H, d, *J*= 8 Hz, -CH_3); **^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 100 MHz, δ ppm):** 169.02 (C=O), 143.56 (Ar-C-(CH_2)2-NH-), 142.26 (Ar-C-SO_2NH_2), 129.35 (Aromatik), 125.79 (Aromatik), 44.18 (CH-Br), 40.18 (CH_2-NH-), 34.51 (Ar-CH_2), 21.91 (CH3).

3.2.3. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (S-1) sentezi

2-morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit **(S-1)** bileşiğini sentezlemek için; Kuru tetrahydrofuran (30 mL) içerisinde çözünmüş 2-bromo-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit **(MMH-1)** (3.07 g, 10.00 mmol) bileşiği, kuru tetrahydrofuran (30 mL) içerisinde çözülmüş morfolin (1.74 g, 20.00 mmol) ve piridin (1.19 g, 15.00 mmol) çözeltisine damla damla 30 dakika boyunca 0 ^{o}C'de ilave edildi. İlave işlemi bittikten sonra reaksiyonun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra reaksiyon geri soğutucu altında 48 saat boyunca 40 ^{o}C'de devam ettirildi. Yapılan TLC (DCM/Metanol) analizinde reaksiyonun tamamlandığı görüldü. Çöken amin tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Oluşan yağımsı ürün etanol/metanol/su (5/4/1) da kristallendirildi ve beyaz ürün elde edildi.

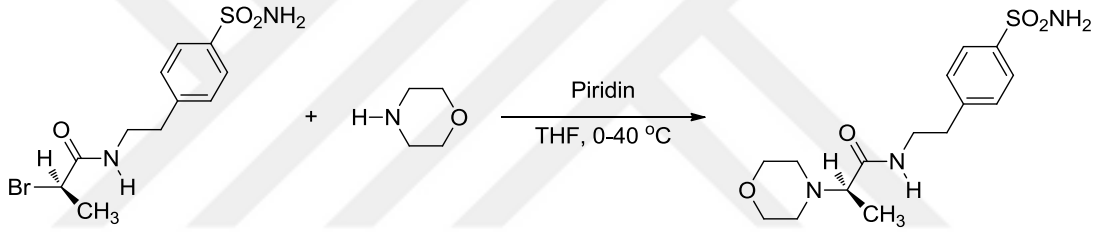


Şekil 3.3. S-1 bileşiğinin sentezi

Verim:: (75%); **E.N.:** 181-183 ˚C; $C_{13}H_{19}N_3O_4S$ (313.37 g/mol) **Hesaplanan (%):** C, 49.83; H, 6.11; N, 13.41; S, 10.23. **Bulunan (%):** C, 49.75; H, 6.14; N, 13.52; S, 10.19; **FT-IR (U-ATR, cm^{-1}):** 3339, 3308 (NH_2), 3219 (Amid-N-H), 3089 (Ar-C-H), 2960-2830 (Alifatik-C-H), 1652 (Amit-C=O), 1336 (asimetrik), 1159 (simetrik) (S=O); **^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 400 MHz, δ ppm):** 10.10 (1H, s, -CONH), 7.78-7.80 (2H, d, *J*=8 -Ar-H), 7.72-7.74 (2H, d, *J*=8, -Ar-H), 7.23 (2H, s, SO_2NH_2), 3.58-3.61 (4H, t, *J*=8, -C$\underline{H}_2$-O-C$\underline{H}_2$), 3.21-3.27 (1H, q, -N-C$\underline{H}$-CH_3), 2.51-2.60 (4H, m, -C$\underline{H}_2$-N-C$\underline{H}_2$), 1.17-1.18 (3H, d, *J*=4 Hz -C$\underline{H}_3$); **^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 100 MHz, δ ppm):** 172.16 (C=O), 142.03 (Ar-$\underline{C}$-NH-), 138.92 (Ar-$\underline{C}$-SO_2NH_2), 127.01 (Aromatik), 119.46 (Aromatik), 66.78 (CH_3-$\underline{C}$H-N), 64.17 ($\underline{C}H_2$-O-$\underline{C}H_2$), 50.08 ($\underline{C}H_2$-N-$\underline{C}H_2$), 12.97 ($\underline{C}H_3$); **LC-MS/MS Mass(m/z):** 314.10 [M+H].

3.2.4. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (S-2) sentezi

2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(S-2)** bileşiğini sentezlemek için; Kuru tetrahydrofuran (30 mL) içerisinde çözünmüş 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(MMH-2)** (3.35 g, 10.00 mmol) bileşiği, kuru tetrahydrofuran (30 mL) içerisinde çözülmüş morfolin (1.74 g, 20.00 mmol) ve piridin (1.19 g, 15.00 mmol) çözeltisine damla damla 30 dakika boyunca 0 ^{o}C'de ilave edildi. İlave işlemi bittikten sonra reaksiyonun oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra reaksiyon geri soğutucu altında 72 saat boyunca 45 ^{o}C'de devam ettirildi. Yapılan TLC (DCM/Methanol) analizinde reaksiyonun tamamlandığı görüldü. Çöken amin tuzu süzülerek ayrıldı. Çözeltideki çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Oluşan yağımsı ürün etanol/metanol/su (5/4/1) da kristallendirildi ve beyaz ürün elde edildi.



Şekil 3.4. S-2 bileşiğinin sentezi

Verim:: (70%); **E.N.:** 144-146 ˚C; $C_{15}H_{23}N_3O_4S$ (341.43 g/mol) **Hesaplanan (%):**: C, 52.77; H, 6.79; N, 12.31; S, 9.39. **Bulunan (%):** C, 52.68; H, 6.85; N, 12.43; S, 9.31; **FT-IR (U-ATR, cm^{-1}):** 3338, 3320 (NH_2), 3210 (Amit-N-H), 3102 (Ar-C-H), 2982-2835 (Alifatik-C-H), 1630 (Amit-C=O), 1338 (asimetrik), 1162 (simetrik) (S=O); **^{1}H-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 400 MHz, δ ppm):** 7.81 (1H, s, -CONH), 7.71-7.69 (2H, d, *J*=8, -Ar-H), 7.37-7.35 (2H, d, *J*=8 -Ar-H), 7.28 (2H, s, SO_2NH_2), 3.73-3.71 (2H, m, N-C$\underline{H}_2$); 3.38-3.33 (1H, q, -N-C$\underline{H}$-CH_3), 3.06-3.04 (2H, d, *J*= 8 Hz, Ar-C$\underline{H}_2$); 2.83-2.78 (4H, t, *J*=8, -C$\underline{H}_2$-O-C$\underline{H}_2$), 2.31-2.22 (4H, m, -C$\underline{H}_2$-N-C$\underline{H}_2$), 1.02-1.00 (3H, d, *J*=4 Hz -C$\underline{H}_3$); **^{13}C-NMR (DMSO-d$_6$, TMS, 100 MHz, δ ppm):** 172.60(C=O), 144.07 (Ar-$\underline{C}$-NH-), 142.47 (Ar-$\underline{C}$-SO_2NH_2), 129.59 (Aromatik), 126.02 (Aromatik), 66.68 (CH_3-$\underline{C}$H-N), 63.92 ($\underline{C}H_2$-O-$\underline{C}H_2$), 50.27 ($\underline{C}H_2$-N-$\underline{C}H_2$), 39.63 (CH_2-NH-), 35.11 (Ar-CH_2), 13.47 ($\underline{C}H_3$); **LC-MS/MS Mass(m/z):** 342.10 [M+H].

3.2.5. Biyolojik çalışma

Elde edilen bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki Sitotoksisite etkileri Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında öğretim üyesi Dr. İsmail KOYUNCU tarafından göre yapılmıştır (Durgun ve ark., 2016b).

3.2.5.1. Hücreler ve kültür koşulları

Çalışmada ATCC'den temin edilip stokladığımız; PC3 *(İnsan Prostad Kanseri Hücre Hattı),* HT-29 *(İnsan Kolon Kanser Hücre Hatları)*, HeLa *(İnsan Servikal (Rahim Ağzı) Kanser Hücre Hatları),* DLD-1 *(İnsan Kolon Kanser Hücre Hatları)*, ECC-1 *(İnsan Rahim İçi Kanser Hücre Hatları),* DU-145 *(İnsan Prostad Kanseri Hücre Hattı),* PNT1-A *(Normal Prostad Epitel Hücre Hattı),* HEK-293 *(Normal İnsan Emriyonik Böbrek Hücre Hattı)* hücre hatları kullanıldı. Hücre hatları %10 FBS ve %1 glutamin ile desteklenmiş DMEM:F12 ve RPMI-1640, besi yerinde çoğaltılır. Bütün hücreler %5 CO_2'li atmosferde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin tavsiye ettiği şekilde hücreler %0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımı ile kaldırılıp 1:3 oranında olacak şekilde pasajlanarak, kullanılmayan hücreler %95 besi yeri ve %5 DMSO içerecek şekilde hazırlanan hücre dondurma solüsyonu içerisinde önce -80^0C'lik derin dondurucuda kısa süreli veya uzun sureli olarak sıvı azota alınarak saklanır.

3.2.5.2. Bileşiklerin uygulanması ve sitotoksik etkinliklerinin saptanması

Hücreler stoktan açılarak 75 cm^3 flasklara ekilip ve hücreler %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x104 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekilir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda besi yerleri uzaklaştırılıp, yerine 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında madde içeren 200 µl besiyeri hücrelere eklenerek 48 saat inkübe edildi.

3.2.5.3. MTT hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi

MTT hücre proliferasyon kiti kullanılarak bileşiklerin sitotoksik etkileri incelecektir. MTT testi canlı hücrelerdeki metabolik aktiviteyi, hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimi aracılığı ile MTT parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturması prensibine dayanarak yapılmaktadır (Mosmann, 1983). Hücreler stoktan açılarak 25 cm^3 flasklara ekilip, %80-90 oranında dolunca tripsinizasyon ile kaldırılıp 1x104 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara ekilecek. 24 saatlik süre ardından besi yerleri uzaklaştırılıp ve her bir bileşikler için 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM olacak şekilde uygulanır ve sitotoksik doz bulunmaya çalışılır. Bileşikler her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklenir ve ardından 48 saatlik inkübasyon süresince %5 CO_2'li atmosferde 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinin ardından kuyucuklardaki besi yerleri çekilip yerine 5 mg/ ml MTT içeren besiyeri eklenir ve ortalama 4 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılır, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedilir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sentezlenen Maddelerin Spektroskopik Yöntemlerle Açıklanması

4.1.1. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (MMH-1)

Başlangıç maddesi olarak sülfanilamit kullanılarak 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi sentezlenmiş ve aşağıda belirtilen yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen bileşik DCM/Metil alkol (5/3) çözeltisinde, ince tabaka kromatografi'si (TLC) ile 256 nm ve 366 nm de UV lambası altında kontrol edilmiş ve tek nokta olduğu görülmüştür. Ayrıca, elde edilen bileşik tek erime noktasına da sahiptir. Bileşiklerin elde edilmiş verileri incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile önerilen yapının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür (Ek 1-3).

Bu bileşiğin **IR** spektrumu KBr tabletleriyle alınmıştır ve Ek Şekil 1.1'de görülmektedir. Yapıyı destekleyen titreşim bandları şunlardır: 3333 ve 3207 cm^{-1}'de çıkan pikler amin (NH_2) grubundan kaynaklanan gerilmeleridir. 3129 cm^{-1}'deki pik ise amitin N-H pikidir. 3071'de ki pik ise aromatik halkadaki C-H gerilme pikidir. Alifatik C-H gerilmesinden kaynaklanan pikler ise 2927 ve 2980 cm^{-1}'de gözlenmiştir. 1683 cm^{-1}'de amit bandı (-C=O)'dan kaynaklanır. 1331 cm^{-1}'de asimetrik ve 1160 cm^{-1}'de ise simetrik (S=O)'dan kaynaklanan pikler gözlenmektedir. 541 cm^{-1}'de ise C-Br gerilmesinden kaynaklanan pik gözlenmiştir.

MMH-1 bileşiğinin DMSO içersinde alınmış **^{1}H-NMR** spektrumu Ek Şekil 2.1.'de incelendiğinde 10.66 ppm' de çıkan singlet pikin –CONH grubundaki protondan kaynaklandığı ve 7.71-7.77 ppm'de görülen multiplet pikin aromatik protonlardan kaynaklandığı görülür. Ayrıca 7.27 ppm' de $–SO_2NH_2$ grubundan kaynaklanan bir pik görülmüştür. 4.66-4.71 ppm' deki pik Broma bağlı CH'tan kaynaklanmaktadır. 1.72-1.74 ppm'deki pik ise CH_3 protonlarından kaynaklanmaktadır.

MMH-1 bileşiğinin DMSO içinde **^{13}C NMR** spektrumu Ek Şekil 3.1.'de verilmiştir. Bu spektrum incelendiğinde 168.44 ppm'deki pik CONH grubundaki karbondan kaynaklanır. 141.89 ppm'de aromatik halkadaki -SO_2NH_2 grubuna göre para konumundaki karbondan kaynaklanmaktadır. 139.37 ppm'deki pik -SO_2NH_2 grubunun bağlı olduğu karbondan dolayı çıkmıştır. Ayrıca aromatik halkadaki 4 karbon atomu iki pik gösterir. Bunlar -SO_2NH_2 tarafında olan 127.22 ppm ve –NH tarafında olan 119.39 ppm de kimyasal kayma verir. 44.56 ppm deki pik CH-Br deki karbondan, 21.64 ppm'deki pik ise metildeki karbondan kaynaklanmaktadır.

4.1.2. 2-Bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (MMH-2)

Başlangıç maddesi olarak 4-(2-aminoetil)benzensülfonamit kullanılarak 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(MMH-2)** Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi sentezlenmiş ve aşağıda belirtilen yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen bileşik DKM/Metil alkol (5/3) çözeltisinde, ince tabaka kromatografi'si (TLC) ile 256 nm ve 366 nm de UV lambası altında kontrol edilmiş ve tek nokta olduğu görülmüştür. Ayrıca, elde edilen bileşik tek erime noktasına da sahiptir. Bileşiklerin elde edilmiş verileri incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile önerilen yapının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür (Ek 1-3).

MMH-2 bileşiğinin KBr tabletleriyle **IR** spektrumu alınarak Ek şekil 1.2'de verilmişitr. Alınan IR spektrumuna göre bu bileşikde 3342 ve 3296 cm^{-1}'de çıkan pikler NH_2 (amin) grubundan kaynaklanmıştır. 3211 cm^{-1}'de görülen pik ise amit grubundaki N-H'dan kaynaklanmaktadır. Aromatik halkadaki C-H'dan kaynaklanan pik 3095 cm^{-1}'de gözlemlenmiştir. 3004 ve 2872 cm^{-1}'de gözlenen pikler alifatik C-H'dan kaynaklanan piklerdir. Bileşiğin amit bandındaki (-C=O)'dan kaynaklanan pikler 1655 cm^{-1}'de gözlemlenmişitr. 1337 cm^{-1}'de asimetrik 1161 cm^{-1}'de ise simetrik (S=O)' dan kaynaklı pikler gözlemlenmiştir. C-Br gerilmesinden kaynaklı pik 554cm^{-1}'de gözlemlenmiştir.

MMH-2 bileşiğinin **^{1}H-NMR** spektrumu DMSO içinde alınarak Ek şekil 2.2'de verilmiştir. Alınan spekturm incelendiğinde (–CONH) grubundaki protondan

kaynaklı singlet pik 8.33 ppm'de görülmüştür. Aromatik protonlardan kaynaklanan multiplet pik 7.36-7.38 ppm'de gözlemlenirken ($–SO_2NH_2$)' den kaynaklanan singlet pik 7.28 ppm'de gözlemlenmiştir. 4.40-4.45 ppm'de broma bağlı C-H 'tan kaynaklanan bir pik görülmüştür. 3.27-3.32 ppm'de ($N-CH_2$) grubundaki protonlardan kaynaklı multiplet pik gözlemlenirken 2.76-2.79 ppm'de ($Ar-CH_2$) grubundaki protonlardan kaynaklı duplet ve 1.59-1.161 ppm'de ($-CH_3$) grubuna bağlı protonlardan kaynaklı pik gözlemlenmiştir.

Bileşiğin **^{13}C-NMR** spektrumu DMSO içinde alınmış olup Ek şekil 3.2 'de verilmiştir. Alınan bu spektrum incelendiğinde 169.02 ppm'de (C=O) bağındaki karbondan kaynaklı pik görülmüştür. Aromatik halkadaki ($-SO_2NH_2$) grubuna göre para konumundaki karbondan kaynaklı pik 143.56 ppm'de gözlemlenmiştir. 142.26 ppm'de ($–SO_2NH_2$) grubunun bağlı olduğu karbondan kaynaklı pik görülmüştür. Aromatik halkadaki karbonlar iki ayrı pik vermiştir. Bunlardan ilki 129.35 ppm'de ($-SO_2NH_2$) tarafında olan karbondan ikincisi ise 125.79 ppm'de (–NH) tarafından olan karbondan kaynaklanmıştır. (CH-Br)'de bulunan karbondan kaynaklı pik 44.18 ppm' de gözlemlenirken 40.18 ppm'de (CH_2NH-) grubundaki karbondan kaynaklanan pik gözlemlenmiştir.($Ar-CH_2$)' de bulunan karbondan kaynaklı pik 34.51 ppm'de; (CH_3) grubundaki karbondan kaynaklı pik ise 21.91 ppm'de gözlemlenmiştir.

4.1.3. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit (S-1) sentezi

2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit **(S-1)** bileşiğini sentezlemek için 1. basamakta elde edilen 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenil)propanamit **(MMH-1)** ile morfolin bazik ortamda (piridin) reaksiyona konulmuştur. Sentez işlemleri Bölüm 3.2.3.'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Elde edilen bileşik DCM/THF (5/3) çözeltisinde, ince tabaka kromatografi'si (TLC) ile 256 nm ve 366 nm de UV lambası altında kontrol edilmiş ve tek nokta olduğu görülmüştür. Ayrıca, elde edilen bileşik tek erime noktasına da sahiptir. Bileşiklerin elde edilmiş verileri incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile önerilen yapının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür (Ek 1-4).

S-1 maddesinin **IR** spektrumu U-ATR ile alınmıştır ve Ek Şekil 1.3' de verilmiştir. Alınan spektrum değerlerinin bileşiğin yapısını desteklediği gözlemlenmiştir. 3339 ve 3308 cm^{-1}'de görülen pikler (NH_2) grubundan kaynaklanan piklerdir. 3219 cm^{-1} değerinde gözlenen pik amitteki N-H' tan kaynaklanan piktir. (Ar-C-H) grubundaki C-H 'tan kaynaklanan pik 3089 cm^{-1}'de gözlemlenmiştir. Alifatik (C-H)' lardan kaynaklanan pikler 2960 ve 2830 cm^{-1}'de gözlemlenmişitr. 1652 cm^{-1}'de amitteki (C=O) 'dan kaynaklanan pik gözlemlenmiştir.Asimetrik (S=O)'dan kaynaklanan pik 1336 cm^{-1}'de gözlemlenirken 1159 cm^{-1}'de simetrik (S=O) kaynaklanan pik gözlemlenmiştir.

S-1 bileşiğinin **^{1}H-NMR** spektrumu DMSO içinde alınmış ve Ek Şekil 2.3'te verilmiştir. Alınan spektrumun bileşiğin yapısını desteklediği görülmüştür. Spekrum incelendiğinde (-CONH)grubundaki protondan kaynaklı singlet pikin 10.10 ppm'de görüldüğü gözlemlenmiştir. Aromatik protonlardan kaynaklanan (-Ar-H) pikler 7.78-7.80 ppm ve 7.72-7.74 ppm'de gözlemlenmiştir.7.23 ppm'de ($–SO_2NH_2$) grubundaki protonlardan kaynaklanan singlet pik gözlemlenmiştir.3.58-3.61 ppm'de çıkan pik ise ($-CH_2-O-CH_2$) grubundaki protonlardan kaynaklanmıştır. (-N-C<u>H</u>-CH_3) grubundaki C-H 'tan kaynaklanan pik ise 3.21-3.27 ppm'de gözlemlenmiştir.2.51-2.60 ppm'de görülen pikler ise ($-CH_2-N-CH_2$) grubunda bulunan protonlardan kaynaklanmıştır.($-CH_3$) metil grubundaki protonların ise 1.17-1.18 ppm'de pik verdiği görülmüştür.

S-1 bileşiğinin **^{13}C-NMR** spektrumu DMSO içinde alınmış olup Ek şekil 3.3'te verilmiştir. Alınan spektrumun bileşiğin yapısını desteklediği görülmüştür. Spektrum incelendiğinde 172.16 ppm'de görülen pikin (C=O) grubundaki karbondan kaynaklandığı görülmüştür. Aromatik halkadaki -NH grubuna bağlı olan karbon atomunun (Ar-<u>C</u>-NH-) 142.03 ppm'de kimyasal kayma verdiği gözlemlenmiştir.138.92 ppm'de görülen pik ise benzen halkası ve ($–SO_2NH_2$) grupları arasındaki karbondan kaynaklanan piktir. Benzen halkasındaki karbonlardan kaynaklanan pikler ise 127.01 ppm'de ($–SO_2NH_2$) grubuna göre orto durumundaki karbonlardan 119.46 ppm'de ise meta konumuda bulunan karbonlardan kaynaklı

pikler gözlemlenmiştir. (CH_3-CH-N) grubundaki karbondan kaynaklı pik ise 66.78 ppm'de gözlemlenmiştir. 64.17 ppm'de görülen pik ise (CH_2-O-CH_2) durumundaki karbonlardan kaynaklanmıştır. 50.08 ppm'de görülen pik (CH_2-N-CH_2) grubundaki karbon atomlarından kaynaklanmaktadır. (CH_3) metil grubundan kaynaklanan pik ise 12.97 ppm değerinde gözlemlenmiştir.

S-1 bileşiğinin **LC-MS/MS** spektrumu alınmış ve Ek şekil 4.1 'de verilmiştir. En şiddetli pik 314.10 m/z değerinde gözlemlenmiştir. Bu durumda molekül ağırılığı 314.10 'dur.

4.1.4. 2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit (S-2)

2-Morfolino-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(S-2)** bileşiğini sentezlemek için 1. basamakta elde edilen 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(MMH-2)** ile morfolin bazik ortamda (piridin) reaksiyona konulmuştur. Sentez işlemleri Bölüm 3.2.4.'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Elde edilen bileşik DCM/THF (5/3) çözeltisinde, ince tabaka kromatografi'si (TLC) ile 256 nm ve 366 nm de UV lambası altında kontrol edilmiş ve tek nokta olduğu görülmüştür. Ayrıca, elde edilen bileşik tek erime noktasına da sahiptir. Bileşiklerin elde edilmiş verileri incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile önerilen yapının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür (Ek 1-4).

S-2 bileşiğinin **IR** spektrumu U-ATR ile alınmış olup Ek şekil 1.4'te verilmiştir.Alınan spektrumun bileşiğin yapısıyla uygun olduğu gözlemlenmiştir.Buna göre 3338 ve 3320 cm^{-1} değerinde gözlenen pikler (NH_2) grubundan kaynaklanmaktadır. 3210 cm^{-1}'de görülen pik amitin N-H pikidir. 3102 cm^{-1}'de (Ar-C-H) grubundaki C-H 'tan kaynaklanan piktir. 2982 ve 2835 cm^{-1}'de görülen pikler alifatik C-H'tan kaynaklanan piklerdir. 1630 cm^{-1}'de görülen pik amit grubundaki (C=O) 'dan kaynaklanan piktir. 1338 cm^{-1}'de asimetrik (S=O), 1162 cm^{-1}'de ise simetrik (S=O)'dan kaynaklanan pikler görülmüştür.

S-2 bileşiğinin **^{1}H-NMR** spektrumu DMSO içinde alınmış olup Ek şekil 2.4'te verilmiştir. Alınan bu spektruma göre 7.81 ppm'de görülen singlet pikin (-CONH)

grubundaki protondan kaynaklandığı gözlemlenmiştir. Aromatik protonlardan kaynaklanan piklerin 7.71 - 7.69 ppm ve 7.37-7.35 ppm aralığında görüldüğü gözlemlenmiştir. 7.28 ppm'de görülen singlet pikin ($-SO_2NH_2$) grubundaki protonlardan kaynaklandığı gözlemlenmiştir. 3.73-3.71 ppm 'de görülen pikler ($N-CH_2$) grubundaki protonlardan kaynaklanan piklerdir. 3.38-3.33 ppm'de görülen pik ($-N-C\underline{H}-CH_3$) grubundaki protondan kaynaklanmıştır. 3.06-3.04 ppm'de görülen duplet pik ($Ar-C\underline{H}_2$) grubundaki protondan kaynaklanmıştır. ($-C\underline{H}_2-O-C\underline{H}_2$) grubundaki protonlardan kaynaklı pikler 2.83-2.78 ppm değerinde gözlemlenmiştir. 2.31 ve 2.22 ppm değerinde ($-C\underline{H}_2-N-C\underline{H}_2$) grubundaki protonlardan kaynaklanan pikler görülmüştür. 1.02 ve 1.00 ppm değerinde ise ($-CH_3$) grubundaki protonlardan kaynaklanmıştır.

S-2 bileşiğinin **^{13}C-NMR** spektrumu DMSO içinde alınmış olup Ek şekil 3.4'te verilmiştir. Alınan spektrumun bileşiğin yapısı ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Alınan spektrum incelendiğinde 172.60 ppm değerinde (C=O) grubundaki karbondan kaynaklanan piklerdir. 144.07 ppm'de ($Ar-\underline{C}-NH-$) grubundaki aromatik halkadaki N-H'a bağlanan karbon atomundan kaynaklanmaktadır. 142.47 ppm'de ($Ar-\underline{C}-SO_2NH_2$) grubunda bulunan karbon atomundan kaynaklanmaktadır. 129.59 ve 126.02 ppm'de aromatik halkadaki karbonlardan kaynaklanan pikler görülmüştür. 66.68 ppm değerinde ($CH_3-\underline{C}H-N$) grubundaki karbondan kaynaklanan pik görülmüştür.63.92 ppm'de ($\underline{C}H_2-O-\underline{C}H_2$) grubundaki karbonlardan kaynaklanan pik görülmüştür. ($\underline{C}H_2-N-\underline{C}H_2$) grubundaki karbonlardan kaynaklanan pikler ise 50.27 ppm'de görülmüştür. 39.63 ppm'de görülen (CH_2-NH-)grubundaki karbon atomundan kaynaklanmıştır. 35.11 ppm'de görülen pik ($Ar-CH_2$) grubundaki karbondan kaynaklanmıştır. 13.47 ppm'de ($-CH_3$) grubundaki karbon atomundan kaynaklanan pik görülmüştür.

S-2 bileşiğinin **LC-MS/MS** spektrumu alınmış ve Ek şekil 4.2'de verilmişitir. Alınan spektrum incelendiğinde bileşiğin mol ağırlığının 342.10 m/z olduğu görülmüştür.

4.2. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Çalışmaları

Pozitif kontrol olarak kullanılan kemoterapik madde 5-Fu (5- florourasil) ve sentezlenen bileşiklerin aşağıdaki hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT metoduyla ölçülmüştür.

- PC3 *(İnsan Prostad Kanseri Hücre Hattı)*
- HT-29 *(İnsan Kolon Kanser Hücre Hatları)*
- HeLa *(İnsan Servikal (Rahim Ağzı) Kanser Hücre Hatları)*
- DLD-1 *(İnsan Kolon Kanser Hücre Hatları)*
- ECC-1 *(İnsan Rahim İçi Kanser Hücre Hatları)*
- DU-145 *(İnsan Prostad Kanseri Hücre Hattı)*
- PNT1-A *(Normal Prostad Epitel Hücre Hattı)*
- HEK-293 *(Normal İnsan Emriyonik Böbrek Hücre Hattı)*

Her hücre hattı, 37°C'de, 48 saat boyunca bileşikler ve kemoterapik maddelerin 0, 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM dozları eklendikten sonra inkübe edilmiştir. Daha sonra, IC_{50} değerlerini saptamak için MTT analizleri yapılmıştır. Her analiz ve her bir hücre hattı için üç well plate kullanılarak, üç bağımsız analizden gelen veriler değerlendirilmiştir. Kemoterapik madde ve bileşik ilave edilmeyen (0µM) kontrol grubu hücrelerinin canlılığı %100 kabul edildi ve diğer örneklere ait canlılık değerleri oransal olarak absorbans değerlerinden hesaplandı.

Sentezlenen **S-1** ve **S-2** bileşikleri ve kemoterapik madde olan (**5-Fu**) bileşiğinin normal ve kanser hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT ile incelenmesi sonucu IC_{50} değerleri elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara incelendiğinde **S-1** ve **S-2** bleşiği ve sülfanilamit PC3 maddesi üzerinde yeterli sitotoksik etki göstermemiştir. HT-29 üzerinde sülfanilamit etki göstermezken **S-1** ve **S-2** bileşikleri az da olsa sitotoksik etki göstermiştir. Hela maddesi üzerinde sülfanilamit, **S-1** ve **S-2** bileşikleri etki göstermemiştir. DLD-1 ve ECC-1 üzerinde sülfanilamit kemoterapik maddeden daha fazla sitotoksik etki gösterirken **S-1** ve **S-2** bileşikleri yeterli etki gösterememiştir.

DU-145 maddesi üzerinde sülfanilamit etki göstermezken **S1** ve **S2** bileşikleri düşük düzeyde sitotoksik etki göstermişitr. PNT1-A normal hücre hattı üzerinde **S1** bileşiği ve sülfanilamit etki göstermezken **S2** bileşiği kemoterapik maddeden (5-Fu) daha fazla etki göstermiştir ki buda normal hücre hattı üzerinde olmaması gereken bir etkidir. Aynı durumda HEK-293 normal hücre üzerinde ise sülfanilamit ve **S1** bileşiği yeterli etkiyi gösteremezken yine **S2** bileşiği kemoterapik maddeden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir ki buda normal hücre hattı üzerinde olmaması gereken bir etkidir.

Çizelge 4. 1. Bileşiklerin hücreler üzerindeki IC_{50} (µM) değerleri.

	IC_{50} (µM)[a,b]				
	5-Fu	**Sülfanilamit**	**4-AEBS**	**S-1**	**S-2**
PC3	45.20	>500	>500	>500	>500
HT-29	23.40	>500	>500	**231**	**204**
HeLa	19.20	>500	**111**	>500	>500
DLD-1	50.90	**36.19**	>500	>500	>500
ECC-1	30.20	**23.63**	>500	>500	>500
DU-145	37.40	>500	**354**	**273**	**116**
PNT1-A	142.10	>500	**340**	>500	**139**
HEK-293	65.30	>500	>500	>500	**42**

[a] Değerler üç bağımsız deneyin sonuçlarıdır.
[b] IC_{50} değerleri 48 saat sonunda ölçülmüştür.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Aromatik veya heterosiklik sülfonamit bileşiklerinin ($-SO_2NH_2$) karbonik anhidraz enzimine (hCA) karşı güçlü inhibe etkisi olduğu görülmüştür (Mann ve Keilin 1940; Maren, 1967; Supuran ve Scozzafava, 2007). Sülfonamitler başlıca antibakterial, antitümör, diüretik, hipoglisemik, antitiroid, yada proteas inhibitör aktivite ilaçları olarak kulanılmaktadır (Casini ve ark., 2002; Supuran ve ark. 2003a, 2003b).

Yapılan bu çalışmada; birinci basamakta; sülfanilamit (4-Aminobenzensülfonamit) ile bazik ortamda (piridin) 2-Bromopropionilbromit'in reaksiyonu sonucu 2-bromo-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit **(MMH-1)** sentezlenmiştir. Yine aynı yöntemle, 2-bromo-N-(4-sulfamoilfenetil)propanamit **(MMH-2)** bileşiği tetrahidrofuran içerisinde, 2-Bromopropionil bromit ile 4-(2-aminoetil)benzensülfonamit bazik ortamda (piridinli ortam) reaksiyonu sonucu sentezlenmiştir.

İkinci basamakta ise **MMH-1** bileşiğinin morfolin ile tepkimesiyle 2-morfolino-N-(4-sülfamoilfenil)propanamit **(S-1)** ; **MMH-2** bileşiğinin morfolin ile tepkimesinden 2-morfolino-N-(4-sülfamoilfenetil)propanamit **(S-2)** sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları FT-IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, Kütle spektroskopisi ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatılmıştır(Ek 1-4).

Yaptığımız bu çalışmada, antikanser özellik gösterdiği bilinen sülfonamit içeren bileşiklerin bazı türevleri sentezlenmiş ve kanser ve normal hücre hatları üzerinde bu bileşiklerin sitotoksite aktiviteleri incelenmiştir. Kanser tedavi seçeneklerinden biri olan kemoterapide farklı kimyasal yapıda birçok ilaç kullanılmaktadır. Mevcut ilaçların önemli yan etkileri, terapötik yetersizlikleri, etkide seçicilik sorunları ve ilaçlara karşı gelişen direnç nedeniyle bu alanda araştırma ve geliştirme çalışmaları tüm dünyada yoğun olarak sürdürülmektedir. Bu çalışmada medisinal kimyada ilaç bulma yöntemleri arasında kabul edilen birden çok aktif

bileşiğin aynı molekülde birleştirilmesi kuralı dikkate alınarak antikanser aktivitesi yüksek yeni kemoterapi adayı bileşiklerin ortaya çıkacağı düşünülmüştür.

Çalışma sonucunda sentezlenen bileşiklerin kanser hücreleri üzeride olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda; sentezlenen **S-1** ve **S-2** bileşikleri ve kemoterapik madde olan (**5-Fu**) bileşiğinin normal ve kanser hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara incelendiğinde **S-1** ve **S-2** bleşiği ve sülfanilamit PC3 maddesi üzerinde yeterli sitotoksik etki göstermemiştir. HT-29 üzerinde sülfanilamit etki göstermezken **S-1** ve **S-2** bileşikleri az da olsa sitotoksik etki göstermiştir. Hela maddesi üzerinde sülfanilamit, **S-1** ve **S-2** bileşikleri etki göstermemiştir. DLD-1 ve ECC-1 üzerinde sülfanilamit kemoterapik maddeden daha fazla sitotoksik etki gösterirken **S-1** ve **S-2** bileşikleri yeterli etki gösterememiştir. DU-145 maddesi üzerinde sülfanilamit etki göstermezken **S1** ve **S2** bileşikleri düşük düzeyde sitotoksik etki göstermişitr. PNT1-A normal hücre hattı üzerinde **S1** bileşiği ve sülfanilamit etki göstermezken **S2** bileşiği kemoterapik maddeden (5-Fu) daha fazla etki göstermiştir ki buda normal hücre hattı üzerinde olmaması gereken bir etkidir. Aynı durumda HEK-293 normal hücre üzerinde ise sülfanilamit ve **S1** bileşiği yeterli etkiyi gösteremezken yine **S2** bileşiği kemoterapik maddeden daha fazla sitotoksik etki göstermiştir ki buda normal hücre hattı üzerinde olmaması gereken bir etkidir.

Bu konunun son zamanlarda ilgi çekici ve gelişmeye çok açık olduğu göz önünde bulundurulduğundan, bu çalışma kapsamında yapılmış olan çalışma sonuçlarının da çok önemli olacağı, geliştirilebilir ve daha sonraki çalışmalara da ışık tutabilir, literatürdeki boşlukları doldurabilir, disiplinler arası ve farklı bilimsel ve teknolojik alanlarda kullanılabilme özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ulusal ve/veya uluslararası seminerlerde sunulacak ve uluslararası bilimsel bir yayın organında yayınlanacaktır. Ayrıca bu çalışmanın daha sonra yapılacak olan daha kapsamlı bilimsel çalışmalara da yardımcı olacağı açıktır.

KAYNAKLAR

ADKINS, J. and FAULDS, D., 1998. Amprenavir. Drugs, 55(6): 837-842.

ARSLAN, O., 2001. Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds. Biochemistry (Moscow), 66 (9): 1206-1208.

BECKER, B., 1954. Decrease in intraocular pressure in man by carbonic anhydrase inhibitor Diamox. Am J Ophthalmol, 37: 13-25.

BERTOUT, J. A., PATEL, S. A., and SİMON, M. C. 2008. The impact of O_2 availability on human cancer. Nature Reviews Cancer, 8(12): 967.

BRZOZOWSKI, Z., SŁAWIŃSKI, J., GDANIEC, M., INNOCENTI, A. and SUPURAN, C. T., 2011. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis, molecular structures, and inhibition of the human cytosolic isozymes I and II and transmembrane isozymes IX, XII (cancer-associated) and XIV with novel 3-pyridinesulfonamide derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, 46: 4403-4410.

CAREY F.A., 2003. Organic Chemistry. 5th Edition, University of Virginia Charlotesvilke, Mcgraw Hill Higher Education, 1191p.

CARTA, F., MARESCA, A., SCOZZAFAVA, A., VULLO, D. and SUPURAN, C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Diazenylbenzenesulfonamides are potent and selective inhibitors of the tumor-associated isozymes IX and XII overthe cytosolic isoforms I and II. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17: 7093–7099.

CASINI, A., SCOZZAFAVA, A., MASTROLORENZO, A. and SUPURAN, C. T. 2002. Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. Current Cancer Drug Targets. 2(1) 55-75.

CECCHI, A., WINUM, J. Y., INNOCENTI, A., VULLO, D., MONTERO, J. L., SCOZZAFAVA, A. and SUPURAN, C. T., 2004. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides derived from 4-isothiocyanato-benzolamide. Bioorg. Med. Chem. Lett., 14 (23): 5775-5780.

CHEGWIDDEN, W. R.; SPENCER, I. M. 1995. Sulphonamide Inhibitors of Carbonic Anhydrase Inhibit the Growth of Human Lymphoma Cells in Culture. Inflammopharmacol., 3: 231-239.

COLEMAN, J.E., 1998. Zinc Enzymes. Curr. Opin. Chem. Biol, (2): 222-234.

CRIBB, A.E., LEE, B.L., TREPANIER, L.A. and SPIELBERG, S. P., 1996. Adverse reactions to sulphonamide and sulphonamide-trimethoprim antimicrobials: clinical syndromes and pathogenesis. Adverse Drug React Toxicol Rev., 15(1): 9-50.

DOMAGK, G., 1935. Eine neue Klasse von Desininfektionsmitten. Dt Med Wocheschr, 61(21): 829-832.

DURGUN, M. 2014. Bazı Yeni Sülfonamit Türevlerinin Sentezi, Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi Ve Kantitatif Yapı – Etki İlişkilerinin (QSAR) Değerlendirilmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Şanlıurfa, 223s.

DURGUN, M., 2005. Glokom Tedavisinde kullanılan yeni Sülfanilamit Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 83s.

DURGUN, M., TURKMEN, H., CERUSO, M., SUPURAN, C. T. 2015. Synthesis of Schiff base derivatives of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonamide with inhibitory activity against carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 25(11): 2377-2381.

DURGUN, M., TURKMEN, H., CERUSO, M., SUPURAN, C. T. 2016. Synthesis of 4-sulfamoylphenyl-benzylamine derivatives with inhibitory activity against human carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 24(5): 982-988.

DURGUN, M., TURKMEN, H., ZENGİN, G., ZENGİN, H., KOYUNSEVER, M., and KOYUNCU, I. 2017. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and antimicrobial investigation and evaluation of physicochemical properties of novel 4-(2-methylacetamide) benzenesulfonamide derivatives. Bioorganic chemistry, 70:163-172.

HUANG, D., Li, C., and ZHANG, H. 2014. Hypoxia and cancer cell metabolism. Acta Biochim Biophys Sin, 46(3): 214-219.

ISIK, K. and OZDEMĠR KOCAK, F., 2009. Antimicrobial activity screening of some sulfonamide erivatives on some Nocardia species and isolates. Microbiological Research, 164(1): 49-58.

KEHA, E. E. ve KÜFREVİOGLU, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, İstanbul, 642 s.

LINDSKOG, S. and SILVERMAN D. W., 2000. The Catalytic Mechanism of Mammalian Carbonic Anhydrases. In: Chegwidden WR, Edwards Y, Carter N, editors. The carbonic anhydrases—New Horizons; Basel: Birkha¨user Verlag; 175–196.

MANN, T. and KEILIN, D., 1940. Sulphanilamide as a Specific Carbonic Anhydrase Inhibitor. Nature, 146:164–165.

MAREN, T. H., 1995. The Development of Topical Carbonic Anhydrase Inhibitors. J. Glaucoma, 4:49-62.

MAREN, T.H., 1967. Carbonic anhydrase: Chemistry, Physiology and Inhibition. Physiol Rev., 47: 595–781.

METE, E., COMEZ, B., INCİ GUL, H., GULCİN, I., & SUPURAN, C. T. 2016. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory activities of new thienyl-substituted pyrazoline benzenesulfonamides. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 31(sup2): 1-5.

MİRİAN, M., ZARGHİ, A., SADEGHİ, S., TABARAKİ, P., TAVALLAEE, M., DADRASS, O., & SADEGHİ-ALİABADİ, H. (2011). Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel sulfonamide derivatives against a few human cancer cells. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10(4), 741.

MOHAMED, S. S., TAMER, A. R., BENSABER, S. M., JAEDA, M. I., ERMELI, N. B. & ALLAFI, A. A., MREMA, I. A., ERHUMA, M., HERMANN, A. and GBAJ, A. M., 2013. Design, synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of sulfanilamide-imines derivatives as potential anticancer agents. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 386: 813–822.

MOSMANN, T.J. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 65(1-2): 55-63.

OZBEK, N., KATIRCIOGLU, H., KARACAN, N. and BAYKAL, T., 2007. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of new aliphatic sulfonamide. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15:5105–5109.

PARKKILA, S.; RAJANIEMI, H.; PARKKILA, A. K.; KIVELA, J.; WAHEED, A.; PASTOREKOVA, S.; PASTOREK, J.; SLY, W. S. 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitor Suppresses Invasion of Renal Cancer Cells In Vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:2220-2224.

PASTOREKOVA, S., PARKKILA, S., PASTOREK, J. and SUPURAN, C.T., 2004. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. J. Enzym. Inhib. Med. Chem., 19(3): 199–229.

PENNING, T. D., TALEY, J. J. and BERTENSHAW, S. R., 1997. Synthesis of 4-[5-substituted orunsubstitutedphenyl)-3-substituted-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamides. J. Med. Chem., 40:1347-1365.

RAMI, M., INNOCENTI, A., MONTERO, J.L., SCOZZAFAVA, A., WINUM, J.Y. and SUPURAN, CT., 2011. Synthesis of rhodamine B–benzenesulfonamide conjugates and their inhibitory activity against human *alpha* and bacterial/fungal *beta*-carbonic anhydrases. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21: 5210–5213.

REN, J., WANG, Y., WANG, J., LİN, J., WEİ, K., HUANG, R. 2013. Synthesis and antitumor activity of N-sulfonyl-3, 7-dioxo-5β-cholan-24-amides, ursodeoxycholic acid derivatives. Steroids, 78(1):53-58.

ROUGHTON, F. J. W. and BOOTH, V. H., 1946. The Effect of Substrate Concentrataion pH and Other Factors Upon the Activity of Carbonic Anhydrase. J. Biochem., 40: 319-330.

SUPURAN, C. T.; SCOZZAFAVA, A. 2000. Carbonic Anhydrase Inhibitors and their Therapeutic Potential. Exp. Opin. Ther. Patents, 10: 575-600.

SUPURAN, C.T. and SCOZZAFAVA, A., 2007. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15: 4336–4350.

SUPURAN, C.T., and SCOZZAFAVA, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Curr. Med.chem., 363 (1): 61-97.

SUPURAN, C.T., CASINI, A. and SCOZZAFAVA, A., 2003b. Protease Inhibitors of the Sulfonamide Type: Anticancer, Anti-inflammatory, and Antiviral Agents. Medicinal Research Reviews, 23(5): 535-558.

SUPURAN, C.T., SCOZZAFAVA, A. and CASINI, A., 2003a. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Medicinal Research Reviews, 23 (2): 146-189.

TEICHER, B. A., LİU, S. D., LİU, J. T., HOLDEN, S. A., & HERMAN, T. S. 1993. A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. Anticancer research, 13(5A):1549-1556.

TURKMEN, H., DURGUN, M., YİLMAZTEKİN, S., EMUL, M., INNOCENTİ, A., VULLO, D., SCOZZAFAVA, A., SUPURAN, C. T. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors. Novel sulfanilamide/acetazolamide derivatives obtained by the tail approach and their interaction with the cytosolic isozymes I and II, and the tumor-associated isozyme IX. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, *15*(2): 367-372.

URL-1, World Health Organization: WHO, globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Erişim Tarihi: 4 Eylül 2016.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Seda TÜRKOĞLU
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa/01.08.1980
Telefon : 05435064576
Faks :
e-mail : mrynztrkgl1@hotmail.com

EĞİTİM

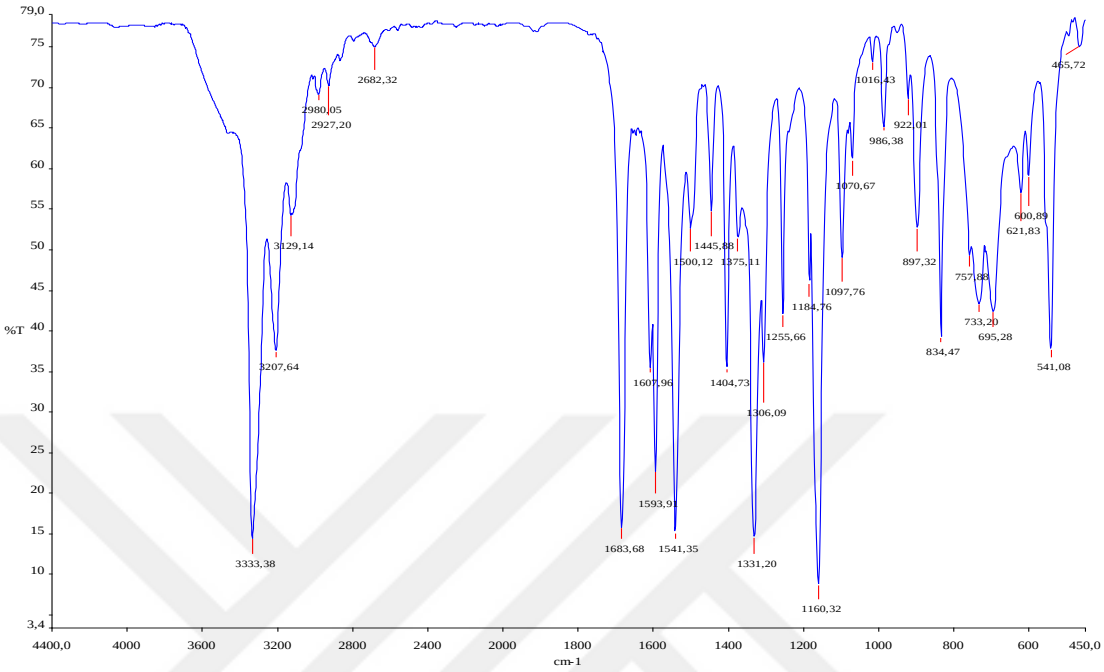
Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Çağrı Bey Lisesi-Çukurova Adana	1997
Üniversite	: Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Şanlıurfa	2001
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Şanlıurfa	2018

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2007	Final Eğitim kurumları	Kimya Öğretmeni
2014	Milli Eğitim Bakanlığı	Kimya Öğretmeni

EKLER

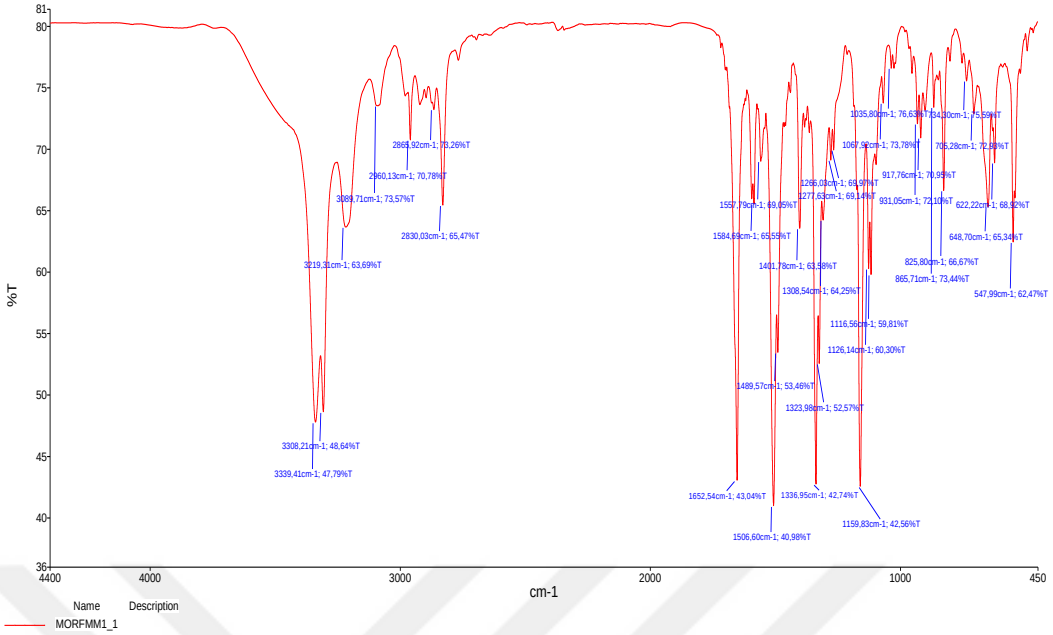
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT-IR Spektrumları



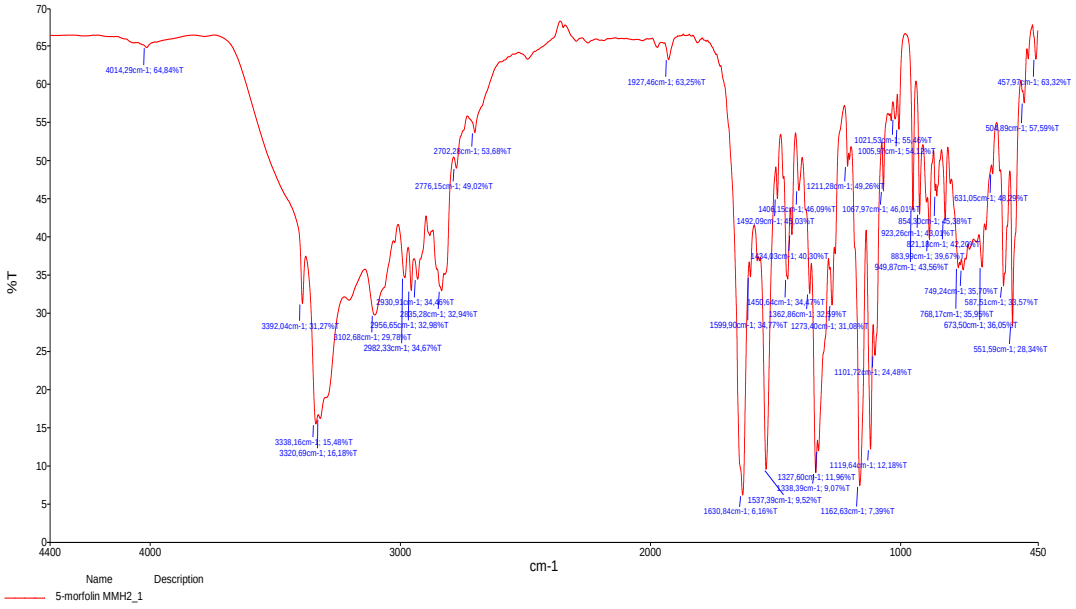
Ek Şekil 1. 1. MMH-1 bileşiğinin FT-IR spektrumu



Ek Şekil 1.2. MMH-2 bileşiğinin FT-IR spektrumu

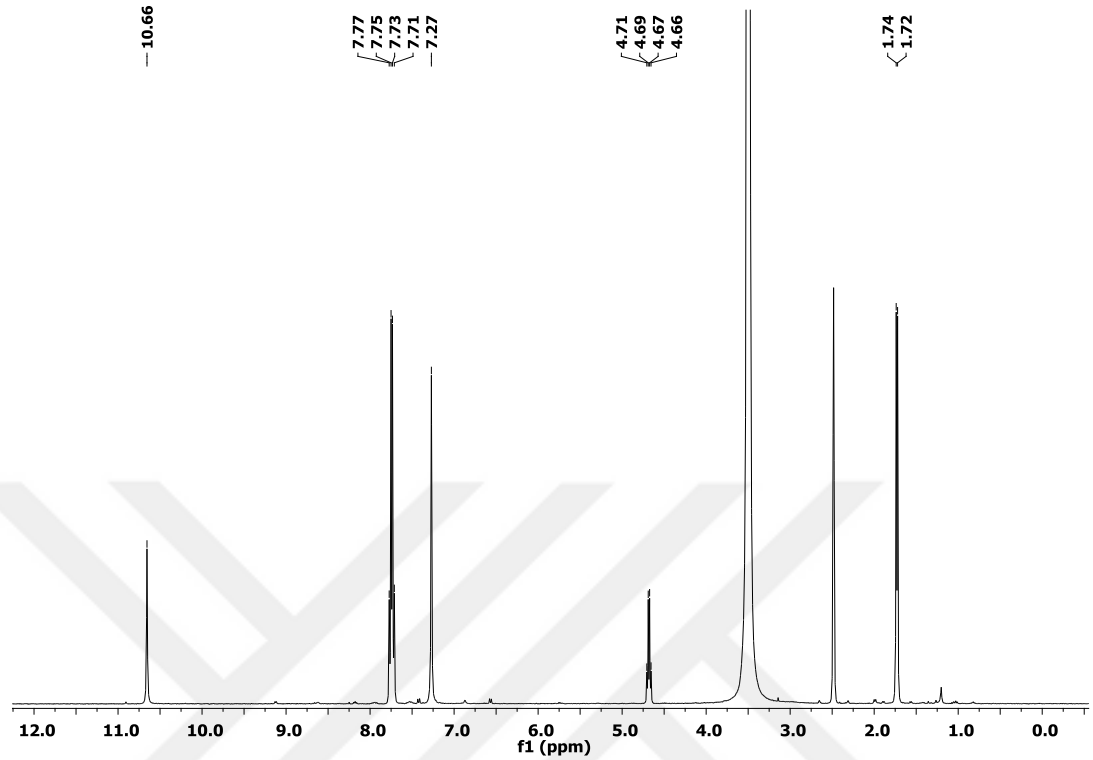


Ek Şekil 1.3. S-1 bileşiğinin FT-IR spektrumu

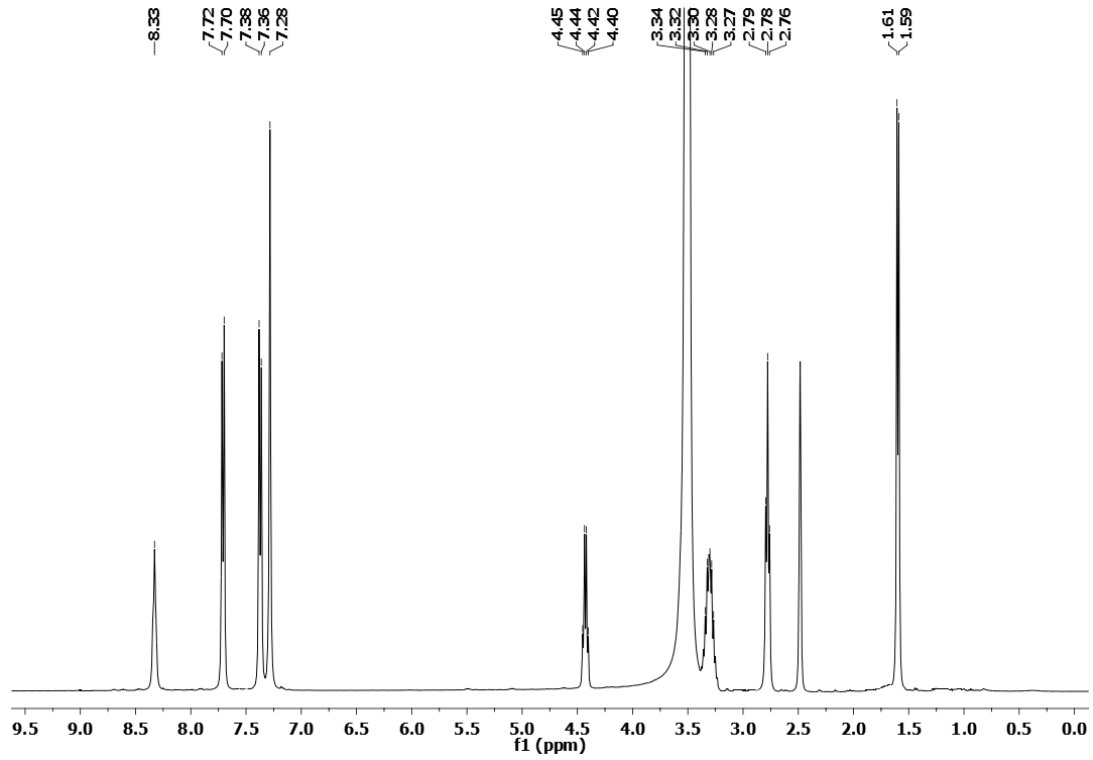


Ek Şekil 1.4. S-2 bileşiğinin FT-IR spektrumu

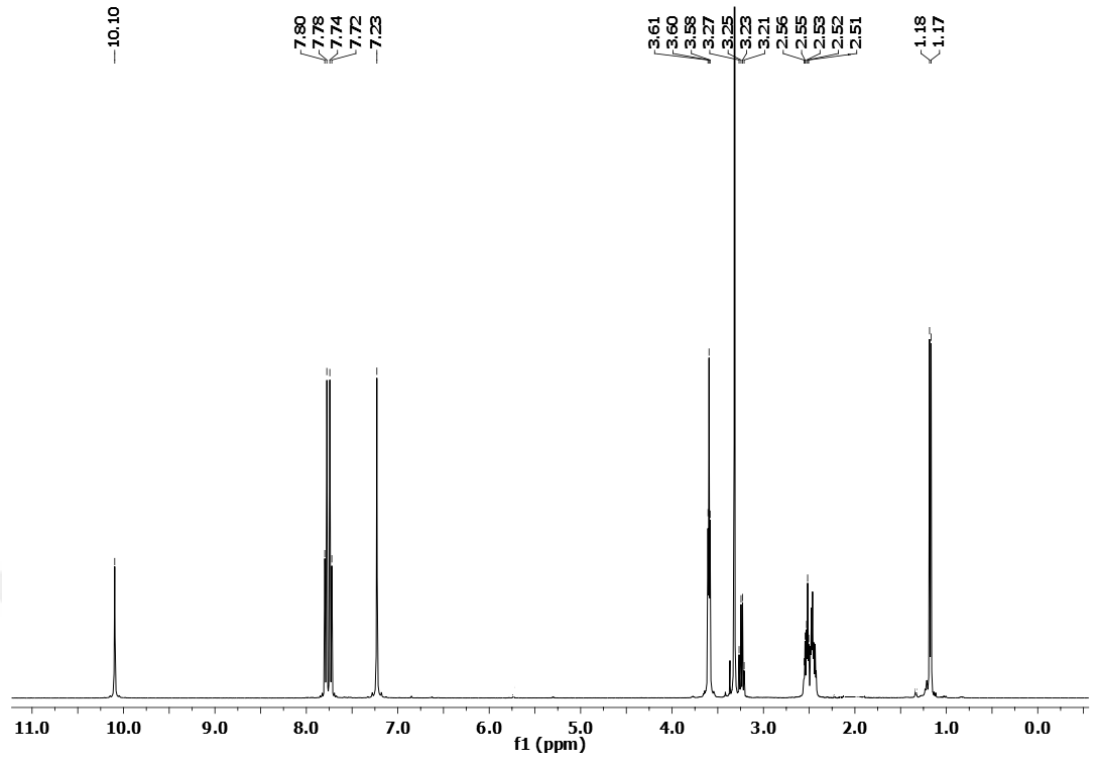
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin ^{1}H NMR Spektrumları



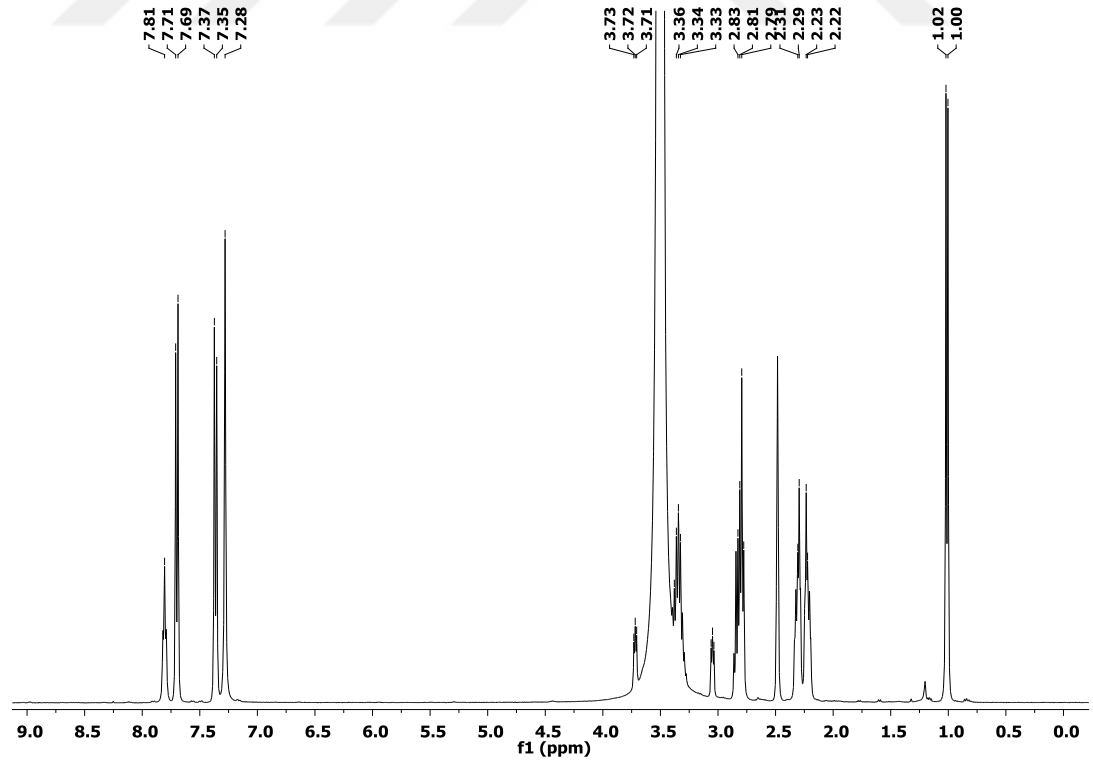
Ek Şekil 2.1. MMH-1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu



Ek Şekil 2.2. MMH-2 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

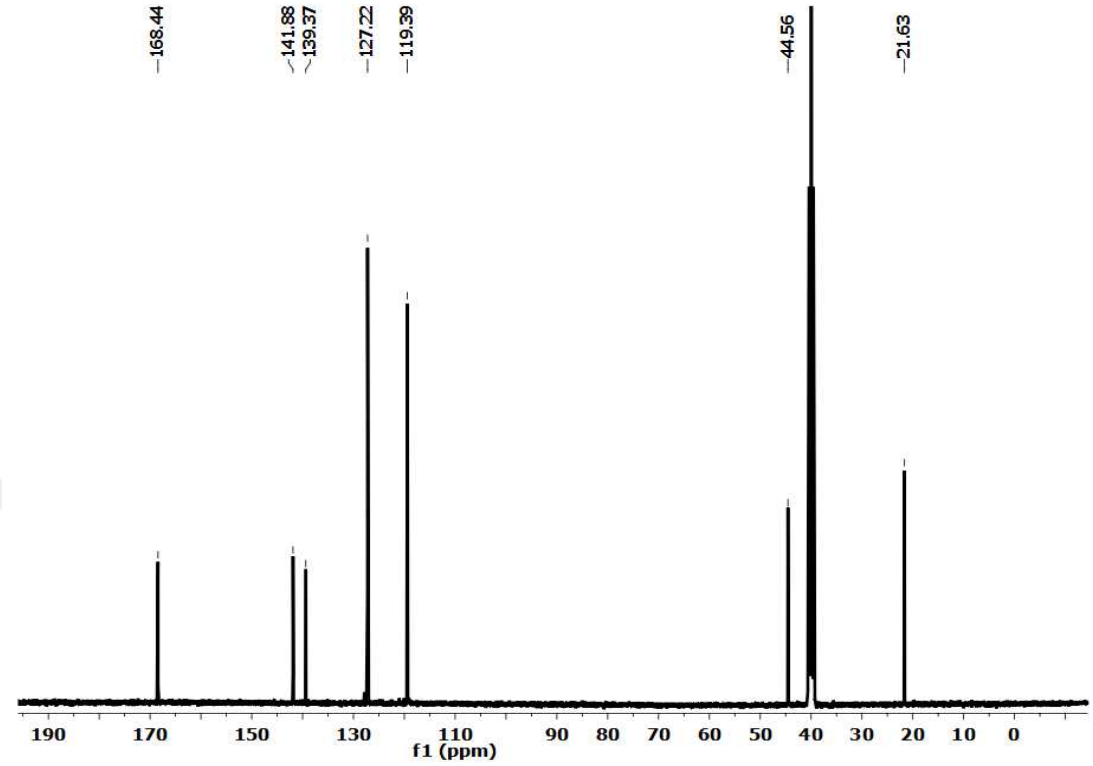


Ek Şekil 2.3. S-1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

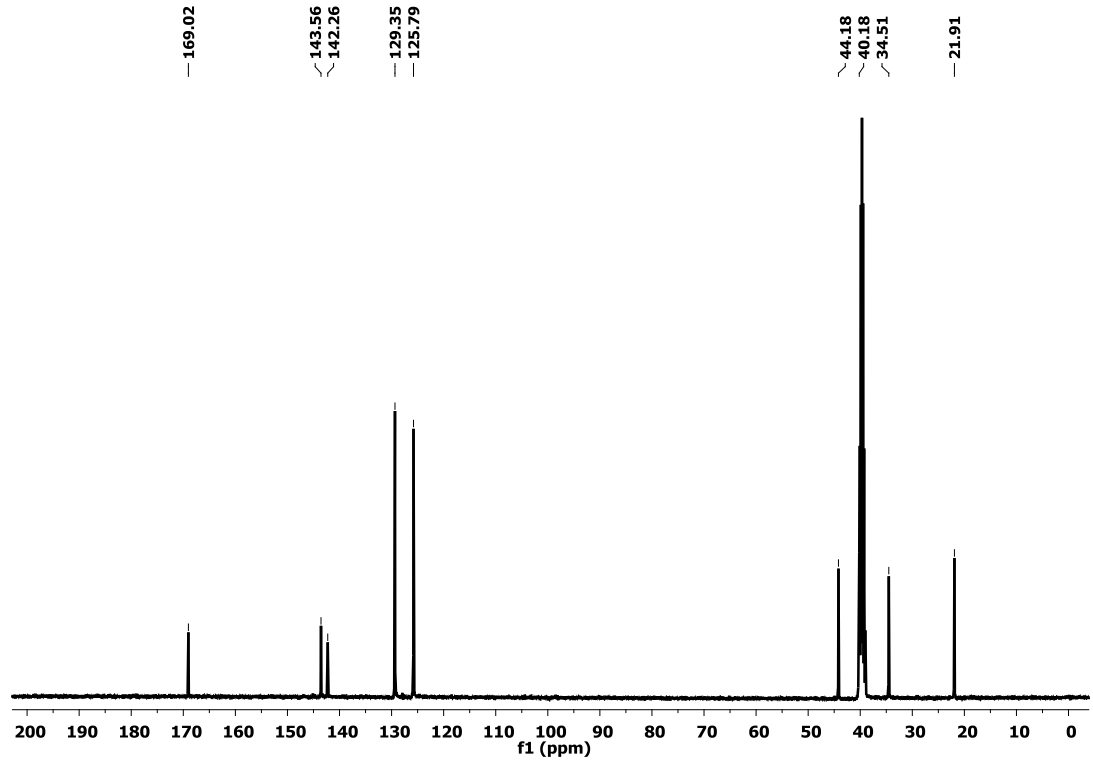


Ek Şekil 2.4. S-2 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

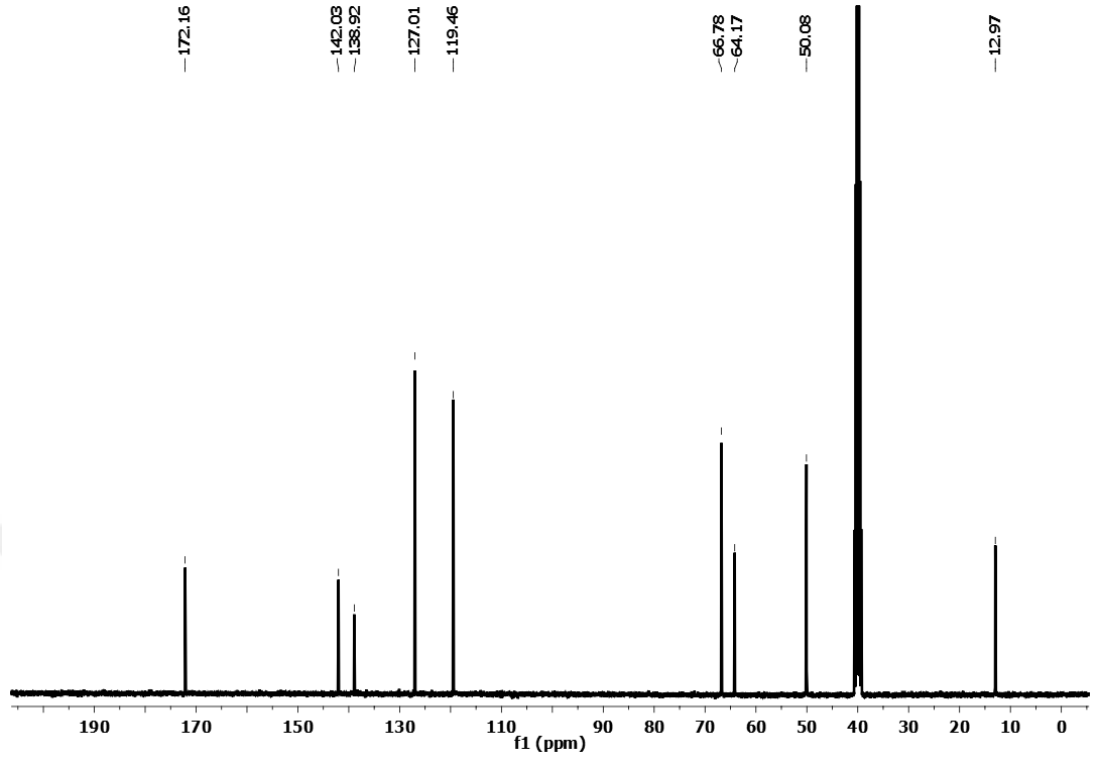
EK 3 Sentezlenen Bileşiklerin ^{13}C NMR Spektrumları



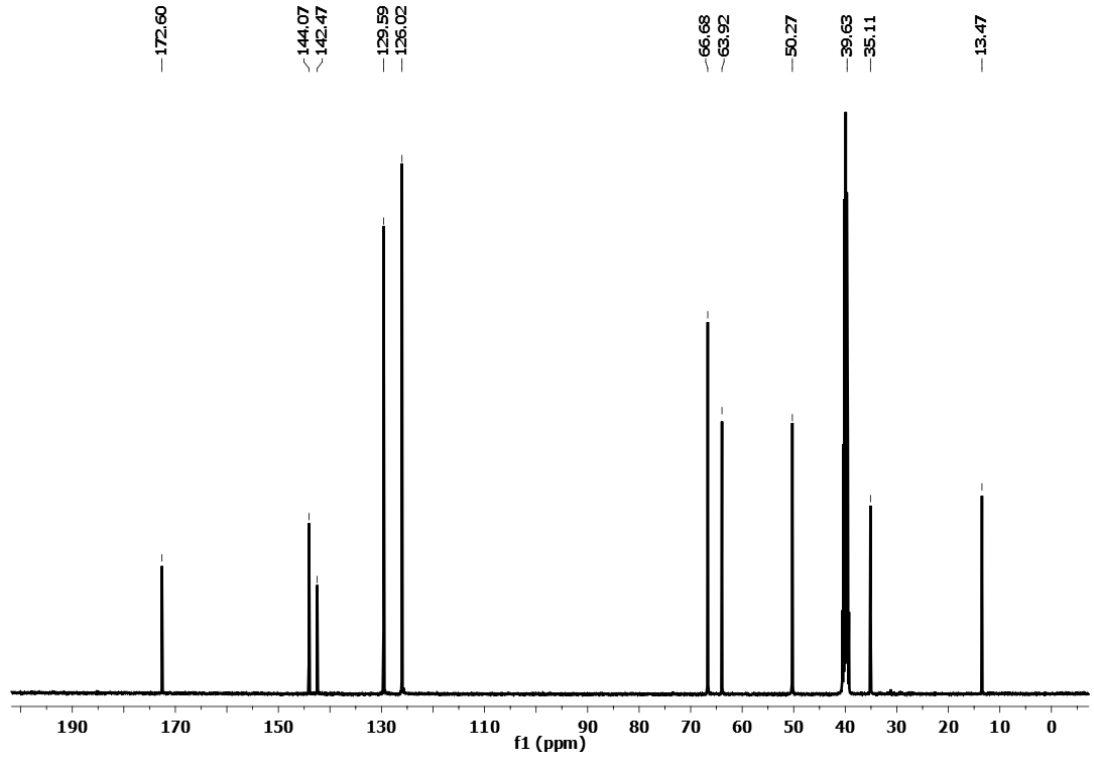
Ek Şekil 3.1. MMH-1 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu



Ek Şekil 3.2. MMH-2 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

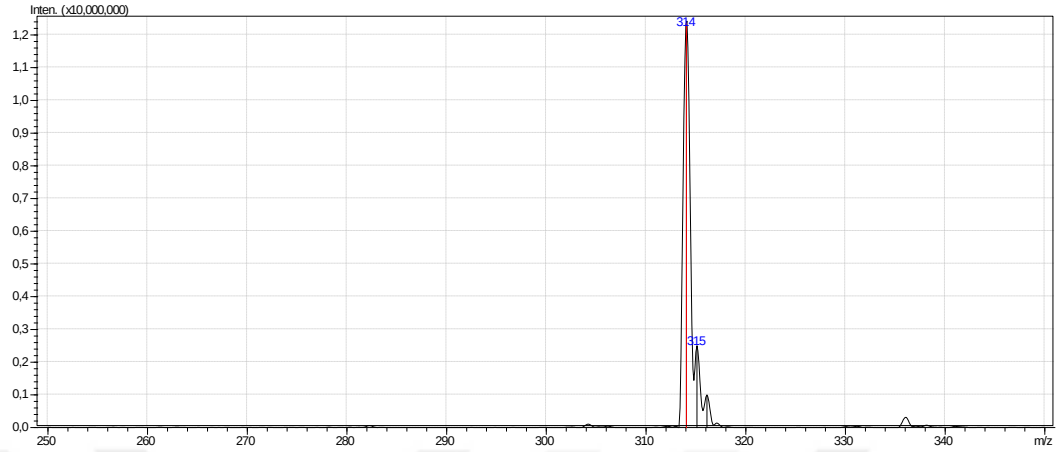


Ek Şekil 3.3. S-1 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

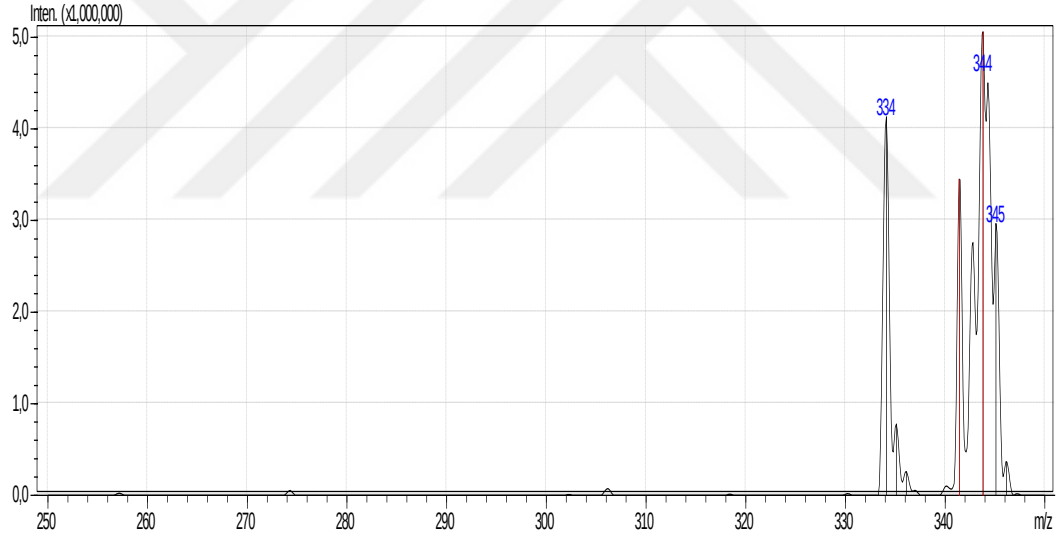


Ek Şekil 3.4. S-2 bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

EK 4 Sentezlenen Bileşiklerin LC-MS/MS Spektrumları



Ek Şekil 4.1. S-1 bileşiğinin LC-MS/MS spektrumu



Ek Şekil 4.2. S-2 bileşiğinin LC-MS/MS spektrumu