T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ 4-AMİNOBENZEN SÜLFONAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN (İN VİTRO) İNCELENMESİ

Mehmet KOYUNSEVER

KİMYA ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2019

Doç. Dr. Mustafa DURGUN danışmanlığında, Mehmet KOYUNSEVER'in hazırladığı **"Yeni 4-Aminobenzen Sülfonamit Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin (İn Vitro) İncelenmesi''** konulu bu çalışma 27/06/2019 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. Nasrettin GENLİ …….

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

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 12060

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 4
3. MATERYAL ve YÖNTEM 9
3.1. Materyal 9
3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler 9
3.1.2. Kullanılan kimyasallar 9
3.1.3. Kullanılan cihazlar 10
3.2.Yöntem 11
3.2.1. 4- (2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit (2) Sentezi 11
3.2.2. 4- (2-metilasetilamino) benzensülfonamit türevlerinin (3-6) sentezi 12
3.2.2.1. 4-[2-metil-2-(pirolidinil-1-il)asetamido]benzensülfonamit (3) 12
3.2.2.2. 4-[2-metil-2-(piperazin-1-il)asetamido]benzensülonamit (4) 13
3.2.2.3. 4-[2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)asetamido]benzensülfonamit (5) 13
3.2.2.4. 4-[2-metil-2-(4-metilpiperidin-1-il)asetamido]benzensülfonamit (6) 14
3.2.3. Antimikrobial çalışmalar 14
3.2.4. *In vitro* sitotoksik aktivite çalışmaları 15
3.2.4.1. Hücreler ve kültür koşulları 15
3.2.4.2. Bileşiklerin uygulanması ve sitotoksik etkinliklerinin saptanması 16
3.2.4.3. MTT hücre proliferasyon kiti ile sitotoksik etkinin belirlenmesi 16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 18
4.1. Sentezlenen Maddelerin Yapısının Aydınlatılması 18
4.1.1. 4- (2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit (2) 18
4.1.2. 4- (2-metilasetamid) benzensülfonamit türevleri (3-6) 19
4.1.3. Sentezlenen bileşiklerin İnfrared spektrum (FT-IR) ölçümleri 20
4.1.4. Sentezlenen bileşiklerin Elektronik spektrum (UV-Vis) ölçümleri 20
4.1.5. Sentezlenen bileşiklerin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrum analizleri 22
4.1.6. Sentezlenen bileşiklerin kütle spektrumu (LC-MS-MS) analizleri 23
4.2. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Çalışmaları 23
4.2.1. Sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktivite çalışmaları 23
4.2.2. Sentezlenen bileşiklerin sitotoksisite aktivite çalışmaları 26
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 29
KAYNAKLAR 31
ÖZGEÇMİŞ 34
EKLER 35
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT-IR Spektrumları 35
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin ^{1}H NMR Spektrumları 38
EK 3 Sentezlenen Bileşiklerin ^{13}C NMR Spektrumları 41
EK 4 Sentezlenen Bileşiklerin LC-MS/MS Spektrumları 44

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YENİ 4-AMİNOBENZEN SÜLFONAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN (İN VİTRO) İNCELENMESİ

Mehmet KOYUNSEVER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa DURGUN
Yıl: 2019, Sayfa :44

Bu çalışmada çeşitli 4-(2-metilasetamino) benzensülfonamit türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen türevlerin kimyasal yapıları ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, LC-MS-MS, UV-Vis, FTIR ve elementel analiz ile karakterize edilmiştir. Sülfanilamit, piridin varlığında 2-bromopropiyonilbromür ile reaksiyona sokularak ara brom sübstitüentli bileşik **(2)** elde edilmiş, bu bileşik de daha sonra yeni sülfonamit türevleri **(3-6)** elde etmek üzere sekonder aminler ile reaksiyonlara sokulmuştur. Sentezlenen tüm bileşiklerin *in vitro* antimikrobiyal aktiviteleri ve sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Halka boyutunda ve hetero azot atomu bulunduran halka sayılarındaki artış antimikrobiyal aktiviteleri de arttırmıştır. CA IX ve CA XII enzimleri bazı kanserli tümörlerde bulunmaktadır ve burada sunulan çalışmalar bu enzimleri hedef almaya odaklanmaktadır. Bileşik **(3-6)**'nın normal hücrelere sitotoksik etkisi olmadığı gözlenirken, tüm kanserli hücrelere karşı etkili olduğu bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELER : Sentez, sülfonamit türevleri, spektroskopi, sitotoksisite, antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

MSc Thesis

SYNTHESIS OF NEW 4-AMINOBENZENE SULFONAMIDE DERIVATIVES and INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES (IN VİTRO)

Mehmet KOYUNSEVER

HarranUniversity
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa DURGUN
Year: 2019, Page: 44

In this study, several sulfonamide derivatives, 4-(2-methylacetylamino)benzenesulfonamides were synthesized. Chemical structures of the derivatives were characterized by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, LC–MS–MS, UV–Vis, FTIR, and elemental analysis. Sulfanilamide was reacted with 2-bromopropionyl bromide, in the presence of pyridine, to form bromo-substituted sulfonamide **(2)** key intermediate, which was subsequently treated with secondary amines to obtain novel sulfonamide derivatives **(3-6)**. All the synthesized compounds were evaluated for in vitro antimicrobial activities and cytotoxicity. Increases in ring size, and rings bearing a nitrogen heteroatom led to improvements in antimicrobial activities. As the presence of CA IX and CA XII enzymes have been implicated in some cancerous tumors, the studies presented herein focuses on targeting these enzymes. It was found that the synthesized derivatives had in vitro anti-cancer properties, where compounds **(3–6)** were found to be active against all cancerous cells, and no cytotoxic effects on normal cells were observed.

KEY WORDS: Synthesis, sulfonamide derivatives, spectroscopy, cytotoxicity, antimicrobial activity.

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, antimikrobiyal çalışmaların yapılmasında emeği geçen Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin ZENGİN ve Doç. Dr. Gülay ZENGİN'e 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 3.1. **2** nolu bileşiğinin sentezi…….. 11
Şekil 3.2. **3-6** nolu bileşiklerin sentezi…….. 12
Şekil 4.1. **3-6** nolu bileşiklerin UV-Vis spektrumları……... 20

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. Sulfanilamit **(1)** ve benzensulfonamit türevlerinin **(2–6)** antimikrobyial aktiviteleri…… 24
Çizelge 4. 2. Bileşiklerin hücreler üzerindeki IC_{50} (µM) değerleri…….. 27

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

1. GİRİŞ

Çinko-metaloenzim karbonik anhidraz (CA, EC 4.2.1.1)'ın reaksiyon sürecinde karbondioksit ve suyun bikarbonata ve H^+ iyonlarına dönüşümünü katalizlediği iyi bilinmektedir, böylece bu reaksiyon birçok doku, organ ve organizmada pH düzenlenmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Bu güne kadar yaşayan organizmalarda yaygın şekilde genetik olarak farklı altı CA ailesi gözlenmiştir. İnsanlarda şimdiye kadar en az onbeş farklı CA izoformu tanımlanmıştır ve bunlar pH düzenlemesi, elektrolitlerin salınımı, biyosentetik süreçler, tümörogenez gibi bir çok fizyolojik süreçte yer almaktadırlar. CA inhibisyonu ve aktivasyonu, CA tipi inhibitörler metal merkezlerine bağlanırken aktivatörlerin aktif bölge boşluklarına girmesi mekanizmaları iyi bilinmektedir. CA izoformu hCA'nın fizyolojik süreçte anormal yüksek miktarları çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmesi bu enzimin önemini ortaya koymuştur. Son zamanlarda, biyomedikal uygulamalar için geliştirilmiş inhibitörlerin veya aktivatörlerin stratejik tasarımı ve geliştirilmesi için sayısız hCA izozim türü hedeflenmiştir (Alterio ve ark., 2012; Casini ve ark., 2002; Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007).

Sülfonamitler, antibakterial aktiviteye sahip bileşiklerdir (Domagk, 1935). 1935 yılında prontosil adlı boyanın in vivo olarak aktif bir bileşik olan süfanilamid'e metabolize olarak farelerdeki streptokok enfeksiyonlarını önlediği bulunmuştur. Böylece sülfonamidler sistemik bakteriyel enfeksiyonların önlenmesi ve/veya tedavisi için kullanılan ilk ilaç 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 grup 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, 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 (Alterio ve ark., 2012; Casini ve ark., 2002; Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007).

Bu çalışmada, yeni 4- (2-metilasetamid) -benzensülfonamit türevleri sentezlenmiş ve potansiyel olarak düşük toksisiteye sahip ilaç alternatiflerinin geliştirilmesine destek olmak için *in vitro* sitotoksisite ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Sentez kısmında; birinci basamakta; sülfanilamit (4-aminobenzensülfonamit) **(1)** ile bazik ortamda (piridin) 2-bromopropaonilbromür'ün reaksiyonu sonucu 4-(2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit **(2)** sentezlenmiştir. İkinci basamakta ise 4-(2-metilasetilamino) benzensülfonamit türevleri **(3-6)** sentezlenmiştir. Bunun için, 4-(2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit **(2)** bileşiği ile ayrı reaksiyonlar halinde sekonder aminler **(3)** için pirolidin, **(4)** için piperazin, **(5)** için 1-metilpiperazin ve **(6)** için 4-metilpiperidin reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bileşiklerin yapıları FT-IR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, Kütle spektroskopisi ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatılmıştır.

Biyolojik Aktivite kısmında; *In vitro* antimikrobiyal aktiviteler *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* Gram-pozitif bakteriler ve *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatif bakteriler ve *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ile *Yarrowia lipolytica* da küfler ile çalışılmıştır. Antimikrobiyal aktivitelerde; en iyi Gram-pozitif-negatif bakteriler için gözlendiğini ortaya koymuştur; Küflere (maya) karşı yapılan aktiviteler ise asgari düzeydedir. Halka boyutunda artışlar ve azot heteroatomu taşıyan halkalar iyi antimikrobiyal aktivitelere yol açmıştır.

Ayrıca; Çalışma sonucunda sentezlenen bileşiklerin kanser hücreleri üzeride olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda; sentezlenen bileşiklerin ve kemoterapik madde olan (**5-Fu**) bileşiğinin normal ve kanser hücreler (insan göğüs adenokarsinom hücresi (MCF-7 ve MDA-MB-231), insan prostat kanser (PC-3, DU-145), insan kalın bağırsak adenokarsinomu (DLD-1) ve rahim ağzı karsinomu (HeLa) ile birlikte insan normal prostad epitel (PNT-1A) ve normal embriyonik böbrek (HEK-293) hücre hattı.) üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; in vitro inhibe edici sitotoksisite aktivitelerinde bileşiklerin **(3-6**) kendi aralarında kıyaslanmasında tüm kanserli hücrelere, özellikle orta derecede aktif olduğu, HeLa hücre tiplerine karşı ise de iyi derecede aktif olduğu bulunmuştur. Yani, bileşikler **(3-6),** HeLa hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkiler gösterirken; diğer kanser hücrelerine karşı az aktivite göstermiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sülfonamitler, $-SO_2NH_2$ grubu içeren organik bileşikler olup, antimikrobiyal özellik gösteren antibakteriyal 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.

Sülfonamitler ve bunların sülfamatlar ve sülfamitler gibi yapısal olarak ilişkili türevleri, fonksiyonel grubun (A tipi) bir aromatik, heterosiklik, alifatik veya şeker iskeletine doğrudan bağlandığı $A\text{-}SO_2NHR$ genel formülüne sahiptir veya böyle bir yapı iskeletinde bir heteroatom, sıklıkla oksijen (sülfamatlar) veya azot (sülfamitler) olabilmektedir. A'nın belirtilen tiplerdeki organik iskeleletinin yanı sıra R grubunun değişmesiyle de, hidrojenle başlayarak, birincil sülfonamidler / sülfamatlar / sülfamidlerin göz önüne alındığı ve heteroatomlar (OH, NH_2, vb.) içeren çeşitli olabilir. Dolayısıyla, bu bileşik sınıfı, klasik sentetik metodlar ile genellikle kolayca sentezlenebilen ve ayrıca onlarca yıldır iyi bilinen ilaca benzer özelliklere sahip çok çeşitli türevlerin dizaynı ve sentezlenmesine yol açmaktadır (Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007, Supuran, 2017).

Gerçekten de, sülfonamitler, antibakteriyel, anti-karbonik anhidraz, anti-obezite, diüretik, antitroid, antitümör, anti-nöropatik ağrı, hipoglisemik özelliklere sahip birçok farmakolojik ajan türü ile birlikte, önemli bir ilaç sınıfı oluşturur. Bu özelliklere sahip olan aromatik / heterosiklik / şeker / amino asit sülfonamidlerde bulunan ortak kimyasal gruplar bu nedenle biyolojik aktivitelerin çeşitliliği ile ilişkilidir örneğin; matris metaloproteinaz ve bakteriyel proteaz inhibitörleri, HIV proteaz inhibitörleri, nükleosit olmayan HIV ters transkriptaz veya HIV integral inhibitörleri, vb. Bu etkilerin oluşmasında en büyük etki, muhtemelen $-SO_2NH-$ (veya $-OSO_2NH-$, $-NHSO_2NH-$) ilaç iyonları olarak işlev gören çeşitli biyomoleküllerde bulunan metal iyonları, amino asit kalıntıları, DNA veya RNA

kısımları ile çoklu etkileşimlere katılabilen kısımların olmasıyla ilgilidir. Ayrıca, sülfonamidler ve izosterleri, genel olarak stabildir, hazırlanması kolaydır ve biyolojik olarak elde edilebilirdir; bu, bunlara dahil olan çok sayıda ilacı açıklayabilir (Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007, Supuran, 2017).

Sülfa ilaçlarının aktivitesi kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve aşağıdaki şekilde açıklanabilir (Garcia ve ark., 2009).

- Sülfonamidler tipik olarak bakteriyostatik dozlarda uygulanır, yani bakteriyel çoğulmayı önler veya sınırlarlar.
- Sülfonamidler bu bakteriyostatik etkiyi bakterilerde folik asit sentezini inhibe ederek başarırlar.
- Bakteriler endojen bileşikler ve enzimler kullanarak kendi folik asitlerini sentezler, Endojen bileşikler biyolojik sistemde doğal olarak meydana gelen bileşiklerdir, Spesifik olarak, sülfonamitler dihidropteroat sentetaz enzimini inhibe eder, ki bu, dihidrobenzoik asit (PABA) ve dihidrohidrotefosfatın folik asit ve DNA için bir öncü olan dihidropteroik aside dönüşümünü katalize eden bir enzimdir.
- Sulfonamidler, dihidropteroat senttaz enzimindeki "aktif bölge" için PABA ile rekabet eder ve bu enzim "rekabetçi inhibitörleri" olarak kabul edilir.
- Sülfonamidlerin PABA'ya yapısal benzerliği, enzimi endojen bileşik (PABA) yerine ilaçla (sülfonamit) bağlanmaya yöneltir.
- PABA'nın sülfonamit ile yer değiştirmesi, folik asit sentezinde sentetik dizilim boyunca devam edemeyen “yanlış” bir metabolit oluşumuna yol açar.

Karbonik anhidraz enzimi Zn(II) tipi enzimlerinden olup, CO_2’nin hidratasyonunda çift yönlü etki yapar ve CO_2’ yi bikarbonat iyonuna dönüştürür

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

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 rastlanmıştır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004; Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007, Supuran, 2017).

Şu anda kliniklerde karbonik anhidraz inhibitörü olarak kullanılan asetazolamit ve dorzolamit sülfonamit türevleridir. Tümör tedavisinde de halen klinik denemelerde sülfonamit türevleri olan asetazolamit, methazolamit, ethoxazolamit, diklorofenamit, dorzolamit ve brinzolamit kullanılmaktadır (Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007, Supuran, 2017).

Doğal ürünler, yeni moleküllerin tasarımı, ilacı keşfi ve sentezi için yararlı molekül grupları olabilen ayrıcalıklı yapıları temsil eder. Bitkiler ve mikroorganizmalar, antikanser özelliklerine sahip yapısal olarak çeşitli biyoaktif metabolitlerin mevcut kaynaklarını oluşturur ve bugün bile, klinik kullanım veya ilaç gelişimi için mevcut antikanser ilaçlarının büyük bir bölümünü kapsar (Rakesh ve ark., 2018).

Sülfonil veya sülfonamid bileşikleri eski ilaçlardır, özellikle oftalmik enfeksiyonlar ve idrar ve gastrointestinal sistemdeki enfeksiyonlar durumunda, bazı terapötik alanlarda hala faydalı olduğu düşünülmektedir. Sulfonil fonksiyonel grubu, örneğin antibakteriyel, anti-karbonik anhidraz, diüretik, hipoglisemik ve antitroid özelliklerini gösteren birçok aktif bileşik sunar. Ayrıca, bazı sülfonamid türevlerinin umut verici antikanser ve antitümör özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir (Rakesh ve ark., 2018).

Mulchin ve ark. (2010), bir dizi yeni 6,7-sübstitüe edilmiş-5,8-kinolinkinon sentezlemiş ve anti-tümör aktivitelerini incelemiştir. Özellikle, kinolinkinon'un 7-pozisyonunda bir sülfür grubunun eklenmesiyle yeni bileşik elde edilmiştir. Bileşik IC50 değeri 4.53 uM olan HL60'a karşı ve IC50 değeri 19.3 uM olan T-hücreye karşı güçlü antikanser aktivitesi göstermiştir. T-hücreleri üzerindeki lösemik hücreler için seçiciliğinin olması bu bileşiğin bir kanser önleyici ilaç olmasına neden olmaktadır.

Long ve ark. (2016), bir dizi yeni heteroaril stiril sülfon türevini sentezledi ve potansiyel antikanser aktiviteleri için tarama yapmıştır. Bu yeni sentezlenmiş analogların yapı-aktivite ilişkisi, insan kanser hücresi hatlarına karşı anti-proliferatif aktivite için, heteroaril halkasının azot atomunun pozisyonu ve sayısının önemi bakımından araştırılmıştır. Bir öncü bileşik, sırasıyla 0.31 ve 0.35 uM GI50 değerleri ile A2780 ve HCT-116'ya karşı MTT testi ile büyüme inhibisyonuna karşı test edilmiştir. Bileşikğ'in, değiştirilmemiş hücrelerde minimal toksisiteye sahip kanser hücrelerine karşı oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Diğer mekanik çalışmalar, bileşiğin, G2 / M fazında hücre döngüsü durmasına neden olduğunu ve A2780 yumurtalık hücrelerinde CDC25C ve Mcl-1 proteinlerini hedefleyerek apoptozu indüklediğini ortaya çıkmıştır.

Lad ve ark. (2017), amid, alkoksi, sülfonamid, nitro ve amin fonksiyonelliğini içeren ve antimikrobiyal aktiviteleri için test edilmiş ve seçilen türevlerin antikanser aktivitesi için tarandığı, yeni 4 ve 5-sübstitüe edilmiş metil sülfonil benzotiyazol (MSBT) bileşikleri serisi hakkında bir çalışma yapmışlardır. İnsan servikal HeLa hücre hatlarına karşı iyi antikanser aktivitesine sahip bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Kaynakta belirtilen iki bileşik hücre büyümesini büyük ölçüde düşürmüş ve GI50 değerleri sırasıyla 0.22 ve 0.6 uM olarak bulunmuştur. Fenil halkası üzerinde elektron çekme grubunun (NO_2) varlığı aktiviteyi arttırmış ve aktivitede iki sülfonil grubu önemli rol oynamıştır.

İbrahim ve ark. (2017), isatin-pirazol benzensülfonamid melezlerini tümörle ilişkili karbonik anhidrazların inhibitörleri olarak çalışmalarında sunmuşlardır. İsatin kısmı üzerinde 5- NO_2 sübstitüentine sahip iki bileşiğin, sırasıyla hCA IX (sırasıyla

Ki = 15.7 ve 7.4 nM) ve hCA XII (sırasıyla Ki = 3.7 ve 5.4 nM) hücre çizgilerini inhibe ettiği bulunmuştur. Moleküler yerleştirme çalışmaları, NO_2 grubunun hCA IX'te Asp 132 ile ve hCA XII'nin inhibisyonu sırasında Lys67 / Asp130 ile iyonik bağ oluşturabildiğini göstermiştir.

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, huniler, ayırma hunileri.
- Manyetik ısıtıcılı karıştırıcılar.
- Soğutucu olarak su buz banyosu.
- 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).
- **2-Bromopropionil bromit:** Yeni bileşiklerin sentezinde baslangıç maddesi olarak kullanıldı(Sigma-Aldrich).
- **Pirrolidin, Piperazin, 1-metilpiperazin, 4-metilpiperidin:** 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).

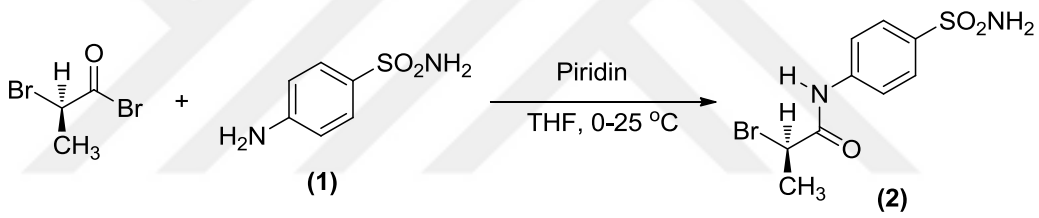
3.1.3. Kullanılan cihazlar

- **^{1}H NMR:** Agilent 400 MR, 400 MHz NMR Spektrometre ile 25 ^{o}C'de, DMSO-d_6 içinde ve TMS iç standart olarak kullanıldı.
- **^{13}C NMR:** Agilent 400 MR, 100 MHz NMR Spektrometre ile 25 ^{o}C'de, DMSO-d_6 içinde ve TMS iç standart olarak kullanıldı.
- **İnfrared Spektrometresi:** Perkin Elmer Spektrum Two UATR IR spektrometre cihazı ile 400-4000 cm^{-1} bölgesinde kaydedildi.
- **UV-Vis Spektrofotometresi:** Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis Spektrofotometre Cihazı, ile oda sıcaklığında ve DMF içinde, 200-1100 nm aralığında absorpsiyon ölçümleri alındı.
- **Elementel Analiz:** CHNS-932 LECO Elementel Analiz Cihazı
- **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. 4- (2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit (2) Sentezi

THF (50.0 mL) içinde tamamen çözünmüş sülfanilamit **(1)** (1.72 g, 10.0 mmol) ve piridin (1.19 g, 15.0 mmol) karışımı üzerine THF (20.0 mL) içindeki 2-bromopropaonil bromür (2.15 g, 10.0 mmol) çözeltisi yavaşça eklendi. Reaksiyon 0 ˚C'de 4 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon daha sonra oda sıcaklığına getirildi ve 24 saat daha karıştırıldı. Oluşan beyaz renkli piridinin hidrobromür tuzunun çökeltisi süzüldü ve geri kalan süzüntü vakumda buharlaştırılarak beyaz bir katı madde elde edildi. Daha sonra, elde edilen madde THF ve Etanol karışımında kristallendirildi çöken madde ayrıldı ve vakumda kurutuldu (Durgun ve ark., 2017). Reaksiyonun sentez şeması Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.

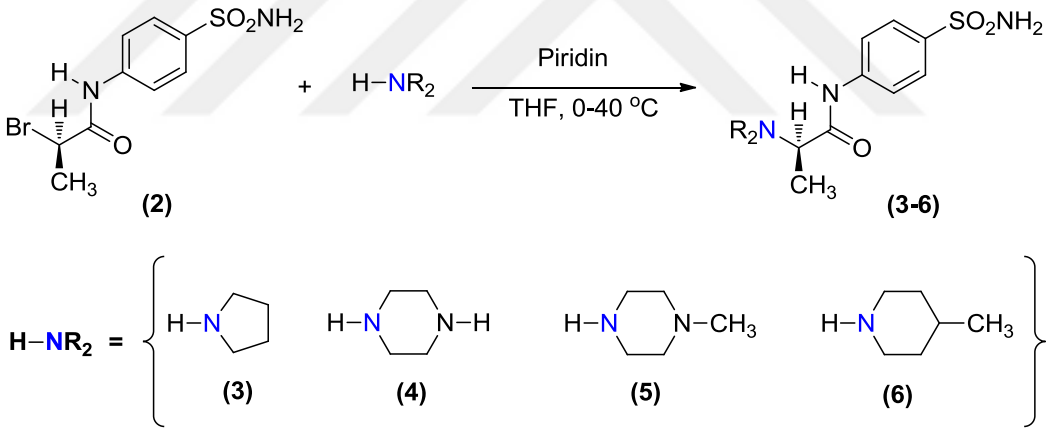


Şekil 3.1. **2** nolu bileşiğinin sentezi

Verim: 70%; e.n. 217-219 ˚C; FTIR (KBr pellet, cm^{-1}): 3333, 3207 (-NH_2), 3129 (-N-H, amit), 3071 (C-H, arom.), 2927, 2980 (C-H, alifatik), 1683 (-C=O, amit), 1331 (S=O, asimetrik), 1160 (S=O, simetrik), 541 (C-Br); UV-Vis (DMF, λ_{max}, nm): 270; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz, δ ppm): 1.73 (d, *J*= 8.0 Hz, 3H, -C<u>H</u>$_3$), 4.68 (q, *J*= 8.0 Hz, 1H, Br-C<u>H</u>-), 7.27 (s, 2H, -SO_2N<u>H</u>$_2$), 7.71-7.77 (m, 4H, Ar-H), 10.66 (s, 1H, <u>H</u>-N-C=O); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz, δ ppm): 21.6 (<u>C</u>H$_3$), 44.6 (<u>C</u>H-Br), 119.4 (2C, arom.), 127.2 (2C, arom.), 139.4 (Ar-<u>C</u>-SO_2NH_2), 141.9 (Ar-<u>C</u>-NH-), 168.4 (C=O); LC-MS-MS (m/z): 308.1 [M+H]. Hesaplanan: $C_9H_{11}BrN_2O_3S$ (307.16 g/mol) (%):C, 35.19, H, 3.61, N, 9.12, O, 15.63, S, 10.44. Bulunan: (%): C, 35.10, H, 3.67, N, 9.19, S, 10.35.

3.2.2. 4- (2-metilasetilamino) benzensülfonamit türevlerinin (3-6) sentezi

THF (20.0 mL) içinde tamamen çözünmüş olan 4-(2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit **(2)** (3.07 g, 10.0 mmol) bileşiğine 0 ˚C'de ayrı reaksiyonlar halinde ve 30 dk boyunca, THF (20.0 mL) içindeki sekonder aminler (3) için pirolidin, (4) için piperazin, (5) için 1-metilpiperazin ve (6) için 4-metilpiperidin) damla damla eklendi. Baz olarak ise piridin kullanıldı. Daha sonra reaksiyonun oda sıcaklığına kadar gelmesi sağlandı ve 48 saat daha 40 °C'de karıştırıldı. 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 etanolde yeniden kristallendirildi ve vakumda kurutuldu (Durgun ve ark., 2017). Reaksiyonun sentez şeması Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. **3-6** nolu bileşiklerin sentezi

3.2.2.1. 4-[2-metil-2-(pirolidinil-1-il)asetamido]benzensülfonamit (3)

Beyaz katı. Verim: 65%; e.n. 184-186 ˚C; FTIR (KBr pelet, cm^{-1}): 3326, 3297 (-NH_2), 3204 (N-H, amit), 3090 (C-H, arom.), 2958-2791 (C-H, alif.), 1665 (C=O, amit), 1323 (S=O, asimetrik), 1154 (S=O, simetrik); UV-Vis (DMF, λ_{max}, nm): 268; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz, δ ppm): 1.24 (d, J = 8.0 Hz, 3H, -C$\underline{H}_3$), 1.69-1.71 (m, 4H, -C$\underline{H}_2$-C$\underline{H}_2$-), 2.55-2.57 (m, 4H, -C$\underline{H}_2$-N-C$\underline{H}_2$-), 3.05 (q, 1H, J =

8.0 Hz, C<u>H</u>-CH_3), 7.23 (s, 2H, -$SO_2N\underline{H}_2$), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 10.03 (s, 1H, -CON<u>H</u>); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz, δ ppm): 16.7 ($\underline{C}H_3$), 23.5 (CH_2-$\underline{C}H_2$-$\underline{C}H_2$-CH_2), 50.8 (-$\underline{C}H_2$-N-$\underline{C}H_2$-), 64.0 (CH_3-$\underline{C}$H-N), 119.5 (2C, arom.), 126.9 (2C, arom.), 138.8 (Ar-$\underline{C}$-SO_2NH_2), 142.2 (Ar-$\underline{C}$-NH-), 173.2 (C=O); LC-MS-MS (m/z): 298.1 $[M+H]^+$; Hesaplanan: $C_{13}H_{19}N_3O_3S$(297.37 g/mol) (%): C, 52.51, H, 6.44, N, 14.13, S, 10.78. Bulunan (%): C, 52.42, H, 6.42, N, 14.22, S, 10.70.

3.2.2.2. 4-[2-metil-2-(piperazin-1-il)asetamido]benzensülonamit (4)

Beyaz katı. Verim: 75%; e.n. 228-230 ˚C; FT-IR (KBr pelet, cm^{-1}): 3327 (NH_2), 3225 (-N-H, amit), 3082 (C-H, arom.), 2998-2803 (C-H, alif.), 1661 (C=O, amit), 1339 (S=O, asimetrik), 1159 (S=O, simetrik); UV-Vis (DMF, λ_{max}, nm): 268; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz, δ ppm): 1.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, -C<u>H</u>$_3$), 1.32 (s, 1H, -CH_2-N<u>H</u>-CH_2-), 2.52-2.60 (m, 8H, -C<u>H</u>$_2$-N-C<u>H</u>$_2$-), 3.24 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, -N-C<u>H</u>-CH_3), 7.24 (s, 2H, -$SO_2N\underline{H}_2$), 7.71-7.77 (4H, m, *J* = 8.0 Hz, Ar-H), 10.06 (1H, s, -CONH); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz, δ ppm): 13.0 ($\underline{C}H_3$), 44.6 ($\underline{C}H_2$-NH-$\underline{C}H_2$), 49.7 ($\underline{C}H_2$-NC-$\underline{C}H_2$), 63.9 (CH_3-$\underline{C}$H-N), 119.4 (2C, arom.), 127.0 (2C, arom.), 138.9 (Ar-$\underline{C}$-SO_2NH_2), 142.1 (Ar-$\underline{C}$-NH-), 172.3 (C=O); LC-MS-MS (m/z): 313.10 $[M+H]^+$. Hesaplanan: $C_{13}H_{20}N_4O_3S$(312.13 g/mol) (%):C, 49.98, H, 6.45, N, 17.94, S, 10.26. Bulunan (%): C, 49.90, H, 6.42, N, 18.02, S, 10.18.

3.2.2.3. 4-[2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)asetamido]benzensülfonamit (5)

Beyaz katı. Verim: 70%; e.n. 249-251 ˚C; FTIR (KBr pelet, cm^{-1}): 3377, 3286 (NH_2), 3190 (N-H, amit), 3118, 3052 (C-H, arom.), 2989-2806 (CH_2, alif.), 1700 (C=O, amit), 1335 (S=O, asimetrik), 1160 (S=O, simetrik); UV-Vis (DMF, λ_{max}, nm): 268; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz, δ ppm): 1.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 3H, C<u>H</u>$_3$-CH-), 2.13 (s, 3H, N-C<u>H</u>$_3$), 2.51-2.52 (m, 8H, N-C<u>H</u>$_2$-C<u>H</u>$_2$-N), 3.24 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, CH_3-C<u>H</u>-N), 7.23 (s, 2H, -$SO_2N\underline{H}_2$), 7.72-7.79 (m, 4H, Ar-H), 10.03 (s, 1H, -CON<u>H</u>); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz, δ ppm): 12.9 (-CH-$\underline{C}H_3$), 46.2 (-N-$\underline{C}H_3$), 49.4 ($\underline{C}H_2$-N(CH)-$\underline{C}H_2$), 55.3 ($\underline{C}H_2$-N(CH_3)-$\underline{C}H_2$), 63.9 (CH_3-$\underline{C}$H-N), 119.4 (2C, arom.), 127.0 (2C, arom.), 138.9 (Ar-$\underline{C}$-SO_2NH_2), 142.0 (Ar-$\underline{C}$-NH-), 172.3 (C=O);

LC-MS-MS (m/z): 327.10 $[M+H]^+$; Hesaplanan: $C_{14}H_{22}N_4O_3S$ (326,14 g/mol) (%): C, 51.51, H, 6.79, N, 17.16, S, 9.82. Bulunan (%): C, 51.40, H, 6.70, N, 17.25, S, 9.71.

3.2.2.4. 4-[2-metil-2-(4-metilpiperidin-1-il)asetamido]benzensülfonamit (6)

Beyaz katı. Verim: (75%); e.n. 192-195 ˚C; FT-IR (KBr pelet, cm^{-1}): 3332, 3240 (NH_2), 3193 (-N-H, amit), 3100 (C-H, arom.), 2960-2800 (CH_2, alif.), 1692 (C=O, amit), 1330 (S=O, asimetrik), 1165 (S=O, simetrik); UV-Vis (DMF, λ_{max}, nm): 268; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz, δ ppm): 0.86 (d, J = 8.0 Hz, 3H, -CH-C<u>H</u>$_3$), 1.13 (d, J = 8.0 Hz, 3H, (N-CH-C<u>H</u>$_3$), 1.55-1.57 (m, 1H, -$(CH_2)_2$-C<u>H</u>-CH_3), 1.23-1.30 (m, 4H, -$(C\underline{H}_2)_2$-CH-CH_3), 2.74-2.77 (m, 4H, -$(C\underline{H}_2)_2$-N), 3.26 (q, J = 8.0 Hz, 1H, N-C<u>H</u>-CH_3), 7.24 (s, 2H, -$SO_2N\underline{H}_2$), 7.71-7.78 (m, 4H, Ar-H), 10.04 (1H, s, -CON<u>H</u>); ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 100 MHz, δ ppm): 12.2 (-N-CH-<u>C</u>H$_3$), 22.3 (-CH-<u>C</u>H$_3$), 30.8 (-<u>C</u>H-CH_3), 34.7 ($\underline{C}H_2$-C(CH_3)-$\underline{C}H_2$), 49.0 ($\underline{C}H_2$-N(CH)-$\underline{C}H_2$), 64.1 (CH_3-<u>C</u>H-N), 119.3 (2C, arom.), 127.0 (2C, arom.), 138.8 (Ar-<u>C</u>-SO_2NH_2), 142.0 (Ar-<u>C</u>-NH-), 172.6 (C=O; LC-MS-MS (m/z): 326.10 $[M+H]^+$. Hesaplanan: $C_{15}H_{23}N_3O_3S$ (325,15 g/mol) (%): C, 55.36, H, 7.12, N, 12.91, O, 14.75, S, 9.85. Bulunan (%): C, 55.40, H, 6.98, N, 13.00, S, 9.77.

3.2.3. Antimikrobial çalışmalar

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları literatür metoduna göre steril filtre kağıdı diskleri kullanılarak agar difüzyon tekniği ile yapıldı (NCCLS, 1997; Collins ve ark., 2004). *In vitro* antimikrobiyal aktiviteler Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* Gram-pozitif bakteriler ve *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatif bakteriler ve *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ile *Yarrowia lipolytica* da küfler ile çalışıldı.

Mikrobiyal kültür hazırlığı literatüre göre yapılmış ve burada kısaca açıklanmıştır. Bakteriler 37 ^{o}C'de (Difco Nutrient Broth, 24 saat) ve küfler 25 ^{o}C'de (Difco Sabourand Dextrose Broth, 24 saat) inkübe edilmiştir. Petri kaplarına bakteri (0.1 mL) ve maya (bakteri ve maya için sırasıyla 105 cfu/mL ve 104 cfu/mL) kültürleri enjekte edildi ve 10 µL numune çözeltileri ile ıslatılmış steril filtre kağıdı diskleri (6 mm) katı agar yüzeylerine yerleştirilmiştir. Petri kapları, numunelerin agar ortamına yayılmasını sağlamak için 4 °C'de (2 saat) bırakılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin testleri 3 kez gerçekleştirilmiş ve İnkübasyon sonrasında disk çapıda dahil olmak üzere zon çapı ölçülerek inhibisyon zonları mm cinsinden ortalamaları olarak verilmiştir (NCCLS, 1997; Collins ve ark., 2004).

3.2.4. *In vitro* sitotoksik aktivite çalışmaları

Elde edilen bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki Sitotoksisite etkileri Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Dr. Öğr. Üyesi İsmail KOYUNCU tarafından literatüre uygun olarak yapılmıştır (Durgun ve ark., 2017).

3.2.4.1. Hücreler ve kültür koşulları

Çalışmada ATCC'den (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu) temin edilip stoklanan; insan göğüs adenokarsinom hücresi (MCF-7 ve MDA-MB-231), insan prostat kanser (PC-3, DU-145), insan kalın bağırsak adenokarsinomu (DLD-1) ve rahim ağzı karsinomu (HeLa) ile birlikte insan normal prostad epitel (PNT-1A) ve normal embriyonik böbrek (HEK-293) hücre hatları kullanılmıştır. ATCC tarafından önerildiği şekli ile hücreler %10 FBS, L-glutamin (2mM), penisilin (100 U/mL) ve streptomisin (100 mg/mL) ile desteklenmiş DMEM-F12 ve RPMI-1640 besiyerinde, nemli bir atmosferde (5% CO_2) ve 37 °C'de çoğaltılmıştır. Kültürler % 80-90 çoğalmaya ulaştığında, % 0.25 tripsin (Sigma) kullanılarak toplanmıştır.

3.2.4.2. Bileşiklerin uygulanması ve sitotoksik etkinliklerinin saptanması

Hücreler stoktan açılarak 25 cm^3 flasklara ekilip ve hücreler %80-90 oranında çoğalınca, tripsinizasyon ile kaldırılıp $5x10^4$ 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.

3.2.4.3. 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'yi ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) parçalayarak, çözülebilir formazan tuzları oluşturması prensibine dayanarak, UV-Vis ölçümleriyle spektrofotometrik olarak yapılmaktadır (Mosmann, 1983).

MTT kolorimetrik çalışmalar 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak yapılmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu plakalara 5.0 $x10^4$ hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekildi ve 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları (1, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 µM) ile işleme tabi tutulan hücreler 37 °C'de 48 saat daha inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra besiyeri uzaklaştırılarak ve her kuyucuktaki hücre 100 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL) ile 37 °C'de 4 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra MTT çözeltisi uzaklaştırılmış ve çözülmeyen formazan kristallerini çözmek için 100 µL DMSO çözeltisi eklenmiştir. Yani; İnkübasyon sonunda plaklardaki besiyeri uzaklaştırılır, formazon kristalleri 100 µl DMSO ile çözdürüldükten sonra absorbans değerleri spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedilmiştir. Sitotoksisite, maruz kalmayan kontrole göre ortalama yüzde artış (ortalama ± standart sapma) olarak ifade edilmiştir. Kontrol değerleri % 0 sitotoksisiteye ayarlanmıştır. Sitotoksisite verileri (uygun olan yerlerde) sigmoidal eğrilere yerleştirilerek ve işlem görmeyen kontrollere kıyasla %

50 inhibisyona neden olan madde konsantrasyonu olan IC_{50} değerlerini hesaplamak için dört parametreli bir hesaplama modeli kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Sentezlenen Maddelerin Yapısının Aydınlatılması

4.1.1. 4- (2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit (2)

Başlangıç maddesi olarak sülfanilamit kullanılarak 2 nolu bileşik 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 (Şekil 3.1.) (Ek 1-3) (Turkmen ve ark., 2005;Durgun, 2005; 2014; Durgun ve ark., 2014; 2015; 2016a; 2016b; 2017).

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, 3129 cm^{-1}'deki pik ise amitin N-H pikinden,. 3071'de ki pik ise aromatik halkadaki C-H gerilme pikinden kaynaklanmaktadır. Alifatik C-H gerilmesinden kaynaklanan pikler ise 2927 ve 2980 cm^{-1}'de gözlenmiştir. 1683 cm^{-1}'de amit bandı (-C=O)'dan gözlemlenmiştir. 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.

2 nolu bileşiğinin DMSO içersinde alınmış **^{1}H-NMR** spektrumu Ek Şekil 2.1.'de incelendiğinde 10.66 ppm' de çıkan singlet pikin –CONH grubundaki protondan ve 7.71-7.77 ppm'de görülen multiplet pikin aromatik protonlardan kaynaklandığı görülür. Bunlara ilaveten 7.27 ppm' de $–SO_2NH_2$ grubundan kaynaklanan bir pik de 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.

2 nolu 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. 4- (2-metilasetamid) benzensülfonamit türevleri (3-6)

Bu çalışmanın amacına uygun olarak yeni sülfonamit türevlerini **(3-6)** sentezlemek için; Sülfanilamid **(1)** piridin varlığında 2-bromopropaonil bromür ile reaksiyona sokularak brom içeren ara sülfonamit bileşiği **(2)** elde edilmiş ve bu bileşik daha sonra yeni sülfonamit türevleri **(3-6)** elde etmek üzere ayrı reaksiyonlar şeklinde kuru THF içinde sekonder amin olan pirolidin **(3)**, piperazin **(4)**, 1-metilpiperazin **(5)** ve 4-metilpiridin **(6)** ile reaksiyonlara sokulmuştur. Sülfonamit türevlerinin sentez reaksiyonları Şekil 3.2.'de verilmiştir. Sentezlenen türevleri **(3-6)** oda sıcaklığında stabil olan beyaz katı ürünler olarak elde edilmiştir.

Sülfonamit türevleri **(3-6)** FT-IR, UV–Vis, ^{1}H ve ^{13}C NMR, LC-MS-MS ve elementel analizler ile karakterize edilmiştir, toplanan data deneysel bölümde sunulmuştur ve hesaplanmış değerler ile uyumludur. Sentezlenen bileşiklerin karakteristik spektral bantları ve kimyasal kaymaları, önceki çalışmalarda elde edilen sülfonamit türevleri ve literatür ile uyumludur (Turkmen ve ark., 2005;Durgun, 2005; 2014; Durgun ve ark., 2014; 2015; 2016a; 2016b; 2017). Bileşiklerin elde edilmiş verileri incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile önerilen yapının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür (Ek 1-4).

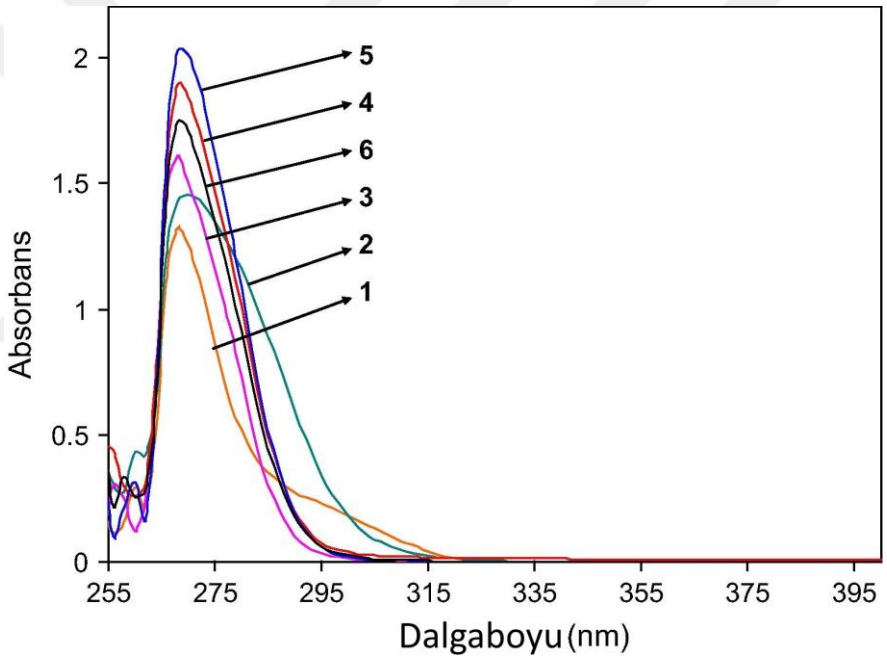
4.1.3. Sentezlenen bileşiklerin İnfrared spektrum (FT-IR) ölçümleri

Sentezlenen bileşikler **(2-6)**'nın infrared absorpsiyon spektrumularında ayrıntıları deneysel bölümde verildiği üzere 3350 ve 3280 cm^{-1}'de NH_2 sülfonamit, 3200cm^{-1}'de N-H amit, 1690 cm^{-1}'de C=O amit ve 1330 cm^{-1} ile 1160 cm^{-1}'de S=O sülfonamit karakteristik gerilme titreşimleri gözlenmiştir. Bileşiklerin elde edilmiş FT-IR verileri ayrıntılı olarak incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile 4-(2-metilasetamit) benzensülfonamit türevleri **(2-6)**'nın önerilen yapılarının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür (Ek 1).

4.1.4. Sentezlenen bileşiklerin Elektronik spektrum (UV-Vis) ölçümleri

Sentezlenmiş sülfonamit türevleri **(2-6)** ve sülfanilamit **(1)**'in elektronik spektrumları DMF içinde alınmış ve Şekil 4.1.'de verilmiştir. DMF (polarite endeksi 6.4) içindeki sülfanilamit **(1)** bileşiğinin 302 nm'de zayıf bir bant verirken 268 nm'de güçlü bir absorpsiyon sergilemiştir ve bu sonuçlar önceki çalışmalarla uyumludur (Lang, 1961; Doup ve Vandenbelt, 1949; Zhang ve ark., 2015). 268 nm'deki absorpsiyon benzen halkası π-π* geçişlerinden ileri gelmektedir. 302 nm'deki absorpsiyon ise başlangıç maddesi sülfanilamit **(1)**'in N ve S atomlarındaki ortaklaşmamış elektronların n-π* geçişlerine işaret etmektedir. Bu nedenle, sülfanilamit **(1)** spektrumunda gözlemlenen bu iki pik, biri güçlü, diğeri zayıf olmak üzere iki geçiş türünün varlığını doğrulamaktadır. Şekil 1'de görüldüğü üzere bileşik **(2)** hariç tüm sülfonamit türevleri 268 nm de λ_{max} absorpsiyon bandı vermesi sebebi ile benzer absorpsiyon spektrumlarına sahiptirler. Bileşik **(2)** için 286 nm'de bir omuz piki ile birlikte 270 nm'de güçlü bir absorpsiyon piki gözlenmiştir. Bileşik **(2)**'nin esas absorpsiyonu başlangıç molekülü **(1)**'inkinden daha yayvandır ve nispeten daha yüksek dalga boyuna (268 nm'den 270 nm'ye) kaymıştır. 268 nm'deki absorpsiyon sülfonamit türevleri **(3-6)**'nın yapılarındaki π-π* geçişlerinden ileri gelmektedir. İlaveten başlangıç maddesi **(1)** için 302 nm de gözlenen zayıf bant, sülfonamit türevleri **(3-6)**'nın oluşması ile kaybolmuştur. Böylece bu, sülfonamit türevleri için hiçbir n-π * geçişinin gerçekleşmediğini göstermiştir yani sülfonamit türevleri oluşumuyla, mevcut elektronik enerji seviyesi geçişleri π-π * geçişlerine

dönüşmüştür. Sülfonamit türevlerinin spektrumları başlangıç molekülü **(1)**'e göre daha büyük halkalı yapı oluşumunun π-π* geçiş piklerinin şiddetini arttırdığını ortaya koymuştur. Şiddetteki bu artış yeni bileşiklerin yapısal olarak daha halkalı olması ve böylelikle π elektronlarını daha iyi vermesinden kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle, zengin elektronik yapılar taşıyan bu sülfonamit türevleri maksimum absorpsiyon şiddetinde kayda değer artışlara yol açabilir. Bununla birlikte, 5 nolu maddenin, tüm sülfonamit türevleri arasında en yüksek maksimum absorpsiyon yoğunluğu artışına sahiptir. Ayrıca, başlangıç bileşiği **(1)**'in maksimum absorpsiyon dalga boyuna kıyasla sülfonamit türevleri için maksimum absorpsiyon kayması meydana gelmemiştir.



Şekil 4.1. **3-6** nolu bileşiklerin UV-Vis spektrumları

Sülfonamit türevleri **(2-6)** ve başlangıç molekülü **(1)** için elektronik spektral veriler Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir. Sülfonamit türevleri **(2-6)** için molar absorpsiyon katsayısı değerleri, başlangıç molekülü **(1)**'in kine göre artmıştır. Bu yeni moleküller, başlangıç molekülü **(1)**'in kine göre molar absorpsiyon kapasitelerinde kayda değer artışlara neden olabilecek zengin elektronik yapılara sahiptir. Bileşik **(5)**'in, sülfonamit türevleri arasında en yüksek molar absorpsiyon katsayısı değerine sahiptir. Molar absorpsiyon katsayısı değer değişimleri, kimyasal

yapılardan ve bileşiklerin elektronik enerji seviyelerinin oluşumuna katkıda bulunan atomun türünden kaynaklanabilir.

Çizelge 4. 1. UV-Vis data for sulfanilamide (**1**) and 4-(2-methyllacetylamino)benzenesulfonamide derivatives (**2**-**6**).

Bileşik	ε (L mol^{-1} cm^{-1})	λ_{max} Abs (nm)	In Abs
1	$8.83x10^4$	268	1.324
2	$9.71x10^4$	270	1.457
3	$10.73x10^4$	268	1.609
4	$12.61x10^4$	268	1.891
5	$13.49x10^4$	268	2.024
6	$11.63x10^4$	268	1.744

λ_{max} Abs: maksimum absorbsiyon dalgaboyu, In Abs: maksimum absorpsiyon şiddeti, ε: molar absorpsiyon katsayısı, örnek konstrasyonları: $1.5x10^{-5}$ mol/L

4.1.5. Sentezlenen bileşiklerin ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrum analizleri

Yeni benzensülfonamit türevleri **(2-6)** için ^{1}H ve ^{13}C NMR spektrumları kaydedilmiş ve veriler deney bölümünde sunulmuş, ayrıca benzensülfonamit türevlerinin **(2-6)** NMR spektrumları Ek Şekil 2 ve 3'de verilmiştir. NMR spektrumu 25 ^{o}C'de, DMSO-d_6 içinde ve TMS iç standart olarak kullanılan Agilent-VNMRS-400 Spektrometre (^{1}H NMR 400 MHz and ^{13}C NMR 100 MHz) Cihazı ile kaydedilmiştir. NMR verileri ayrıntılı olarak incelendiğinde, elde edilen sonuçlar ile 4-(2-metilasetamit) benzensülfonamit türevleri **(2-6)**'nın önerilen yapılarının uyumlu olduğu ve önerilen yapıyı desteklediği görülmüştür. Bu spektrum verileri literatür ile uyumludur (Turkmen ve ark., 2005;Durgun, 2005; 2014; Durgun ve ark., 2014; 2015; 2016a; 2016b; 2017).

Yeni benzensülfonamit türevleri **(3-6)**'nın ^{1}H NMR spektrumlarında; alifatik protonlar δ 0.86-3.26 ppm bölgesinde gözlenirken aromatik protonlar δ 7.71-7.79 ppm bölgesinde gözlenmiştir ve bunlar literatür ile uyumludur (Durgun, 2005; Turkmen ve ark., 2005). Multiplet pikler, alifatik grup olan pirol, piperazin ve piperidin halkasındaki metilen (-CH_2-)'den ve tüm türevlerde benzen halkasının aromatik proton (Ar-H)'larından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, duplet pikler CH_3- ve

aromatik metilen protonu (Ar-H) grupları için gözlenmiştir ve her ikisi de tekli protonlara komşuluk etmektedir. Ayrıca benzensülfonamit türevleri **(3-6)** için, 10.03-10.06 ppm'de görülen singlet pikler amit (-CONH) protonundan ve 7.23-7.24 ppm'de görülen singlet pikler sulfonamit ($-SO_2NH_2$) protonlarından kaynaklanmaktadır.

Yeni benzensülfonamit türevleri **(3-6)**'nın ^{13}C NMR spektrumlarında; alifatik metil karbonları δ 13.0-64.1 ppm bölgesinde gözlenirken, aromatik karbonlar δ 119.3-142.2 ppm bölgesinde gözlenmiştir. Kayma değerleri halka boyutuna ve tipine bağlı olarak metilen halka karbonları 23.5-50.8 bölgesinde gözlenmiştir. Amit karbonu 172.3-173.2 ppm bölgesinde gözlenmiştir. Birkaç aromatik karbon, moleküler yapıların simetrisi nedeniyle aynı NMR sinyaline sahiptir.

4.1.6. Sentezlenen bileşiklerin kütle spektrumu (LC-MS-MS) analizleri

Yeni benzensülfonamit türevleri **(3-6)** için kütle spektrumları kaydedilmiş ve elde edilen veriler deneysel bölümde sunulmuştur. Tüm spektrumlar moleküler yapıları ile uyumludur. Türevlerin moleküler iyonları $[M]^+$, tek keskin pik olarak tespit edilmiş ve $[M + H]^+$ iyonları olarak gözlenmiştir. Yeni benzensülfonamit türevleri **(3-6)**'nin **LC-MS/MS** spektrumları Ek şekil 4.1 'de verilmiştir

4.2. Sentezlenen Bileşiklerin Biyolojik Çalışmaları

4.2.1. Sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları literatüre göre disk difüzyon tekniği ile yapılmıştır (NCCLS, 1997; Collins ve ark., 2004). *In vitro* antimikrobiyal aktiviteler *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* Gram-pozitif bakteriler ve *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia* ve *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatif bakteriler ve *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* ile *Yarrowia lipolytica* da küfler ile çalışılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin testleri 3 kez gerçekleştirilmiş ve İnkübasyon sonrasında disk

çapıda dahil olmak üzere zon çapı ölçülerek inhibisyon zonları mm cinsinden ortalamaları olarak Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sulfanilamit **(1)** ve benzensulfonamit türevlerinin **(2–6)** antimikrobyial aktiviteleri

Bileşik[a]	İnhibisyon Bölgesi (Çap, mm)		
	Gram (+)		
	Bacillus Subtilis	***Bacillus megaterium***	***Staphylococcus aureus***
1[b]	12	11	11
2	11	11	11
3	11	11	11
4	-	-	-
5	-	-	-
6	11	11	11

Bileşik[a]	İnhibisyon Bölgesi (Çap, mm)			
	Gram (-)			
	Enterobacter aerogenes	***Eschericha coli***	***Klebsiella pneumoniae***	***Pseudomonas aeruginosa***
1[b]	11	11	11	11
2	11	11	11	11
3	-	12	11	11
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	11	11	11	13

Bileşik[a]	İnhibisyon Bölgesi (Çap, mm)		
	Yeast		
	Candida albicans	***Saccharomyces cerevisiae***	***Yarrovia lipolytica***
1[b]	11	-	-
2	-	-	11
3	-	-	11
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	13

[a]Konsantrasyon: 1.2 mg/ disk
[b]Başlangıç Bileşiği
- İnaktif

Çizelge 4.2.'de verilen antimikrobiyal sonuçlarına göre; Sentezlenen bileşikler, 11-13 mm inhibisyon bölgeleri olan antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüş, C. albicans ve S. cerevisiae'ye karşı ise aktivite gözlenmemiştir. Sentezlenen bileşiklerden **(3)** ve **(6)** nolu bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri olduğu ve **(4)** ve **(5)** nolu bileşiklerin ise tüm mikroorganizmalara karşı etkisiz olduğu görülmüştyür. Gözlenen en büyük aktivite E. coli'ye (12 mm, bileşik 3) ve P. aeruginosa ve Y. lipolytica (13 mm, bileşik 6) mikroorganizmalarına karşı bileşik **(3)** ve **(6)** göstermiştir.

Pirolidin, piperazin ve piperidin, birçok doğal ve sentetik biyoaktif bileşikte ortak olan yapısal motiflere sahip azot içeren heterosiklik bileşiklerdir. Azot atomları, protonlanmış formu ile mikrobiyal hücre bileşenlerinin anyonik bölgesi arasında elverişli elektrostatik etkileşimler sağlayabilir ve böylece hücre işlemlerinin sonunda bozulmasına yol açabilir. Bu yapısal birimler, ilaçlarda sıkça kullanılır. Azot atomu içeren heterosiklik bileşiklerin biyolojik hedeflere karşı seçicilik ve etkililik üzerinde önemli bir etkisi olabilir. Bileşik **(3)** bir pirolidinil grubuna sahipken, **(4)** ve **(5)** her ikisi de piperazinil grubuna sahiptir ve **(6)** bir piperidinil grubuna sahiptir. Bir azot heterosikline ikinci bir azot atomunun ilave edilmesiyle antimikrobiyal aktiviteyi arttırması beklenir, ancak bunun tersine, hem iki azot heterosiklileri, piperazinil sistemleri **(4)** ve **(5)** için hiçbir aktivite gözlemlenmedi. Bileşik **(4)** 'e kıyasla, bileşik **(5)**' e ait bir metil grubu ile azot atomu sübstitüsyonunun, polariteyi düşürmesi ve lipofilisiteyi arttırması, böylece mikrobiyal hücre zarları boyunca daha iyi nüfuz etmesine izin verilmesi beklenebilir. Bu, bu heterosiklikler için tek bir azot atomunun en uygun yapı olduğunu gösterir. Ayrıca, heterosiklik büyüklüğü, piperidinil sübstitüe edilmiş türevinin **(6),** pirolidinil sübstitüe edilmiş türevden **(3)** biraz daha fazla aktiviteye sahip olduğu antimikrobiyal aktivitelerde rol oynar. Azot atomunun antimikrobiyal etkileşimlerdeki daha büyük halka için daha kolay olması mümkündür. Aynı zamanda, halka büyüklüğündeki artışlar, lipofilik karakterin artmasına ve dolayısıyla mikrobiyal hücre zarları boyunca daha iyi geçirgenliğe yol açar. Türev **(6)** en büyük antimikrobiyal aktiviteye sahip olarak gözlenmiştir. Türev **(6)**, iki metil eklentisi tarafından maskelenen ve dolayısıyla gelişmiş lipofilikliğe

sahip olan polar özelliklere sahip olan optimum altı üyeli azot heterosikli taşımaktadır.

Birçok çalışma, bir halojen sübstitüentinin eklenmesinin, antimikrobiyal aktivitelerde iyileşme ile sonuçlandığını göstermiştir. Bununla birlikte, buradaki çalışmalar, halojen içeren bileşik **(2)** 'nin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ancak heterosiklik türevlerden **(3)** ve **(6)** daha düşük olduğunu gösterdi. Ayrıca, sadece bileşik **(2)** içeren halojen ve heterosiklik türevleri **(3)** ve **(6)**, öncü bileşik **(1)** ile birlikte antifungal aktivite göstermiştir.

4.2.2. Sentezlenen bileşiklerin sitotoksisite aktivite çalışmaları

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

Çalışmada ATCC'den (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu) temin edilip stoklanan; insan göğüs adenokarsinom hücresi (MCF-7 ve MDA-MB-231), insan prostat kanser (PC-3, DU-145), insan kalın bağırsak adenokarsinomu (DLD-1) ve rahim ağzı karsinomu (HeLa) ile birlikte insan normal prostad epitel (PNT-1A) ve normal embriyonik böbrek (HEK-293) hücre hatları kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin IC50 değerleri (% 50 oranında tümör hücresi proliferasyonunu inhibe etmek için gerekli konsantrasyon) Çizelge 4.2'de gösterilmektedir.

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 hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 2. Bileşiklerin hücreler üzerindeki IC_{50} (µM) değerleri

IC_{50} (μM)[a,b]		Bileşik					
		1	3	4	5	6	5-Fu
Kanser Hücreleri	DLD-1	36±2.4	>250	>250	>250	>250	50±1.1
	HeLa	>250	85±3.2	110±5.3	124±2.8	90±7.1	19±2.1
	MDA-MB231	>250	>250	>250	>250	>250	22±1.5
	MCF-7	>250	>250	>250	>250	>250	12±1.5
	DU-145	>250	>250	>250	>250	>250	37±2.1
	PC-3	>250	>250	>250	>250	>250	45±1.0
Normal Hücreler	HEK-293	>250	>500	>500	>500	>500	65±1.5
	PNT-1A	>250	>500	>500	>500	>500	142±1.0

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

Sentezlenen bileşiklerin ve kemoterapik madde olan (**5-Fu**) bileşiğinin normal ve kanser hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT ile incelenmesi sonucu IC_{50} değerleri verilen Çizelge 4.1 incelendiğinde; bütün bileşiklerin, HeLa hücre tipine karşı orta ile iyi sitotoksisite sergilediği, ancak diğer kanser hücre hatlarına karşı zayıf sitotoksisite gösterdiği görülebilir. Bileşikler **(3-6)** HeLa hücrelerine karşı aktifliği, 85-124 μM aralığında IC_{50} değerleri gözlenmişken diğer tüm kanser hücre hatları IC_{50} değerleri > 250 μM idi. Ayrıca, sentezlenen bileşikler, normal hücreler üzerinde dikkat çekici sitotoksik etkiler göstermemiştir. Yaygın olarak kullanılan bir ilaç olan 5-Flüorourasil (5-FU), kemoterapötik etkilerin değerlendirilmesinde pozitif kontrol olarak görev yapnmıştır. Sentezlenen bileşiklerin **(3-6)** 5-FU'ninkine benzer aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. CA IX enzimi hücrelerin kanserli durumundan sorumludur ve bu enzimin, HeLa hücre tiplerinde en bol olduğu, yani bileşiklerin **(3-6)** CA IX inhibe edici özellikleri gösterdiği doğrulanabilir. Son literatür çalışmaları bazı kanserli tümörlerde CA IX enzimlerinin varlığını ortaya koyduğu için (De Simone ve ark., 2013; Winum ve ark., 2008), bu çalışmada sunulan sentezlenmiş

bileşikler **(3-6)** in vitro anti-kanser özellikleri göstermiştir. Dahası, Nógrádi tarafından yapılan çalışmalar HeLa hücrelerinde bulunan yüksek CA enzimi düzeylerini göstermiştir (Nógrádi, 1998) ve bu CA IX enziminin HeLa hücrelerinde hücre yoğunluklarına bağlı olduğu görülmüştür; Bununla birlikte, Cianchi ve ark. (2010) ve Pastorekova ve ark. (2007), diğer hücrelerin bu enzime sahip olmadığını veya önemsiz miktarlarda olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, sentezlenen bileşiklerin **(3-6)** HeLa hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik aktiviteler göstermesinin nedeni bu olabilir. Ayrıca, literatür CA enzim inhibe edici aktiviteye sahip aromatik sülfonamidler de bulunmaktadır (Turkmen ve ark., 2005;Durgun, 2005; 2014; Durgun ve ark., 2014; 2015; 2016a; 2016b; 2017).

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Aromatik veya heterosiklik sülfonamit bileşiklerinin ($-SO_2NH_2$) başlıca antibakteriyal, antitümör, diüretik, hipoglisemik, antitiroid, yada proteas inhibitör aktivite ilaçları olarak kulanılmaktadır (Casini ve ark., 2002; Supuran ve ark. 2003a, 2003b; Supuran ve Scozzafava, 2000; 2007).

Yapılan bu çalışmada; birinci basamakta; sülfanilamit (4-aminobenzensülfonamit) **(1)** ile bazik ortamda (piridin) 2-bromopropaonilbromür'ün reaksiyonu sonucu 4-(2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit **(2)** sentezlenmiştir. İkinci basamakta ise 4-(2-metilasetilamino) benzensülfonamit türevleri **(3-6)** sentezlenmiştir. Bunun için, 4-(2-bromo-2-metilasetamido) benzensülfonamit **(2)** bileşiği ile ayrı reaksiyonlar halinde sekonder aminler **(3)** için pirolidin, **(4)** için piperazin, **(5)** için 1-metilpiperazin ve **(6)** için 4-metilpiperidin reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. 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, antimikrobiyal ve antikanser özellik gösterdiği bilinen sülfonamit içeren bileşiklerin bazı türevleri sentezlenmiş, bazı gram-pozitif/negatif ve bazı küflere (maya) karşı ve kanser/normal hücre hatları üzerinde bu bileşiklerin sitotoksite aktiviteleri incelenmiştir. 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.

In vitro antimikrobiyal aktiviteler *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* Gram-pozitif bakteriler ve *Escherichia coli*, *Enterobacter*

aerogenes, Klebsiella pneumonia ve *Pseudomonas aeruginosa* Gram-negatif bakteriler ve *Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae* ile *Yarrowia lipolytica* da küfler ile çalışılmıştır. Antimikrobiyal aktivitelerde; en iyi Gram-pozitif-negatif bakteriler için gözlendiğini ortaya koymuştur; Küflere (maya) karşı yapılan aktiviteler ise asgari düzeydedir. Halka boyutunda artışlar ve azot heteroatomu taşıyan halkalar iyi antimikrobiyal aktivitelere yol açmıştır.

Çalışma sonucunda sentezlenen bileşiklerin kanser hücreleri üzeride olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda; sentezlenen bileşiklerin ve kemoterapik madde olan (**5-Fu**) bileşiğinin normal ve kanser hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; in vitro inhibe edici sitotoksisite aktivitelerinde bileşiklerin **(3-6**) kendi aralarında kıyaslanmasında tüm kanserli hücrelere, özellikle orta derecede aktif olduğu, HeLa hücre tiplerine karşı ise de iyi derecede aktif olduğu bulunmuştur. Yani, bileşikler **(3-6)**, HeLa hücreleri üzerinde önemli sitotoksik etkiler gösterirken; diğer kanser hücrelerine karşı az aktivite göstermiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, karbonik anhidraz araştırma alanının ilerletilmesi için metaloenzim inhibe edici ilaçların tasarımında ve geliştirilmesinde kolaylaştırabilir. Ek olarak, sentezlenen bileşikler, yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesine yardımcı olabilir ve bunların fotofiziksel özellikleri, tıpta teşhis amaçlı görüntüleme amaçları için potansiyel sunabilir.

Bu konunun ilgi çekici ve gelişmeye çok açık olduğu göz önünde bulundurulduğundan, bu çalışma 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

ALTERIO, V., DI FIORE, A., D'AMBROSIO, K., SUPURAN, C. T., & DE SIMONE, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. Chemical Reviews, 112(8): 4421-4468.

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

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.

CIANCHI, F., VINCI, M. C., SUPURAN, C. T., PERUZZI, B., De GIULI, P., FASOLIS, G., PERIGLI,G., PASTOREKOVA, S., PAPUCCI, L., PINI, A., MASINI, E., PUCCETTI, L. 2010. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 334(3): 710-719.

COLLINS, C.H., LYNE, P.M., GRANGE, J.M., FALKINHAM, J.O. III (Eds.), Collins and Lyne's Microbiological Methods, eighth ed., Arnold Publishers, London, UK, 2004.

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.

DE SIMONE, G., ALTERIO, V., and SUPURAN, C. T. 2013. Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. Expert Opinion on Drug Discovery, 8(7): 793-810.

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

DOUB, L., VANDENBELT, J.M. 1949. J. Am. Chem. Soc. 71 (7): 2414–2420.

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., CEYLAN, Ü., YALÇIN, Ş. P., TÜRKMEN, H., ÖZDEMİR, N., & KOYUNCU, İ. 2016b. Synthesis, molecular structure, spectroscopic characterization, NBO, NLO and NPA analysis and in vitro cytotoxicity study of 3-chloro-N-(4-sulfamoylphenethyl) propanamide with experimental and computational study. Journal of Molecular Structure, 1114: 95-107.

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. 2016a. 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.

GARCÍA-GALÁN, M. J., DÍAZ-CRUZ, M. S., & BARCELÓ, D. (2009). Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. Trac Trends in Analytical Chemistry, 28(6): 804-819.

IBRAHİM, H. S., ABOU-SERİ, S. M., TANC, M., ELAASSER, M. M., ABDEL-AZİZ, H. A., and SUPURAN, C. T. 2015. Isatin-pyrazole benzenesulfonamide hybrids potently inhibit tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII. European journal of medicinal chemistry, 103: 583-593.

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

LAD, N. P., MANOHAR, Y., MASCARENHAS, M., PANDIT, Y. B., KULKARNI, M. R., SHARMA, R., SALKAR, K., SUTHAR, A. andPANDIT, S. S. 2017. Methylsulfonyl benzothiazoles (MSBT) derivatives: Search for new potential antimicrobial and anticancer agents. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 27(5): 1319-1324.

LANG, L. 1961. (Ed.), Absorption Spectra in the Ultraviolet and Visible Region, vol. 1, Academic Press, New York, NY, USA, 1961.

LONG, Y., YU, M., LI, P., ISLAM, S., GOH, A. W., KUMARASIRI, M., & WANG, S. 2016. Synthesis and biological evaluation of heteroaryl styryl sulfone derivatives as anticancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry letters, 26(23), 5674-5678.

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.

MULCHIN, B.J., NEWTON, C.G., BATY, J.W., GRASSO, C.H., MARTIN, W.J.; WALTON, M.C., DANGERFİELD, E.M., PLUNKETT, C.H., BERRİDGE, M. V., HARPER, J.L., TIMMER, M.S.M., STOCKER, B.L. 2010. The anti-cancer, anti-inflammatory and tuberculostatic activities of a series of 6,7-substituted-5,8-quinolinequinones. Bioorganic & Medicinal Chemistry,18: 3238-3251.

NCCLS, 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, IV. Ed., Approved Standard M7-A4, Wayne, P.A.

NÓGRÁDI, A. 1998. The role of carbonic anhydrases in tumors. The American Journal of Pathology, 153(1), 1.

PASTOREKOVA, S., KOPACEK, J., & PASTOREK, J. 2007. Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer. Current topics in medicinal chemistry, 7(9): 865-878.

RAKESH, K. P., WANG, S. M., LENG, J., RAVINDAR, L., ASIRI, A. M., MARWANI, H. M., & QIN, H. L. (2018). Recent development of sulfonyl or sulfonamide hybrids as potential anticancer agents: a key review. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 18(4): 488-505.

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

SUPURAN, C.T. 2017. Special Issue: Sulfonamides. Molecules, *22*:1642-1644.

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.

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.

WINUM, J. Y., RAMI, M., SCOZZAFAVA, A., MONTERO, J. L., and SUPURAN, C. 2008. Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. Medicinal Research Reviews, 28(3): 445-463.

ZHANG, X., LIN, Y., LIU, L., LIN, C. 2015. Luminescence 30: 269–279.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet KOYUNSEVER
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa-Siverek/10.11.1979
Telefon : 05534532023
Faks :
e-mail : mkoyunsever@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Siverek Lisesi– Siverek/Şanlıurfa	1997
Üniversite	: Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü - Şanlıurfa	2009
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı - Şanlıurfa	2019

İŞ DENEYİMLERİ

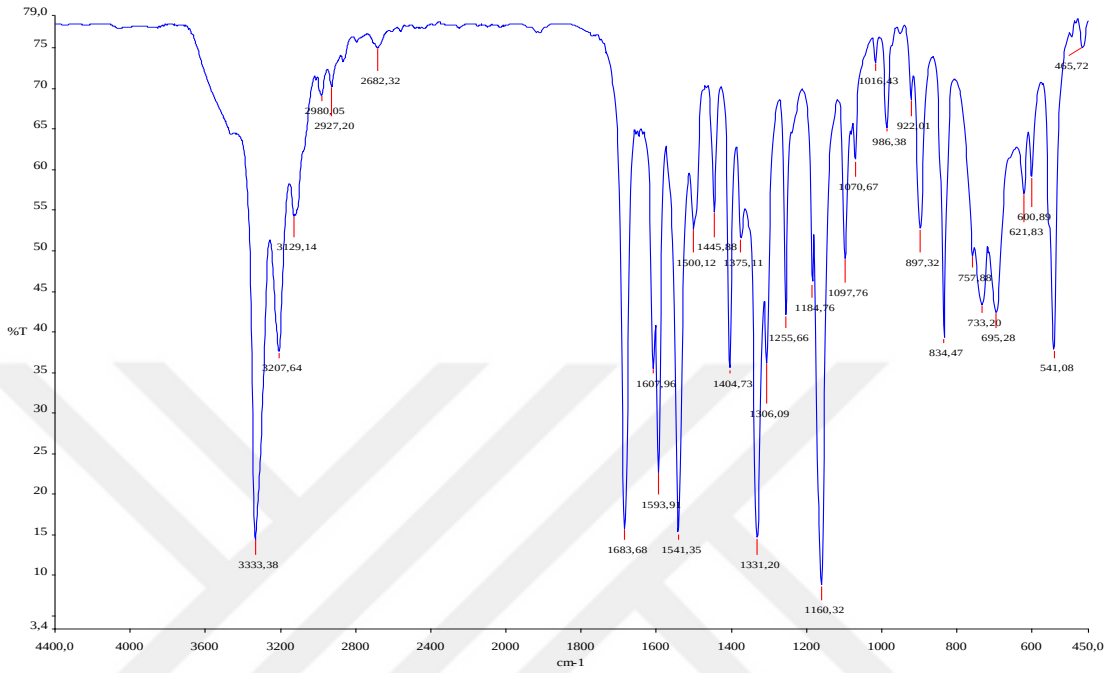
Yıl	Kurum	Görevi

YAYIN

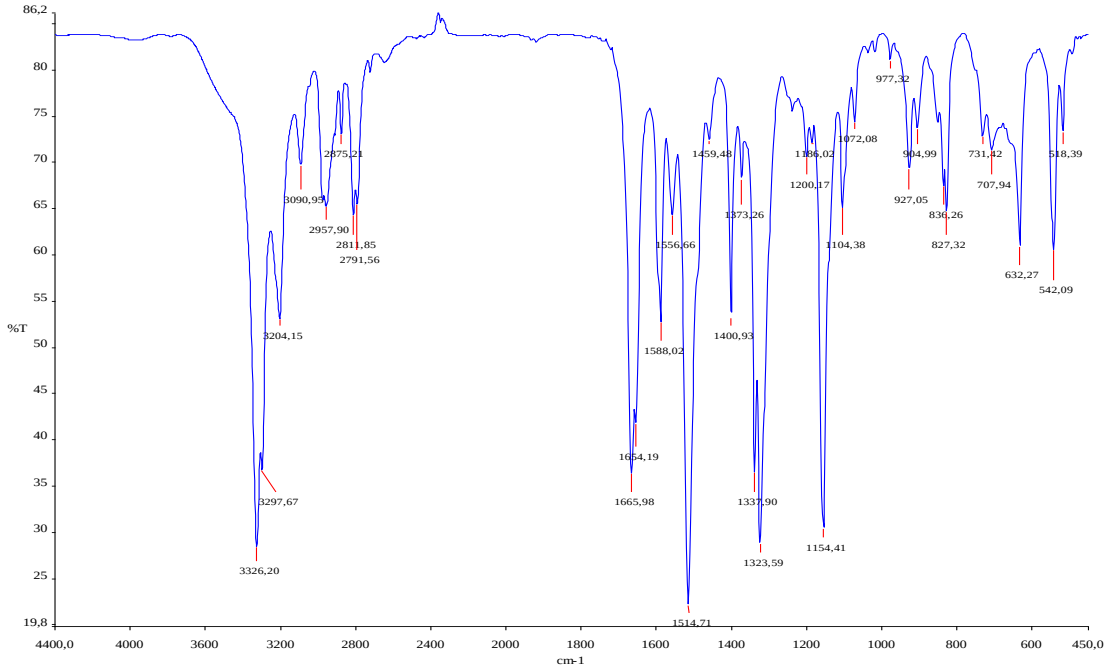
DURGUN, M., TURKMEN, H., ZENGİN, G., ZENGİN, H., KOYUNSEVER, M., and KOYUNCU, I. 2017. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and antimicrobial investigation and evaluation of physicochemical properties of novel 4-(2-methylacetamide) benzenesulfonamide derivatives. Bioorganic chemistry, 70:163-172.

EKLER

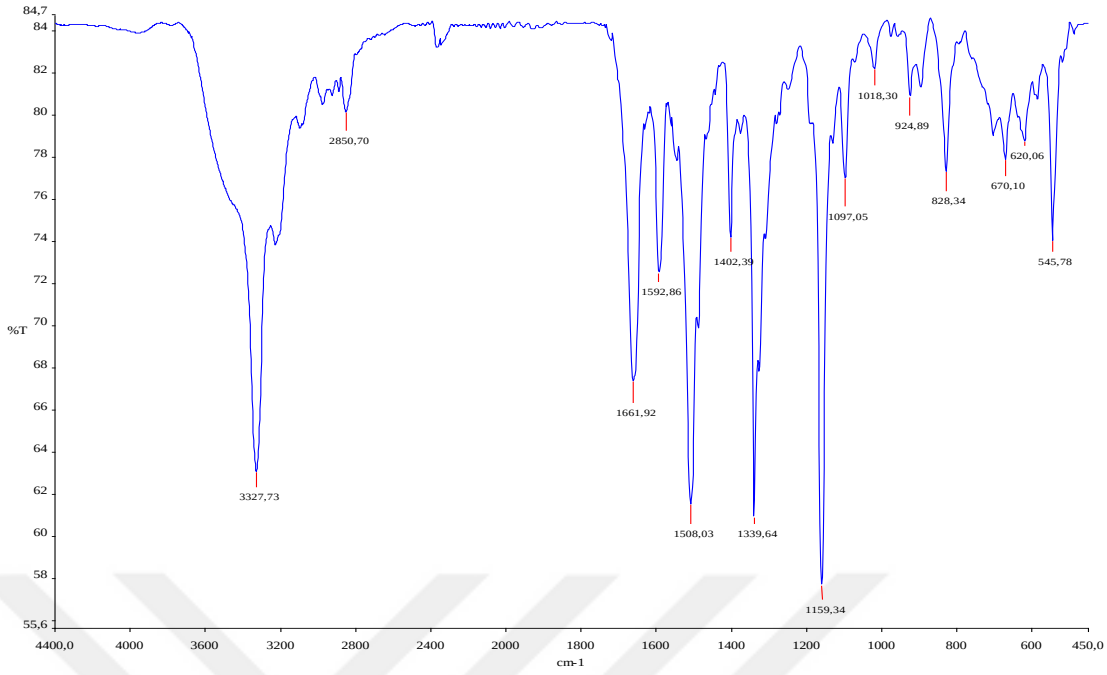
EK 1 Sentezlenen Bileşiklerin FT-IR Spektrumları



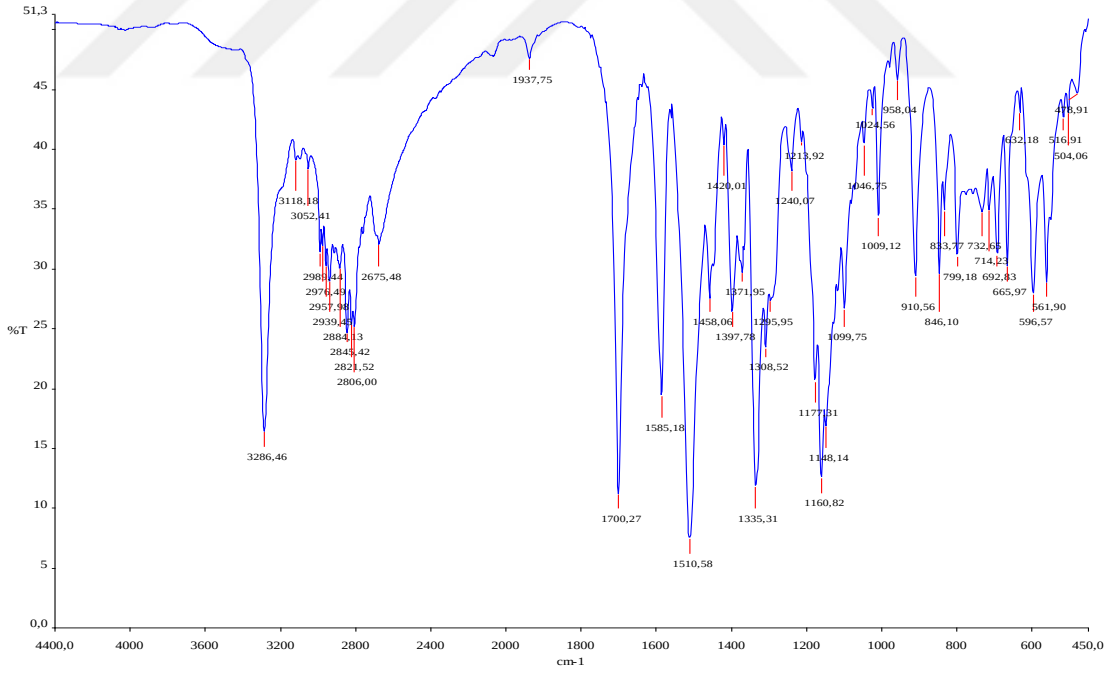
Ek Şekil 1.1. **2** nolu bileşiğin FT-IR spektrumu



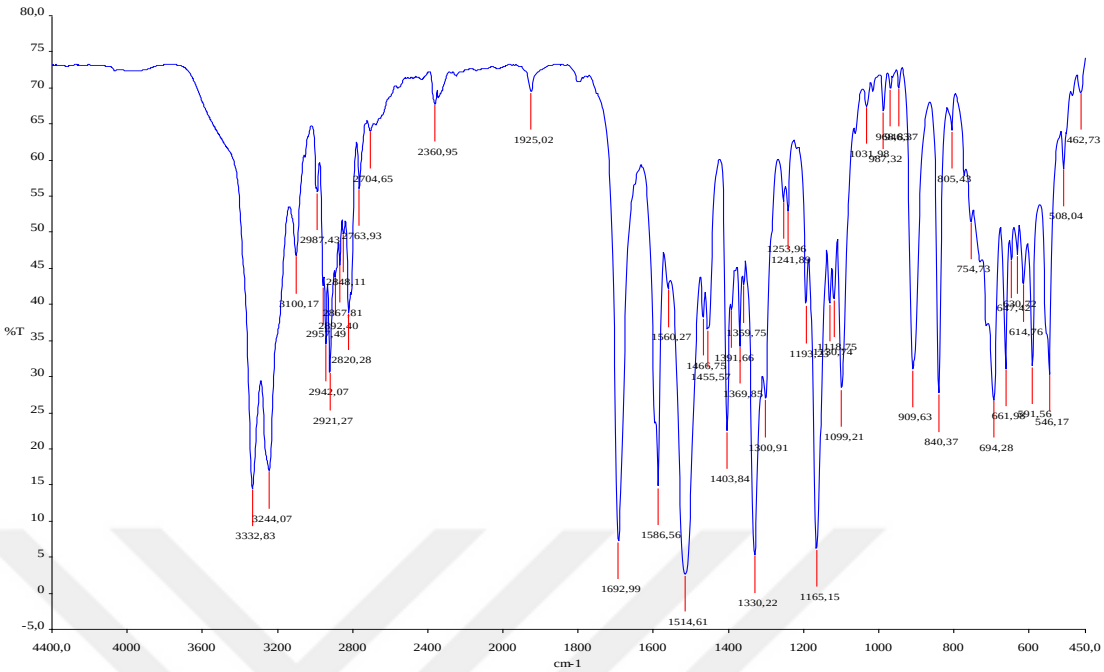
Ek Şekil 1.2. **3** nolu bileşiğin FT-IR spektrumu



Ek Şekil 1.3. **4** nolu bileşiğin FT-IR spektrumu

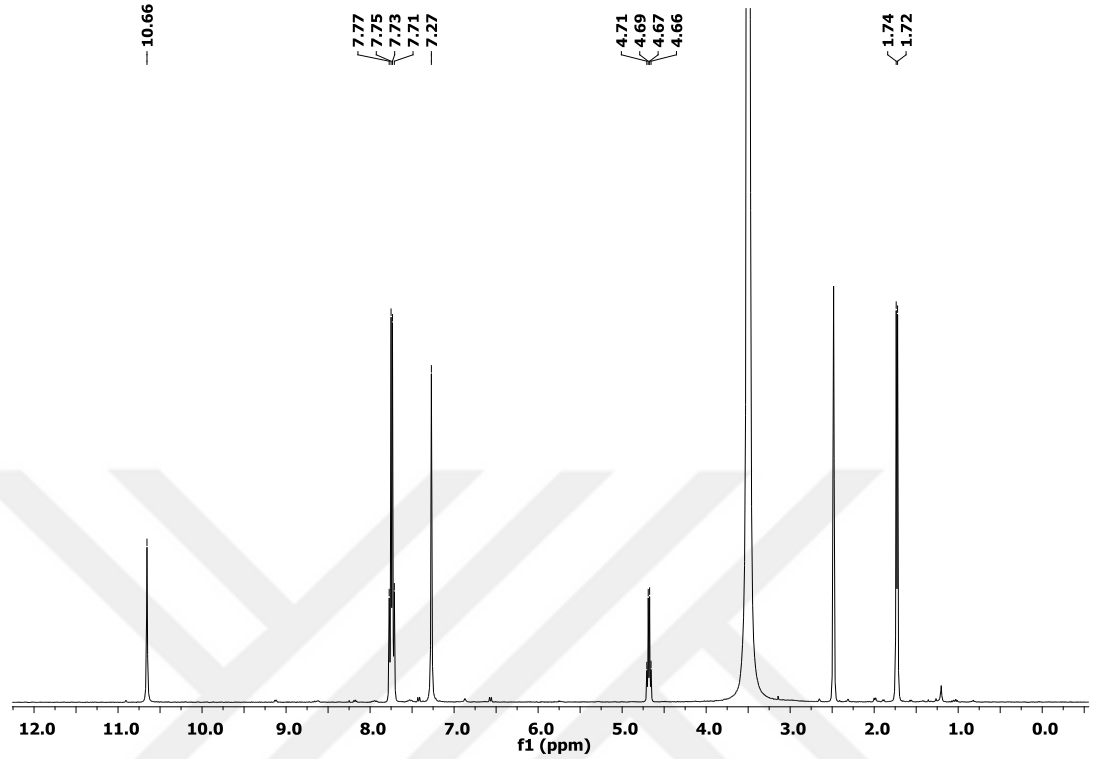


Ek Şekil 1.4. **5** nolu bileşiğin FT-IR spektrumu

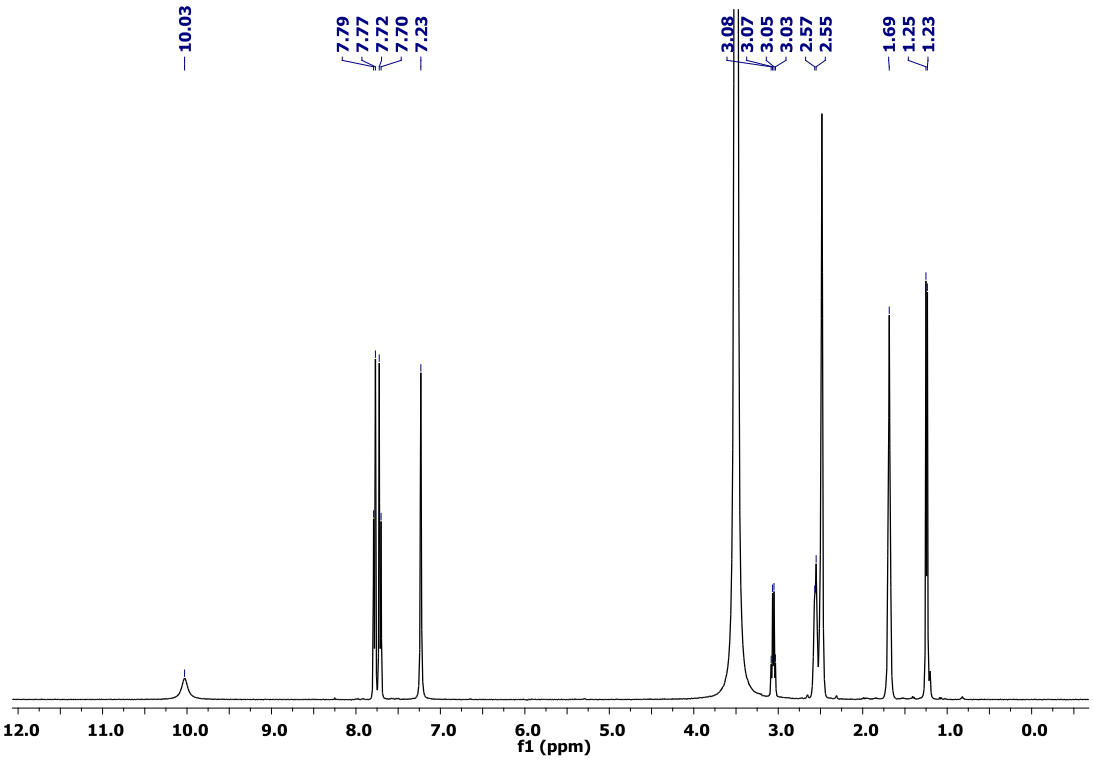


Ek Şekil 1.5. **6** nolu bileşiğin FT-IR spektrumu

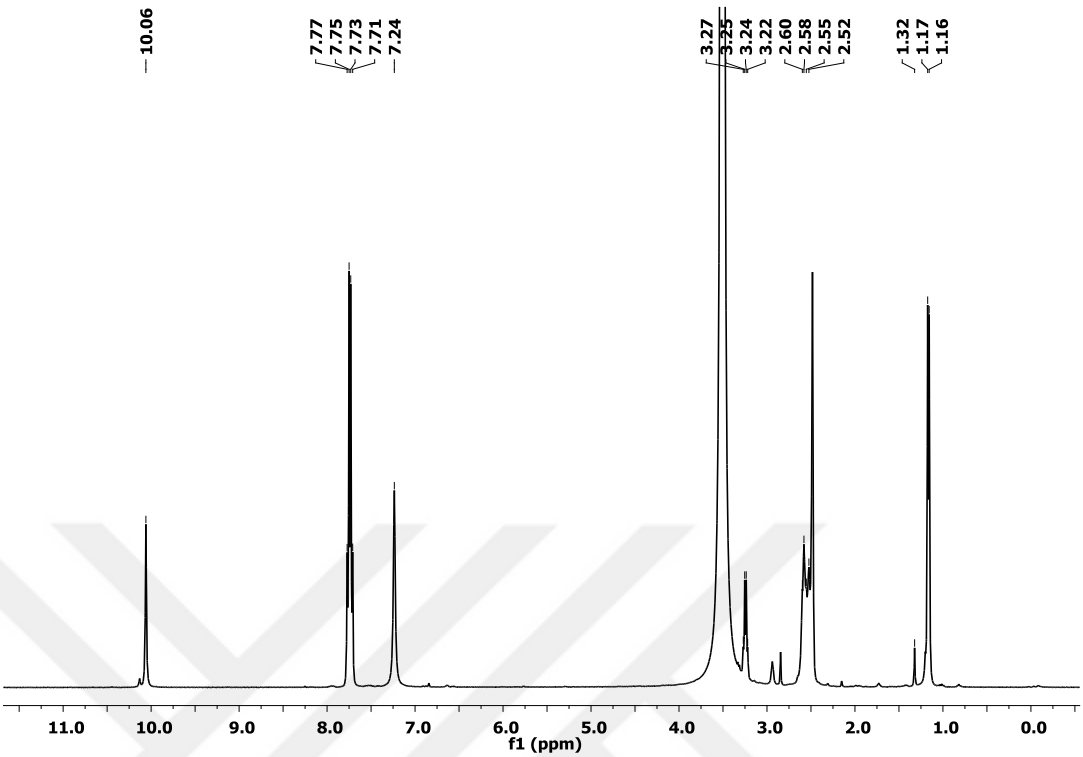
EK 2 Sentezlenen Bileşiklerin ^{1}H NMR Spektrumları



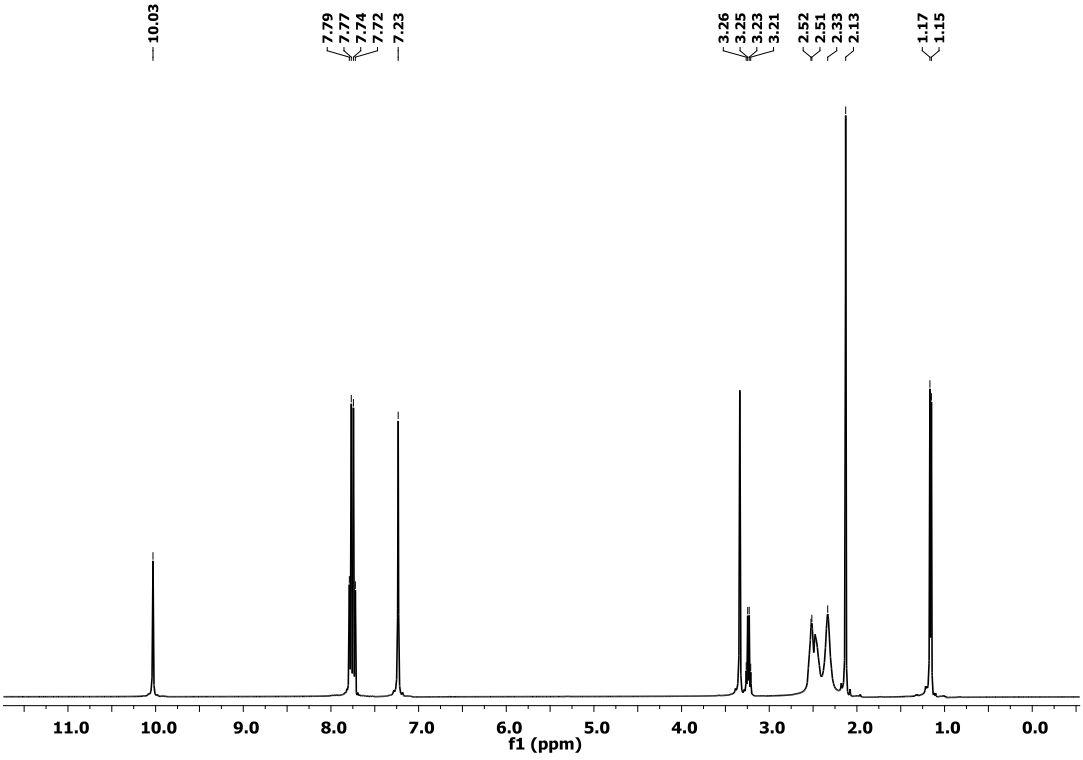
Ek Şekil 2.1. **2** nolu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumu



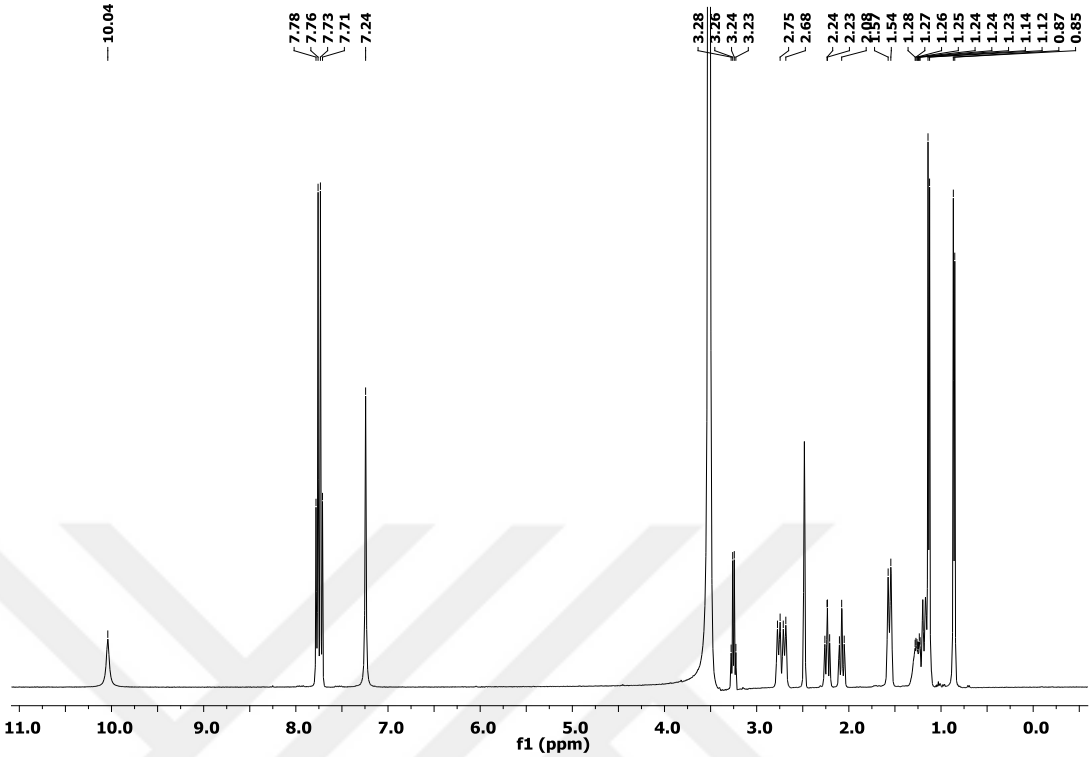
Ek Şekil 2.2. **3** nolu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumu



Ek Şekil 2.3. **4** nolu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumu

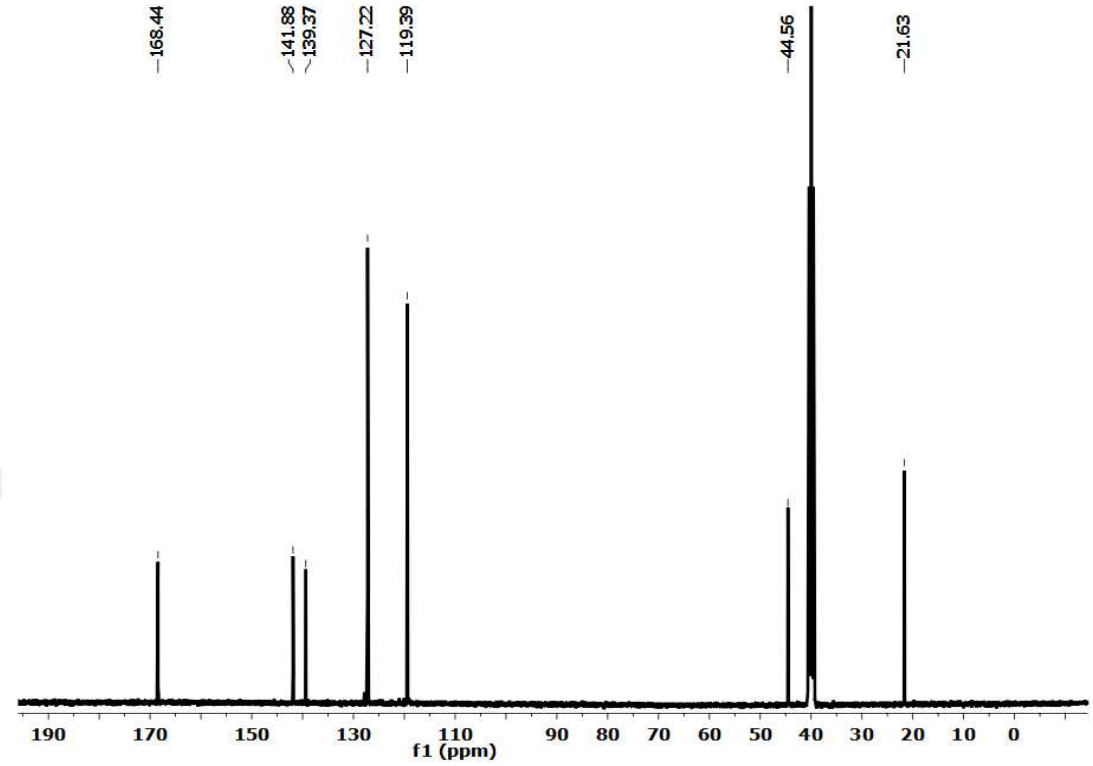


Ek Şekil 2.4. **5** nolu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumu

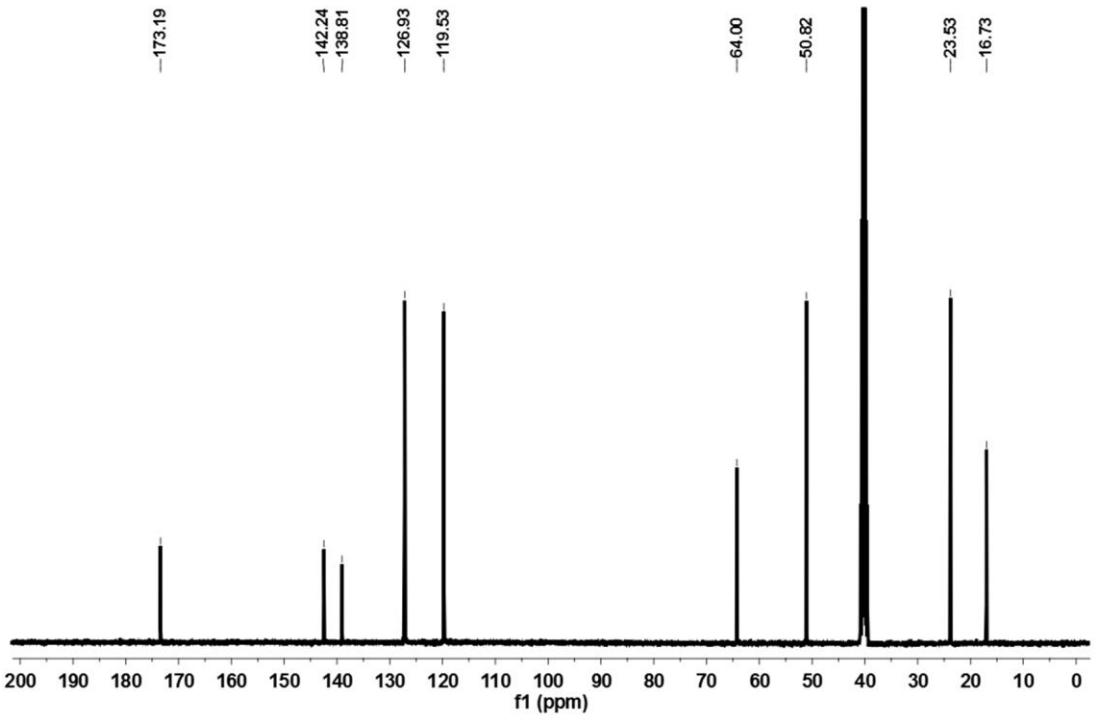


Ek Şekil 2.5. **6** nolu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumu

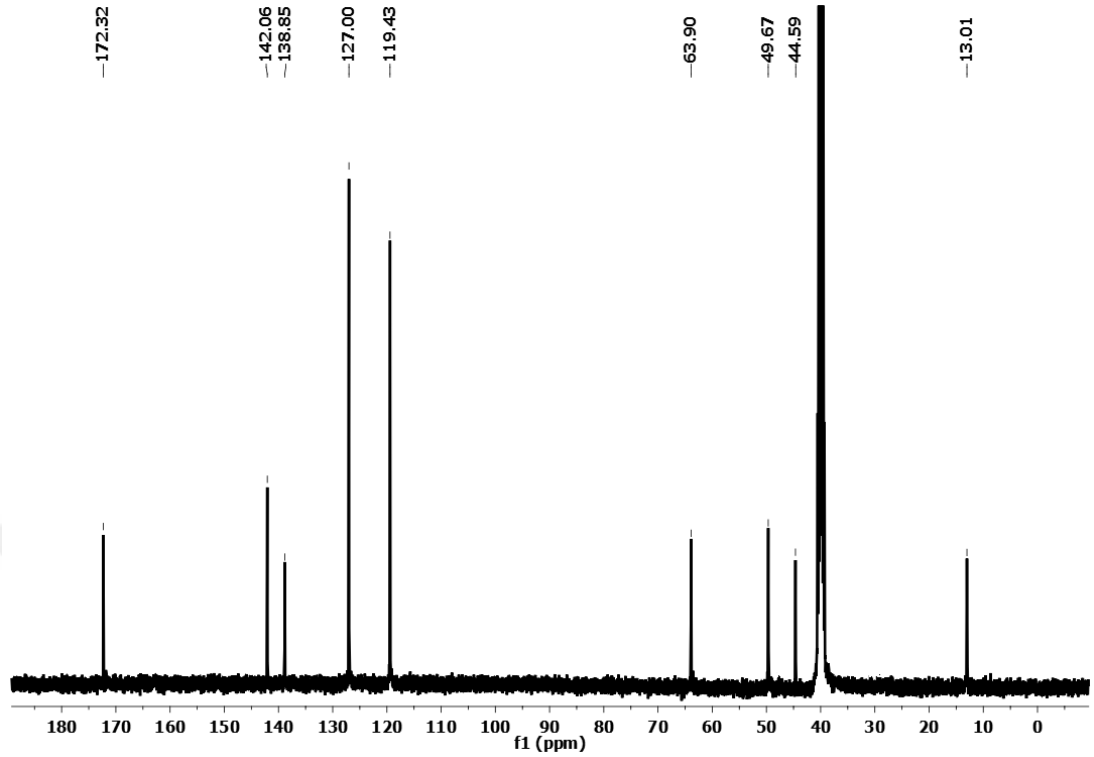
EK 3 Sentezlenen Bileşiklerin ^{13}C NMR Spektrumları



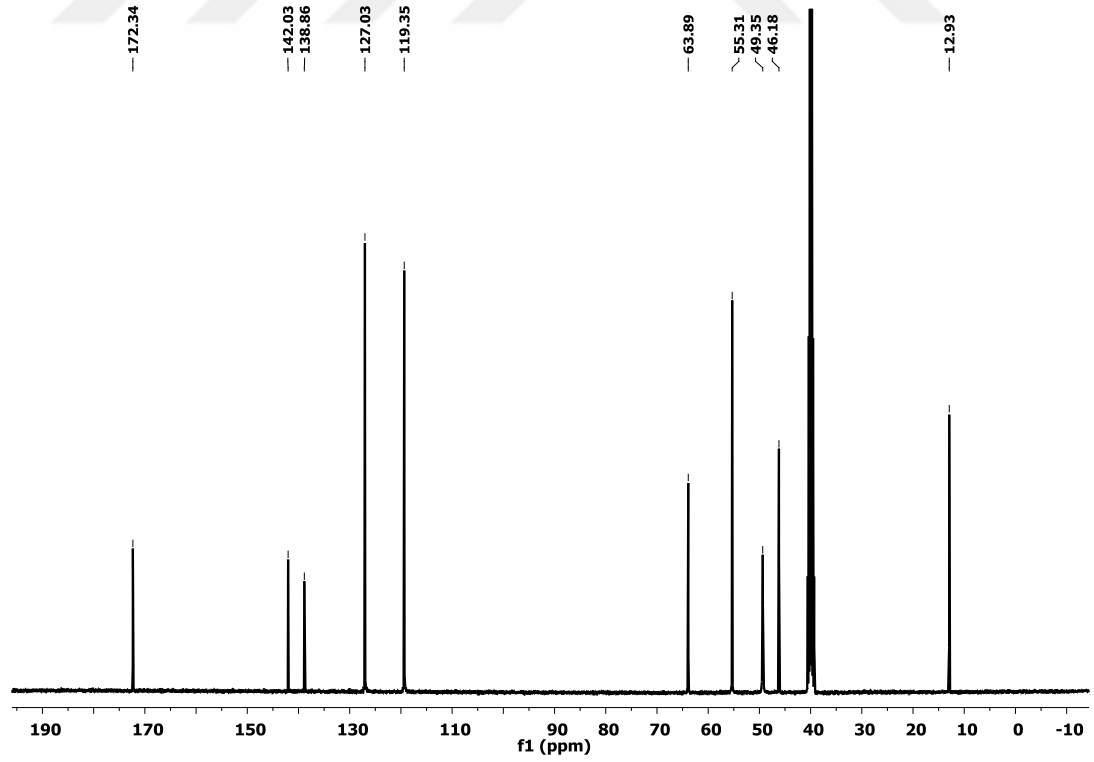
Ek Şekil 3.1. **2** nolu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu



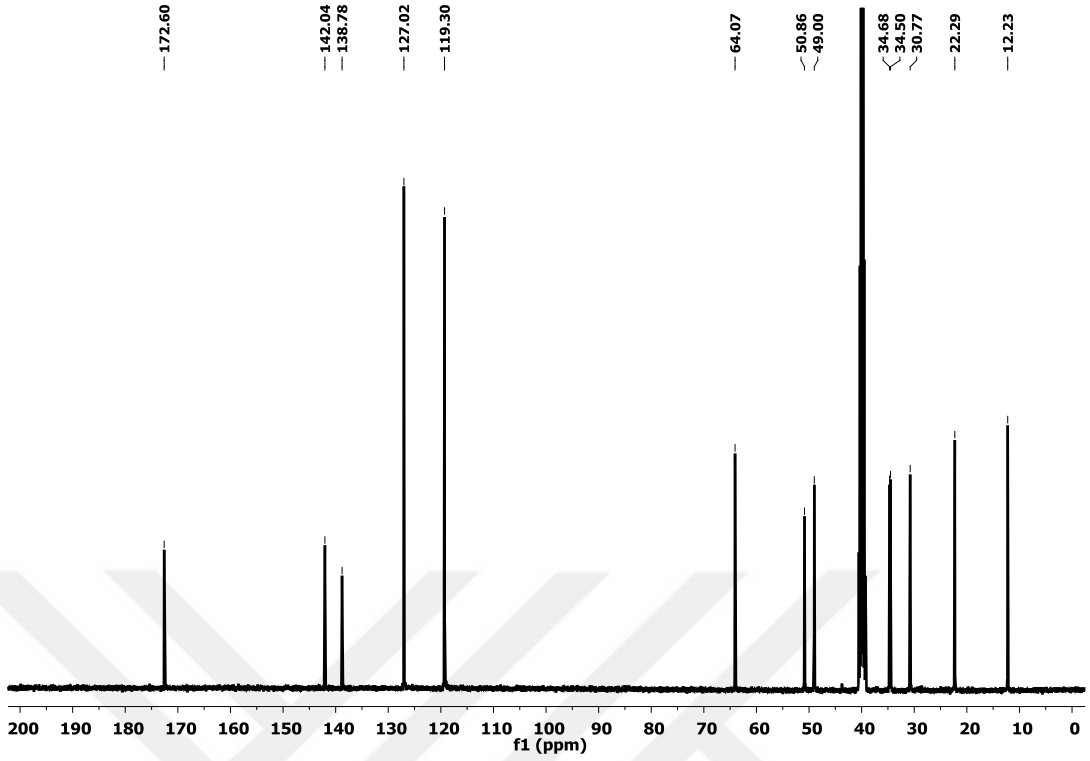
Ek Şekil 3.2. **3** nolu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu



Ek Şekil 3.3. **4** nolu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

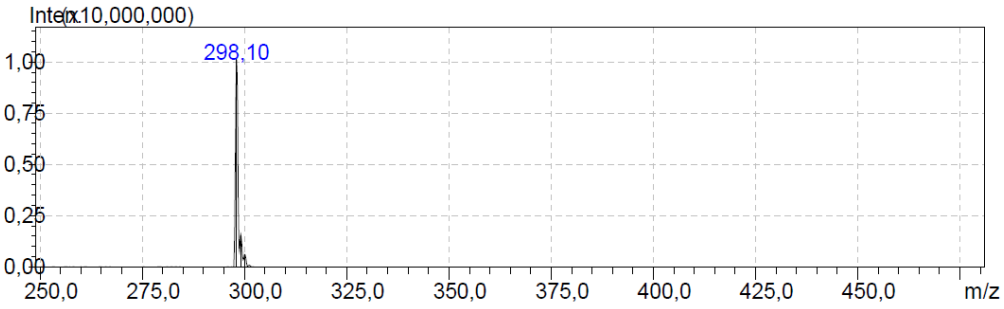


Ek Şekil 3.4. **5** nolu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

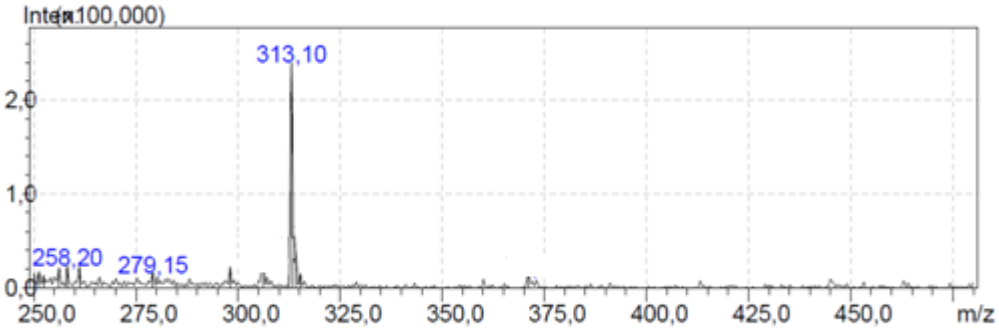


Ek Şekil 3.5. **6** nolu bileşiğin ^{13}C NMR spektrumu

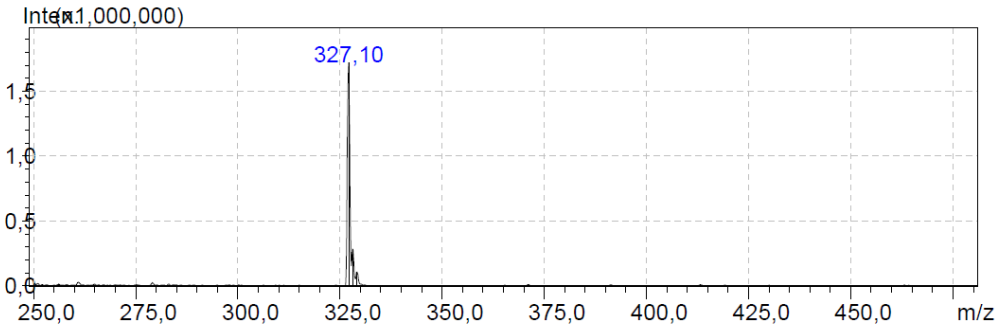
EK 4 Sentezlenen Bileşiklerin LC-MS/MS Spektrumları



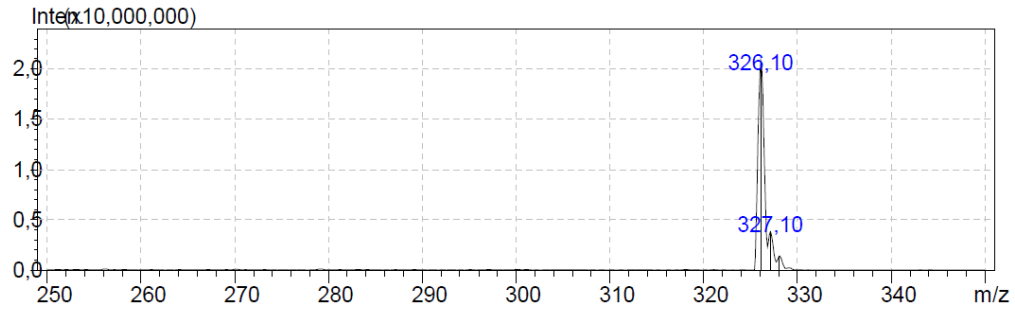
Ek Şekil 4.1. **3** nolu bileşiğin LC-MS/MS spektrumu



Ek Şekil 4.2. **4** nolu bileşiğin LC-MS/MS spektrumu



Ek Şekil 4.3. **5** nolu bileşiğin LC-MS/MS spektrumu



Ek Şekil 4.4. **6** nolu bileşiğin LC-MS/MS spektrumu