



VI. ULUSAL FARMASÖTİK KİMYA KONGRESİ

BİLDİRİ ÖZETLERİ KİTABI

26-29 AĞUSTOS 2022 / İSTANBUL



FBÜ
FENERBAHÇE ÜNİVERSİTESİ





FBÜ
FENERBAHÇE ÜNİVERSİTESİ



Onursal Başkan

Prof. Dr. Mehmet Emin ARAT

Kongre Başkanı

Prof. Dr. Ayla BALKAN

Kongre Eş Başkanı

Prof. Dr. Ş. Güniz KÜÇÜKGÜZEL

Düzenleme Kurulu

Prof. Dr. İlkay KÜÇÜKGÜZEL

Prof. Dr. Zeynep ATEŞ ALAGÖZ

Prof. Dr. Sultan BAYTAŞ

Prof. Dr. Semra UTKU

Doç. Dr. Çiğdem KARAASLAN KIRMIZIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Mahmut GÖZELLE

Yerel Düzenleme Kurulu

Prof. Dr. Bedia KAYMAKÇIOĞLU

Doç. Dr. Sevgi KARAKUŞ

Doç. Dr. Sevil ŞENKARDEŞ

Dr. Öğr. Üyesi Necla KULABAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Aslı TÜRE

Dr. Öğr. Üyesi Fatih TOK

Bilim Kurulu

Prof. Dr. Erden BANOĞLU

Prof. Dr. Hülya AKGÜN

Prof. Dr. İlkay KÜÇÜKGÜZEL

Prof. Dr. Mehmet TANOL

Prof. Dr. Mehmet Varol PABUÇÇUOĞLU

Prof. Dr. Mustafa Orhan PÜSKÜLLÜ

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Prof. Dr. Nesrin GÖKHAN KELEKÇİ

Prof. Dr. Nilgün Lütfiye KARALI

Prof. Dr. Oya BOZDAĞ DÜNDAR

Prof. Dr. Semra UTKU

Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK

Doç. Dr. İnci Selin DOĞAN

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KOCA

İÇİNDEKİLER

SÖZLÜ SUNUMLAR

- S1 KOJİK ASİT TÜREVİ MANNİCH BAZLARININ SENTEZİ VE İNSAN MELANOMA HÜCRELERİNE ETKİSİ İLE ANTİTİROZİNAZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI** X
Gülşah KARAKAYA, Mutlu AYTEMİR
- S2 TACC3 İNHİBİTÖRÜ YENİ 2,4-DİAMİNOPİRİMİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ANTI-KANSER ETKİ POTANSİYELLERİ VE İLAÇ BENZERİ ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR** X
Deniz LENGİRLİ, Özge AKBULUT, Burcu ÇALIŞKAN, Özgür ŞAHİN, Erden BANOĞLU
- S3 BİR GRUP HETEROSİKLİK BİLEŞİĞİN AMİT, HİDRAZİT VE HİDROKSAMİK ASİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI** X
Merve SAYLAM, Fadime AYDIN KÖSE, Aysun PABUÇÇUOĞLU, Muhittin AYGÜN, Varol PABUÇÇUOĞLU
- S4 BAZI YENİ MONOKATYONİK GUANİDİNO BENZİMİDAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE ANTİPARAZİTER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ** X
Fatıma DOĞANÇ, İsmail ÇELİK, Gökçen EREN, Marcel KAİSER, Reto BRUN, Hakan GÖKER
- S5 YENİ BAZI PÜRİN, PİRİMİDİN NÜKLEOZİT ANALOĞU BİLEŞİKLERİN SENTEZ, YAPI AYDINLATILMASI VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR** X
Duygu ALTIPARMAK, Meral TUNÇBİLEK, İrem DURMAZ ŞAHİN, Rengül ÇETİN ATALAY
- S6 BAZI VİSİNAL DİARİL HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI** X
Sümeyye TURANLI, Esra NALBAT, Ece AKHAN GÜZELCAN, Rengül ÇETİN ATALAY, Burcu ÇALIŞKAN, Erden BANOĞLU
- S7 2019-nCoV VİRÜSÜNE KARŞI ETKİLİ OLABİLECEK MOLEKÜLLERİN İLAÇ YENİDEN YAPILANDIRMA VE MAKİNE ÖĞRENİM YAKLAŞIM YÖNTEMLERİ İLE SAPTANMASI** X
Ersin GÜNER, Özgür ÖZKAN, Süreyya ÖLGEN
- S8 YENİ PLATELET İNHİBİTÖRÜ TUZLARIN İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK GELİŞTİRİLMESİ VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI** X
Harun USLU, Basri SATILMIŞ, Ayşe Burçin UYUMLU, Begüm Nurpelin SAĞLIK, Serkan LEVENT, Yusuf ÖZKAY, Metin Fikret GENÇ, Kadir BATÇIOĞLU, Suat KAMIŞLI, Kadriye BENKLİ
- S9 YENİ SÜBSTİTÜE PİRİMİDİNİLTİYOMETİL TİYAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE FARMAKOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI** X
Zafer ŞAHİN, Sevede Nur BİLTEKİN, Leyla YURTTAŞ, Barkın BERK, Yağmur ÖZHAN, Hande SİPAHİ, Zhan-Guo GAO, Kenneth A. JACOBSON, Şeref DEMİRAYAK
- S10 KARACİĞER KANSERİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDE İNHİBİTÖR ETKİYE SAHİP, POTANSİYEL ANTİKANSER AJANLAR OLARAK YENİ İZOKSAZOL-PİPERAZİN HİBRİTLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ** X
Kübra İBİŞ, Esra NALBAT, Burcu ÇALIŞKAN, Rengül ÇETİN ATALAY, Erden BANOĞLU
- S11 BAZI YENİ 4-AMİNOKİNAZOLİN KARBOKSAMİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ** X
Cemre ACAR, Tuncagül ALTUNTAŞ, Hakan GÖKER, Arzu BEŞİKÇİ, Berna GÜVEN, İsmail ÇELİK
- S12 BAZI PİRİDAZİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ** X
Burcu KILIÇ, Deniz S. DOĞRUER
- S13 BAZI YENİ FLOROKİNOLON TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ** X
Pınar POYRAZ YILMAZ, Necla KULABAŞ, Arif BOZDEVECİ, Vagolu Siva KRISHNA, Şengül ALPAY KARAOĞLU, Dharmarajan SRIRAM, İlkay KÜÇÜKGÜZEL

- S14** 3,6-DİSÜBSTİTÜE BENZOKSAZOL-2(3H)-ON/BENZOTİYAZOL-2(3H)-ON TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ X
Merve BARDAKKAYA, Deniz S. DOĞRUER
- S15** POTANSİYEL -GLUKOZİDAZ İNHİBİTÖRÜ BİR GRUP 2-SÜBSTİTÜE-KİNAZOLİNON TÜREVİ BİLEŞİĞİN SENTEZ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI X
Emre Kadir AYAN, Zeynep SOYER
- S16** YENİ BİR GRUP POTANSİYEL ANTI-ALZHEİMER ETKİLİ TAKRİN-DONEPEZİL HİBRİTLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR X
Merve SAYLAM, Fadime AYDIN KÖSE, Aysun PABUÇÇUOĞLU, Muhittin AYGÜN, Varol PABUÇÇUOĞLU
- S17** YENİ PİRAZOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, SPEKTRAL KARAKTERİZASYONU, FLORESANS ÖZELLİKLERİNİN VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ X
Zefine UĞRAŞ, Fatih TOK, Emine ŞALVA, Gözde ULTAV, Bedia KAYMAKÇIOĞLU
- S18** KANSER İMMÜNOTERAPİSİNE YÖNELİK PEPTİT SEKANSLARININ BELİRLENMESİ VE SENTEZİ X
Zefine UĞRAŞ, Fatih TOK, Özgür YILMAZ

POSTER SUNUMLAR

- P1** YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖR ADAYLARININ SANAL TARAMA YÖNTEMİ İLE KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ X
Fikriye ÖZGENCİL, Yeşim ÖZKAN, Gökçen EREN
- P2** YENİ 2-HİDRAZİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE KOLİNESTERAZ, MONOAMİN OKSİDAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI X
Beyzanur TUTUŞ, Leyla YURTTAŞ
- P3** BAZI 2-FENOKSİASETAMİT/ 3-FENOKSİPROPANAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ X
Shakila SHAKILA, Burcu KILIÇ, Rahşan İLİKÇİ SAĞKAN, Fatma AKSAKAL, Deniz S. DOĞRUER
- P4** BAZI YENİ KİNOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ANTİMİKROBİYAL VE DNA GİRİZ İNHİBİTÖRÜ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI X
Asaf Evrim EVREN, Leyla YURTTAŞ
- P5** BAZI YENİ TRİAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE CANDİDA TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI X
Emir GÜZEL, Ulviye ACAR ÇEVİK, Asaf Evrim EVREN, Ülkiye Dudu GÜL, Gizem BAYAZIT, Yusuf ÖZKAY, Zafer Asım KAPLANCIKLİ
- P6** BİR SERİ ADAMANTAN HALKASI TAŞIYAN SPIROTİYAZOLİDİNON YAPISINDAKİ BİLEŞİĞİN SENTEZİ VE YAPILARININ AYDINLATILMASI X
Başak Türk ERBUL, Ecem Fatma KARAMAN, Sibel ÖZDEN, Füsün GÖKTAŞ
- P7** FENOTİYAZİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZLERİ, ANTİKANSER AKTİVİTELERİ VE MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZLERİ X
Mehmet Murat KIŞLA, Murat YAMAN, Özlen KONU, Zeynep ATEŞ ALAGÖZ
- P8** BAZI KİNAZOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE NÖTRAL SFİNGOMİYELİNAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ X
Özge KUYRUKÇU, Yasemin DÜNDAR
- P9** BİYOLOJİK ETKİLİ YENİ BAZI KİNAZOLİN BİLEŞİKLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR X
Işıl GÜLTEKİN, Filiz BAKAR, Oya BOZDAĞ-DÜNDAR
- P10** BAZI YENİ 4-(FURAN-2-İLMETİL)-6-METİLPİRİDAZİN-3(2H)-ONLARIN SENTEZİ, ANTİMİKROBİYEL VE ANTİFUNGAL DEĞERLENDİRİLMESİ X
Burcu KARAYAVUZ, Vagolu Siva KRISHNA, Didem KART, Oya Unsal TAN
- P11** SİSPLATİN BENZERİ PLATİN KOMPLEKSLERİNİN SENTEZİ VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI X
Emre CANBOLAT, Rahşan İLİKÇİ SAĞKAN, Semra UTKU
- P12** İMİDAZOL TÜREVİ TAŞIYICI LİGANDA SAHİP PLATİN KOMPLEKSLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR X
Emine Merve ERTUĞRUL, Nebahat Aytuna ÇERÇİ, Betül Aydın, Leyla Açık, Semra UTKU
- P13** PLATİN(II) KOMPLEKSLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR X
Özge ERYİĞİT, Nebahat Aytuna ÇERÇİ, Betül AYDIN, Leyla AÇIK, Semra UTKU
- P14** BENZİMİDAZOL TÜREVİ ÖNCÜ BİLEŞİĞİN İN VİVO ANALJEZİK VE ANTİİNFLAMATUVAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI X
Yusuf KAPTANOĞLU, Zehra Tuğçe GÜR MAZ, Nur Banu BAL, Erden BANOĞLU, Mecit Orhan ULUDAĞ
- P15** SÜLFONİL-TİYOSEMİKARBAZİT TAŞIYAN KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TAYİNİ X
Esmâ ÖZCAN, Ufuk İNCE, Şengül Dilem DOĞAN, Muhammed İhsan HAN
- P16** POTANSİYEL α-GLUKOZİDAZ İNHİBİTÖRÜ BAZI KİNOKSALİN-HİDRAZON TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI X
Melike YAVUZ, Şirin UYSAL, Zeynep SOYER

P17	POTANSİYEL a-GLUKOZİDAZ İNHİBİTÖRÜ BAZI FTALİMİT-SÜLFONAMİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI Sümeyye YURT, Şirin UYSAL, Zeynep SOYER	X
P18	BENZAZOL TÜREVİ BAZI YENİ BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI Gözde Yenice ÇAKMAK, Serap YILMAZ	X
P19	ASETAMİNOFEN SAFSIZLIKLARINDAN BİRİNİN SENTEZİ, STANDART HÂLE GETİRİLMESİ ve İLGİLİ ÇOK YÜKSEK BAŞARIMLI SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ ve VALİDASYONU Cemil Caner ARIKAN, İlkay KÜÇÜKGÜZEL	X
P20	AMİNO ASİT TAŞIYAN BİR GRUP ÜRE VE TİYOÜRE TÜREVİ BİLEŞİĞİN SENTEZİ VE ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ Özlem AKGÜL, Aslı ŞAHİNER	X
P21	ANTİKANSER ETKİLİ YENİ TİYAZOL VE TİYADIAZOL İÇEREN BİLEŞİKLERİN SENTEZİ Sedanur EKREK, Sevil ŞENKARDEŞ, Ömer ERDOĞAN, Özge ÇEVİK	X
P22	1,2,4-TRIAZOL HALKASI İÇEREN YENİ TİYOETER TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ Selma CRNISANIN, Necla KULABAŞ, Merve GÜRBOĞA, Gamze ÇİFTÇİ, Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR, Kemal YELEKÇİ, İlkay KÜÇÜKGÜZEL	X
P23	YENİ BAZI PÜRİN ANALOĞU BİLEŞİKLERİN SENTEZ, YAPI AYDINLATILMASI VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR Pınar KUL, Meral TUNÇBİLEK, Mustafa ERGÜL, Ezgi Nurdan YENİLMEZ TUNOĞLU, Yusuf TUTAR	X
P24	YENİ 5-NİTROTİYOFEN TÜREVLERİNİN SENTEZİ DFT HESAPLAMALARI, MOLEKÜLER YERLEŞTİRME ÇALIŞMALARI VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ Demokrat NUHA, Asaf Evrim EVREN, Zennure Şevval ÇİYANCI, Halide Edip TEMEL, Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ, Leyla YURTTAŞ	X
P25	YENİ TİYAZOLİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE SELEKTİF SİKLOOKSİJENAZ-2 (COX-2) ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI Shoruq Ahmed NAJİ, Begüm Nurpelin SAĞLIK, Asaf Evrim EVREN, Ahmet Çağrı KARABURUN	X
P26	İZONİYAZİT HİDRAZON BİLEŞİKLERİNİN İN VİTRO MİKROZOMAL METABOLİZMA ÇALIŞMASI İLE N-OKSİT METABOLİTLERİNİN İNCELENMESİ Elif Göksu ALGIN, Jülide Cansu KARAKOÇ, Başak TÜRK ERBUL, Göknil Pelin COŞKUN, Mert ÜLGEN	X
P27	İBUPROFEN İLE SÜLFONAMİT KOMBİNASYONUyla OLUŞTURULAN KARŞILIKLI ÖN İLAÇLARIN (CO-DRUG) İN VİTRO MİKROZOMAL METABOLİZMA ÇALIŞMALARI Melis ÇETİN, Jülide Cansu KARAKOÇ, Başak TÜRK ERBUL, Göknil Pelin COŞKUN, Mert ÜLGEN	X
P28	ARİLOKSİ BENZAMİT YAPISINDA SİRTUİN İNHİBİTÖRÜ OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI Semih YAĞCI, Mahmut GÖZELLE, Yeşim ÖZKAN, Filiz BAKAR ATEŞ, Gökçen EREN	X

SÖZLÜ SUNUMLAR

KOJİK ASİT TÜREVİ MANNİCH BAZLARININ SENTEZİ VE İNSAN MELANOMA HÜCRELERİNE ETKİSİ İLE ANTİTİROZİN AZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

SI

Gülşah KARAKAYA¹, Mutlu AYTEMİR^{1,2}

¹ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35620, İzmir

² Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35620, İzmir

(e-posta: gulsah.karakaya@ikcu.edu.tr)

GİRİŞ

Malign melanom; cilt, göz ve saçın rengini belirleyen melanin pigmentini üreten melanositlerin malign tümörü olup görülme sıklığı hızla artış gösteren ve mortalitesi yüksek olan bir kanser türüdür. Tüm dünyada görülme sıklığı hızla artış gösteren ve mortalitesi yüksek olan bir kanser türüdür. Günümüzde melanomun standart tedavisinde dakarbazin, temozolomit, fotemustin, sisplatin, karboplatin, vinka alkaloidleri ve taksanlar gibi kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Ancak bu ilaçların hem sınırlı etkileri hem de önemli yan etkilerinden dolayı, son zamanlarda bunların yanı sıra interlökin-2 ve interferonlar da tedavi rejimlerinde yer almaktadır [1].

Tirozinaz bakteriler, funguslar, yüksek yapılı bitkiler (özellikle mantar, muz, elma, armut, patates, avokado ve şeftali gibi) ve hayvanlar dahil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunan ve melanin adlı pigmentin biyosentezinden sorumlu enzimdir [2]. Melanositlerde melanin oluşumundan sorumlu enzim olup ciltteki pigmentasyon ile meyve ve sebzelelerdeki kararmalardan sorumludur. İnsanlarda normal düzeyde melanin oluşumu, malign melanom başta olmak üzere hiperpigmentasyon, postinflamatuar pigmentasyon, melazma ve cilt yaşlanması süreci gibi sorunların nedenidir. Tirozinazın inhibisyonu melanin üretimini büyük ölçüde etkilemektedir. İnsanlarda pigmentasyon bozuklukları ve diğer melanin ile ilgili sağlık sorunlarının önlenmesi ve tedavisinde, gerek sentetik gerekse doğa kaynaklı olmak üzere güvenli ve etkili tirozinaz inhibitörleri kullanılması bilinen bir yöntemdir [3].

Kojik asit (5-hidroksi-2-hidroksimetil-4H-piran-4-on), antitirozinaz özelliği çok iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. Endüstrideki önemine bağlı olarak kojik asit (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4H-piran-4-on) üretimi giderek artmakta, biyosenteziyle ilgili kayda değer sayıda çalışma yürütülmekte ve birçok yayında, kojik asitin kimyasal ve biyolojik özellikleri incelenmektedir. Kozmetik, tıp, gıda, tarım ve kimya endüstrilerinde çok geniş bir alanda kojik asitin uygulamaları bulunmaktadır. Kozmetik sektöründe hem antioksidan işleviyle hem de UV ışımadan koruyan ve pigmentasyona neden olan tirozinaz enziminin aktivitelerini önleyen bir inhibitör madde olarak kullanılmaktadır [4]. Ancak dayanıklılık ve ciltte tahriş sorunlarından dolayı, uygun hidrofilik ve lipofilik dengeye sahip türevlerin ve daha iyi endüstriyel uygulamaların elde edilmesi bir gereksinim olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu amaçla, tez kapsamında kojik asit üzerinde modifikasyonlar yapılarak 2-süstitüe-3-hidroksi-6-hidroksimetil/klorometil/metil/morfolinometil/piperidinometil/pirolidinometil-4H-piran-4-on yapısında kırk sekiz adet yeni bileşik sentezlenmiş, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, kütle spektroskopisi ve elemental analiz yöntemleriyle yapıları aydınlatılmıştır. Ayrıca, bu bileşiklere yapıca benzer ve daha önce yayın haline getirilen bileşikler de ilave edilerek toplamda altmış adet bileşiğin mantar tirozinaz inhibisyonları ile A375 insan melanoma hücreleri, HGF-1 gingival hücre hattı ve MRC-5 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Etkin olan bazı bileşiklerin A375 hücrelerinde melanogenez üzerine etkilerini belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanılarak hücrede melanin içeriği incelenmiştir. Böylelikle antitirozinaz etki, antikarsinojen etki ve melanogenez inhibisyonu arasındaki ilişki aydınlatılmaya çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

KİMYASAL ÇALIŞMALAR

5-Hidroksi-2-klorometil-4H-piran-4-on (Klorokojik asit) Sentezi

Kojik asit tanyonil klorür içerisinde çözülür. Sarı renkte katı ürün oluşana kadar oda ısısında 1 saat karıştırılır. Çöken kısım süzülerek alınır ve petrol eteri (60-70°C) ile yıkanır. Klorokojik asit su ile kristallendirilerek renksiz iğne şeklinde kristaller elde edilir (Erime Derecesi: 166-7°C) [5].

5-Hidroksi-2-metil-4H-piran-4-on (Allomaltol) Sentezi

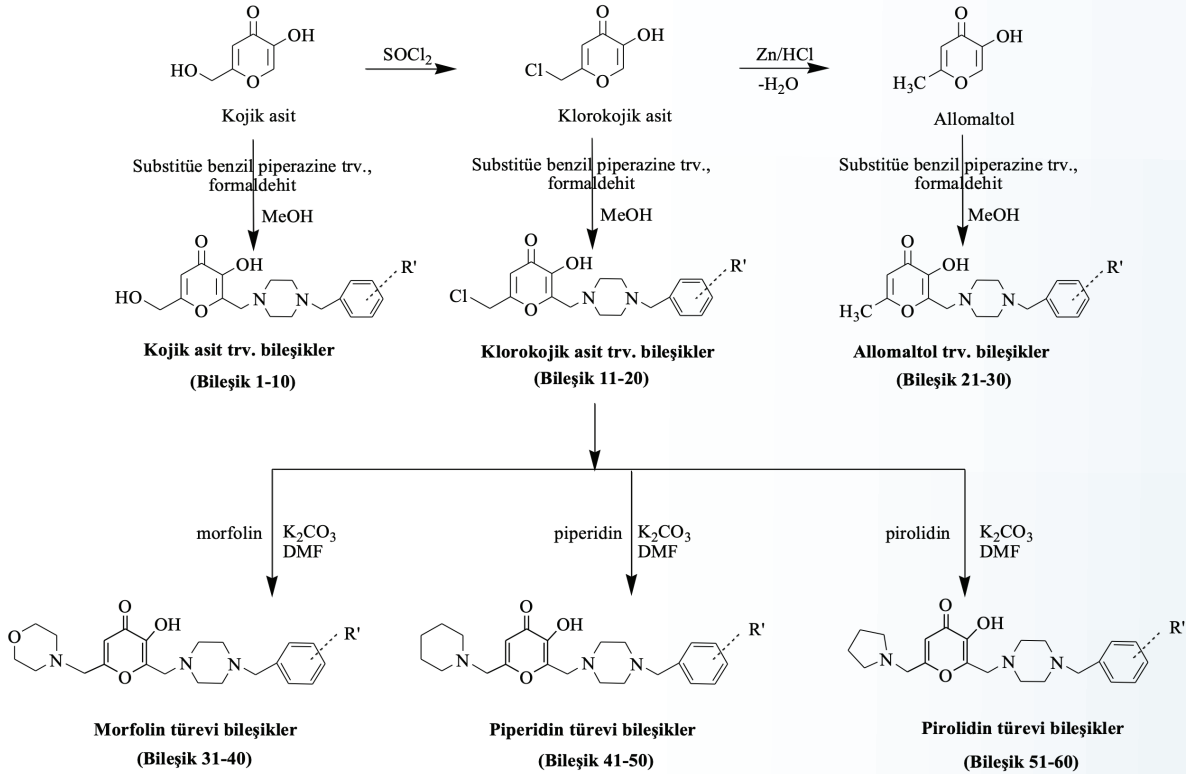
Klorokojik asit, suda süspansiyon edilir ve 50°C'ye kadar karıştırılarak ısıtılır. Çinko tozu yavaş yavaş ilave edilir. Isı 70°C 'ye çıkarılarak karıştırmaya devam edilir. Damla damla derişik HCl ilave edilerek 70-80°C 'de ısıtmaya üç saat devam edilir. Çinko tozunun aşırısı süzülerek uzaklaştırılır. Çözelti 200 mL diklorometan ile üç kez ekstre edilir, organik çözücüler birleştirilerek susuz sodyum sülfat ile kurutulur ve vakumda uçurulur. Katı kısım izopropanol ile kristallendirilerek açık sarı tabaka şeklinde kristaller elde edilir (Erime Derecesi: 152-3°C) [6].

3-Hidroksi-6-klorometil/metil-2-süstitüe-4H-piran-4-on türevlerinin sentezi (Genel sentez yöntemi I)

Süstitüe sekonder amin türevi üzerine formaldehit ilave edilip karıştırılır. Çözeltiyeye kojik asit/klorokojik asit/allomaltol eklenir ve metanol eklenerek oda ısısında karıştırılır. Çöken katı vakumda süzülüp soğuk metanolle yıkanıp uygun çözücülerle kristallendirilir [7].

2-((4-(süstitüebenzil)piperazin-1-il)metil)-3-hidroksi-6-(morfolino/ piperidino/pirolidinometil)-4H-piran-4-on türevlerinin sentezi (Genel sentez yöntemi II)

Morfolin/piperidin/pirolidin 0.5 mL DMF içerisinde çözülür. Buz banyosundaki bu karışıma 2 mL DMF çözünmüş Mannich bazı damla damla eklenerek karıştırılır. Potasyum karbonat (K₂CO₃) bu karışıma eklenerek karıştırmaya devam edilir. 36 saat sonunda karışım buzlu suya dökülür, organik çözücü ile ekstre edilir. Organik faz uçurulduğunda kalan katı metanolle yıkanıp uygun çözücülerle kristallendirilir [8].



Şekil 1 Tez kapsamında sentezlenen bileşikler.

BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

ENZİM İNHİBİSYON ÇALIŞMALARI

Sentezlenen bileşiklerin antitirozinaz aktivitesini belirlemek için, mantar tirozinaz inhibisyon yüzdesini belirlemek amacıyla substrat olarak L-DOPA'nın kullanıldığı spektrofotometrik bir yöntem modifiye edilerek uyarlanmıştır [9].

Hücre kültürü çalışmaları ve SRB deneyi

Her biri insan kaynaklı olan A375 Malign melanoma hücre hattı, HGF-1 gingival fibroblast hücre hattı ve MRC-5 akciğer kaynaklı fibroblast hücre hattı ATCC'den satın alınmıştır. Hücreler ısı ile inaktive edilmiş %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM besin ortamında, T75 hücre flasksında 37°C sıcaklıkta ve %5 CO2 içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin morfolojik özellikleri ve çoğalma süreci, ışık mikroskobu ile (NIKON Eclipse TS100, ABD) gözlemlenmiştir.

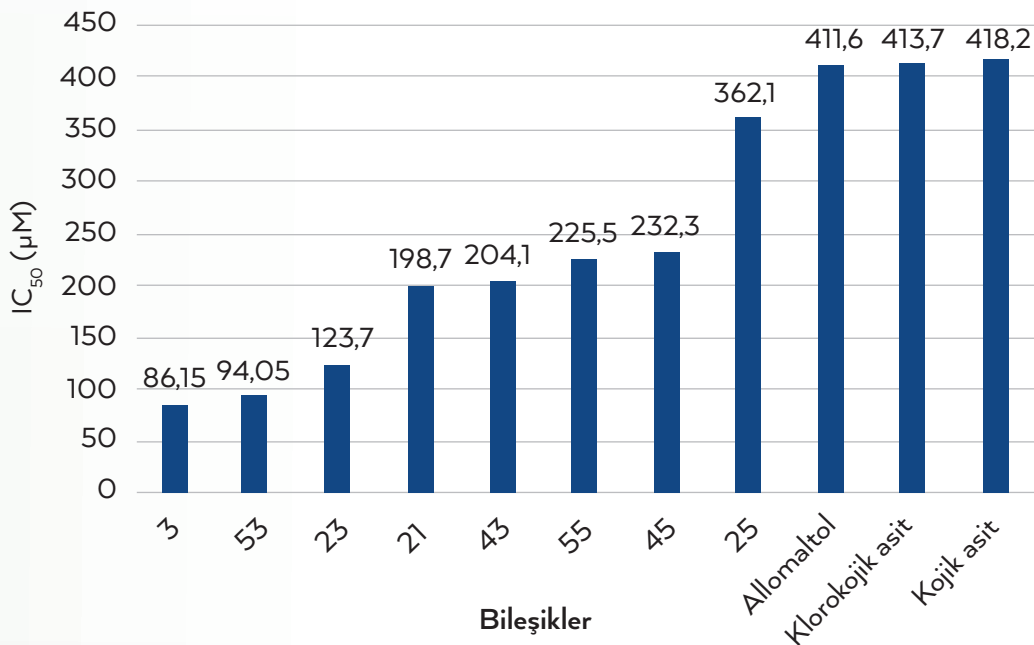
SRB deneyi için, öncelikle HGF-1 hücreleri steril 96 kuyucuklu plakaya, her bir kuyucukta 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kuyucuklarda doluluğa ulaştığı zaman, önceden belirlenen dozlarda, Mannich bazları ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Hücrelerin 48 saat süresince inkübatörde inkübe edilmesinin ardından SRB deneyi gerçekleştirilmiştir. Hiç madde eklenmemiş, sadece hücre bulunan kuyucuklarda hücre canlılığı %100 kabul edilerek, diğer kuyucuklardaki hücre canlılığı da absorbansa göre orantılı olarak belirlenmiştir. Her bir bileşiğin HGF-1 hücreleri için IC50 değerleri Graphpad Prism 5.0 yazılım programı yardımıyla non-lineer regresyon ile hesaplanmıştır. Bu deney en az n=3 olacak şekilde tekrarlanmıştır [10].

Melanogenez Ölçüm Yöntemi

Melanogenez ölçümü Huang ve ark. nın yöntemi esas alınarak ve küçük değişiklikler uygulanarak gerçekleştirilmiştir [11].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kojik asitin IC50 değeri 418,2 µM iken en yüksek inhibisyona sahip Bileşik 3 (3-hidroksi-2-(3,4-diklorobenzilpiperazinmetil)-6-hidroksimetil-piran-4H-on)'in IC50 değeri 86,15 µM dir. ilk beş sırada 3,4-diklorobenzilpiperazin yapısı taşıyan Bileşik 3, 23, 43 ve 53 en yüksek inhibisyon değerlerine sahip olması, Mannich bazı yapısında bulunun 3,4-diklorobenzilpiperazin grubunun aktivite üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu dört bileşik hem başlangıç bileşiği hem de referans bileşik olan kojik asitten (IC50: 418,2 µM) yüksek inhibisyon değerlerine sahiptirler.

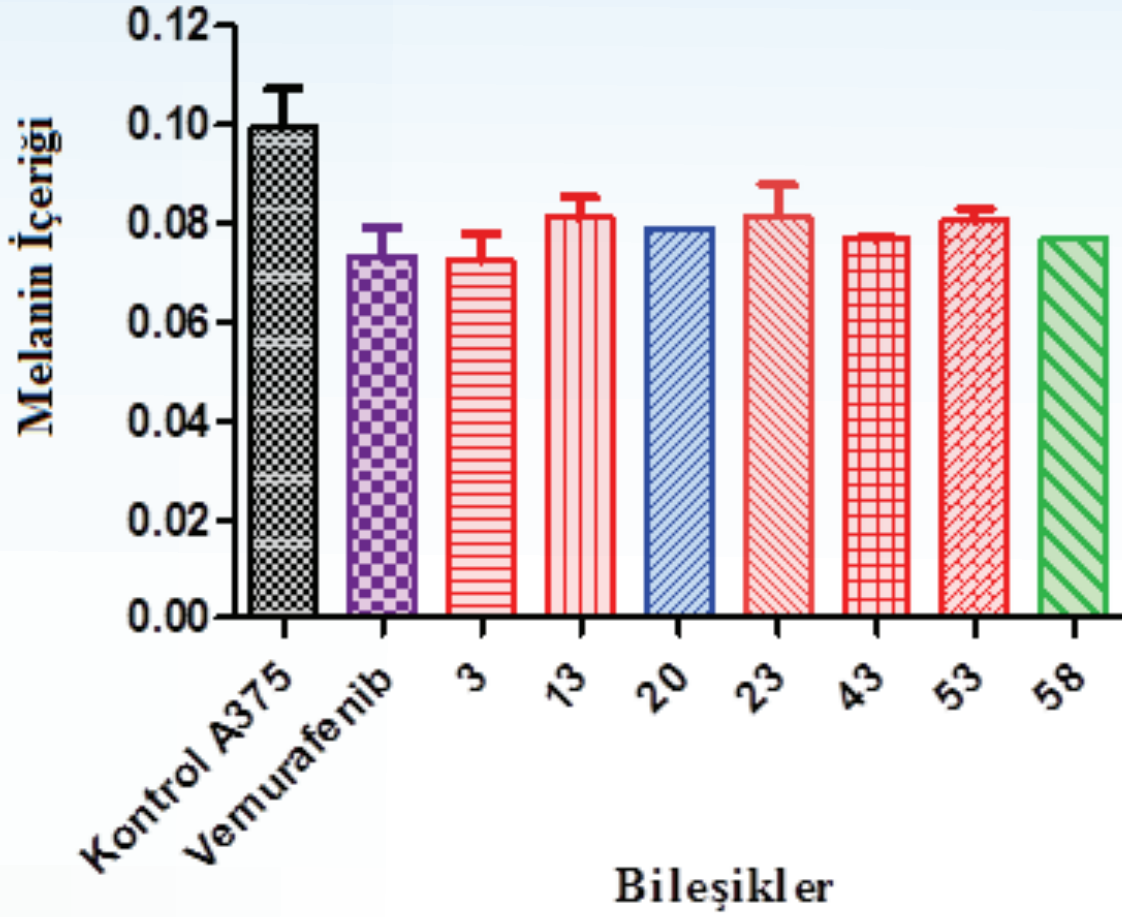


Şekil 2 Sentezlenen bileşiklerin mantar tirozinaz enzim inhibisyonu IC50 değerlerinin grafikte gösterimi (µM).

Tez kapsamında gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında, her biri insan kaynaklı olan A375 malign melanoma hücre hattı, HGF-1 gingival fibroblast hücre hattı ve MRC-5 akciğer kaynaklı fibroblast hücre hattı ATCC'den kullanılmıştır. Kırk sekizi orijinal bileşik olmak üzere toplam altmış adet Mannich bazının A375 hücrelerindeki sitotoksitesisi çalışılmıştır. Melanom hücresi üzerinde en yüksek sitotoksik etki gösteren yirmi beş bileşik, sağlıklı insan hücre hatları olan HGF-1 ve MRC-5 üzerinde, test edilen bileşiklerin sağlıklı hücreye olan etkilerini değerlendirmek amacıyla denenmiştir. Piyasada malign melanom tedavisinde kullanılan vemurafenib, dakarbazin, temozolomid, lenalidomid ve fotemustin kontrol ilaç olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada tasarlanan bileşiklerin, vemurafenibden daha az etkili ama daha yaygın olarak kullanılan dakarbazinden çok daha sitotoksik olması önemlidir. Yirmi dört adet bileşik, V600E mutasyonunu taşıyan geç evre metastatik melanom hücrelerinde, melanom tedavisinde kullanılan dört farklı ilaçtan daha aktif sonuç vermiştir. Ancak, sitotoksosite testlerinden de daha önemlisi, tasarlanan bu bileşiklerin sağlıklı hücrelerin morfolojisi üzerindeki etkileridir; yirmi dört bileşiğin on dört tanesi HGF-1 hücrelerinde vemurafenibden daha yüksek IC50 değerine sahiptir.

Sıra No	Bileşik No	A375	HGF-1	MRC-5
1	Vemurafenib	4,58	231,9	inhibisyon yok
2	13	11,26	inhibisyon yok	inhibisyon yok
3	43	19,4	487,9	127,2
4	14	21,41	325,3	254,5
5	18	25,12	239,8	259
6	53	27,75	199,5	138,4
7	11	32,77	234,7	185,5
8	20	33,84	1012	99,9
9	17	35,07	507,1	263,5
10	3	43,81	200,1	209,5
11	58	47,27	203,6	189,8
12	23	47,28	410,4	120,4
13	48	49,98	212,2	150,5
14	32	50,26	inhibisyon yok	168,4
15	15	52,46	565,5	229,5
16	52	56,05	734,7	174,1
17	50	57,72	189	152,8
18	16	59,65	157,9	inhibisyon yok
19	38	62,04	328,5	224,5
20	60	63,27	471,1	148,5
21	19	63,48	344,2	96,87
22	8	66,35	190,9	inhibisyon yok
23	42	68,15	180,1	inhibisyon yok
24	40	68,58	182,5	120,4
25	Dakarbazin	69,57	230,6	230,3
26	12	71,27	2301	inhibisyon yok
27	Klorokojik Asit	71,74	1958	inhibisyon yok
28	1	73,74	927,9	inhibisyon yok
29	Allomaltol	93,14	inhibisyon yok	inhibisyon yok
30	Temozolomid	95,58	inhibisyon yok	inhibisyon yok
31	Kojik Asit	98,77	193,9	2123
32	Lenalidomid	143,1	4353	inhibisyon yok
33	Fotemustin	inhibisyon yok	inhibisyon yok	inhibisyon yok

Tablo 2 Bileşiklerin A375, HGF-1 ve MRC-5 hücre hatlarına karşı sitotoksosite IC50 değerleri (µM).



Şekil 3 Bazı bileşiklerin A375 hücrelerinde melanin içeriğinin kontrol grubu ve vemurafenible kıyaslanması.

Melanogenez sonuçları ile tüm deneyler değerlendirildiğinde bileşiklerin hem mantar tirozinazını hem de insan tirozinazını, dopamin yolağı ile inhibe ettiği gösterilmiştir. Özellikle Bileşik 3, vemurafenib kadar melanogenezini inhibe etmiştir. Bileşik 13, 20, 23, 43, 53 ve 58 kontrol grubundan daha çok fakat vemurafenid kadar etkin inhibisyon göstermemiştir.

SONUÇLAR

Özet olarak, Bileşik 3, 23, 13, 43, 53, 20 ve 58 mantar tirozinazını standart bileşik kojik asite kıyasla çok daha etkili inhibe etmektedir. Bu bileşikler, sağlıklı insan hücreleri olan HGF-1 ve MRC-5'ye karşı toksik değil iken A375 melanoma hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermektedir. İlave olarak, söz konusu yedi bileşik A375 hücrelerinde melanogenez yolağını baskılamaktadır.

İleriki çalışmalarda da bu bileşiklerin moleküler modelleme çalışmalarıyla hedef enzim ile nasıl etkileştiği, sitotoksik etki mekanizmaları ve farklı kanser hücreleri üzerine etkinlikleri araştırılmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Lacy KE, Karagiannis SN, Nestle FO. Advances in the treatment of melanoma. Clin Med (Lond). 2012;12(2):168-171.
- [2] Burdock GA, Soni MG, Carabin IG. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2001;33(1):80-101.
- [3] Kim Y-J, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005;62(15):1707-23.
- [4] Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmonia F. Kojic Acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 1994;46(12):982-5.
- [5] Karakaya G, Aytemir MD, Özçelik B, Çalış Ü. Design, synthesis and in vivo/in vitro screening of novel chlorokojic acid derivatives. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2013;28(3):627-38.
- [6] Aytemir MD, Çalış Ü. Anticonvulsant and neurotoxicity evaluation of some novel kojic acids and allomaltol derivatives. Archiv der Pharmazie. 2010;343(3):173-81.
- [7] Aytemir MD, Özçelik B. A study of cytotoxicity of novel chlorokojic acid derivatives with their antimicrobial and antiviral activities. European Journal of Medicinal Chemistry. 2010;45(9):4089-95.
- [8] Che X, Sheng C, Wang W, Cao Y, Xu Y, Ji H, et al. New azoles with potent antifungal activity: design, synthesis and molecular docking. European Journal of Medicinal Chemistry. 2009;44(10):4218-26.
- [9] Chen Q-X, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002;50(14):4108-12.
- [10] Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols. 2006;1(3):1112-6.
- [11] Huang H, Wang X, Ding X, Xu Q, Hwang SK, Wang F, et al. Effect and mechanism of tacrolimus on melanogenesis on A375 human melanoma cells. Chinese Medical Journal. 2013;127(16):2966-71.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje No: THD-2015-7392) ve TÜBİTAK (Proje No: 315S067) tarafından desteklenmiştir.

TACC3 İNHİBİTÖRÜ YENİ 2,4-DİAMİNOPİRİMİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ANTI-KANSER ETKİ POTANSİYELLERİ VE İLAÇ BENZERİ ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

S2

Deniz Lengerli¹, Özge Akbulut², Burcu Çalışkan¹, Özgür Şahin², Erden Banoğlu¹

¹Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560 Ankara.

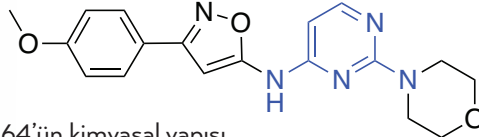
²Güney Karolina Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İlaç Keşfi ve Biyomedikal Bilimler Departmanı, 29208, Columbia.

(e-posta: deniz.lengerli1@gazi.edu.tr)

GİRİŞ

Kanser, yaşam kalitesini ve süresini etkileyen önemli bir küresel sağlık sorunudur. Meme kanseri ise, özellikle kadınlar arasında en sık görülme ve ölüm oranına sahip kanser türü olarak dikkat çekmektedir [1]. Meme kanserinin güncel tedavisinde çok sayıda biyolojik yolak ve biyomolekül terapötik hedef olarak kullanılmasına rağmen, mevcut ilaçlara karşı zamanla gelişen direnç, potansiyel yeni hedeflerin ve bu hedefler üzerinde etkili ilaç moleküllerinin keşfine yönelik ihtiyacı arttırmaktadır. Bu yeni terapötik hedeflerden biri, mitoz bölünme sürecinde mikrotübüllerin düzgün bir şekilde organize olmasını sağlayan hücre içi TACC3 (Transforming Acidic Coiled-Coil 3, dönüştürücü asidik sarmalanmış sarmal 3) proteinidir. Birçok kanser türünde anormal ekspresyonunun gözlenmesi ve bu durumun sağ kalım süresinin kısalması ile ilişkilendirilmesi, TACC3 proteinini meme kanseri tedavisinde dikkate değer bir hedef haline getirmektedir [2].

Azot içeren heterosiklik halkalar; yapısal çeşitliliği ve geniş bir farmakolojik aktivite yelpazesine sahip olması nedeniyle ilaç geliştirme çabalarında araştırmacılar tarafından tercih edilen motifler arasındadır [3]. Bu yapı sınıfının önemli bir üyesi olan pirimidinler, antikanser etkili ilaç keşfi çalışmalarında sıklıkla tekrarlanan bir farmakofor gruptur [4]. 2,4-diaminopirimidinler ise, kanser üzerindeki önemli kemoterapötik etkileri ile son zamanlarda geliştirilen birçok molekülün yapısında göze çarpmaktadır. Bu bileşikler arasında meme kanserine karşı etki potansiyeline sahip bir TACC3 inhibitörü, KHS101 bileşiği de yer almaktadır [5].



Şekil 1 Öncü bileşik BO-264'ün kimyasal yapısı.

Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkılarak, araştırma grubumuz tarafından antikanser etkili yeni bir TACC3 inhibitörü bileşik keşfi amacı ile yürütülen çalışmalar sonucunda; yüksek oranda TACC3 eksprese eden insan JIMT-1 (meme) kanser hücre hattı üzerinde güçlü sitotoksikite değerine (IC₅₀ = 0.188-0.258 µM) sahip 2,4-diaminopirimidin çekirdeği taşıyan **BO-264** bileşiğine (Şekil 1) ulaşılmış ve TACC3 proteini üzerindeki seçici etkinliği ileri biyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır [6]. İlaç geliştirme çabalarında umut vadeden biyolojik etkinlik profiline karşı, **BO-264** üzerinde gerçekleştirilen in vitro farmakokinetik ve biyoyararlanım çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilememiştir. İnsan karaciğer mikrozomal stabilite testlerinde kısa yarılanma ömrü (t_{1/2} = 5.86 dk) ve yüksek hepatik klirens değeri (CL_{int} = 236.44 µL/dakika/mg protein) ile metabolik açıdan dayanıksız bir bileşik olan **BO-264**'ün, farelerde gerçekleştirilen in vivo farmakokinetik çalışmaları sonucunda da %11.8'lik düşük bir oral biyoyararlanım sergilediği saptanmıştır.

Elde edilen verilerden yola çıkılarak doktora tezim kapsamında gerçekleştirdiğim bu çalışmada; yeni **BO-264** analogları sentezlenerek, meme kanserine karşı etkili ve optimum farmakokinetik özelliklere sahip, klinik çalışmalara aday bir TACC3 inhibitörüne ulaşılmış amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

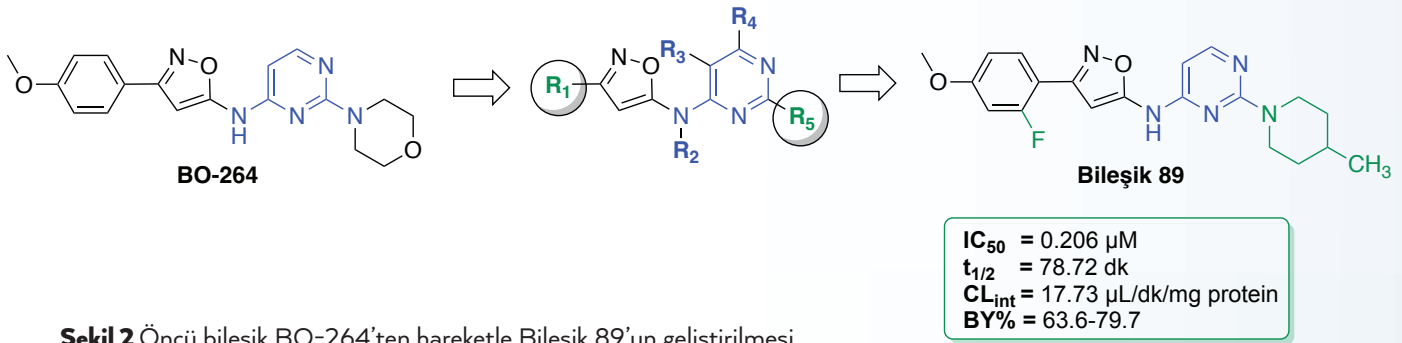
Çalışma kapsamında, tasarlanan **BO-264** analogları, literatürde yer alan uygun sentetik yaklaşımların uyarlaması ile geliştirilen yöntemlerle sentezlenmiştir [7]. Sentez çalışmalarında elde edilen ara ve final bileşiklerin kimyasal yapı karakterizasyonu ise, ¹H, ¹³C-NMR ve HRMS gibi spektral teknikler aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Tüm final bileşiklerin JIMT-1 (meme) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite aktiviteleri, hücre kültürü ve hücre canlılığı deneyleri ile araştırılmıştır. Belirlenen aktif analogların TACC3 üzerindeki etkisi ise hedefe duyarlı bileşik afinite testleri (DARTS) [8] ve Western blot analizleri gibi ileri biyolojik aktivite yöntemleri ile belirlenmiştir.

Umut vaat eden bileşiklerin ilaçlaşabilme potansiyelleri, Syngene International Ltd. ve Pharmaron Technology Development Ltd. gibi sözleşmeli aracı kurumlarda (CRO) uygun protokollere göre yürütülen in vitro farmakokinetik (mikrozomal stabilite, çözünürlük, LogD, hücre permeabilitesi, plazma proteinlerine bağlanma) testler ve farelerde gerçekleştirilen biyoyararlanım çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, **BO-264**'ün ilaç benzeri özelliklerini geliştirmek ve yapı-etki ilişkilerini (YEİ) değerlendirmek amacıyla için yeni **BO-264** analogları tasarlanarak gerçekleştirilen sentetik çalışmalar sonucunda yetmiş adet yeni bileşik elde edilmiştir. Sentezlenen analogların YEİ incelendiğinde; bileşiklerin yaklaşık %70'inin JIMT-1 hücre hattında önemli derecede (37 bileşik için IC₅₀ = 0.013 µM-0.8 µM; 9 bileşik için IC₅₀ = 1-4 µM; 24 bileşik için IC₅₀ = > 7 µM) antiproliferatif aktivite sergilediği gözlenmiş ve 2,4-diaminopirimidin çekirdek yapısının gözlemlenen antiproliferatif aktivitenin devamlılığının sağlanmasında önemli bir çekirdek motif olduğu saptanmıştır. Ayrıca, 2,4-diaminopirimidin çekirdeği etrafındaki 4-metoksifenil ve morfolin halkalarına hacimli ve polar grupların getirildiği türevlerde antikanser aktivitede azalma veya kayıp olduğunu gösteren veriler doğrultusunda bu bölgelerin sınırlı bir kimyasal alanda modifikasyona elverişli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2 Öncü bileşik BO-264'ten hareketle Bileşik 89'un geliştirilmesi.

Yeterli biyolojik aktiviteye sahip seçilmiş türevlerin, in vitro mikrozomal stabilitesi değerlendirilmiştir. Bu türevler arasında, potent antiproliferatif etkili (IC₅₀ = 0.206 µM) **Bileşik 89**, metabolik olarak dayanıksız öncü **BO-264** ile karşılaştırıldığında insan karaciğer mikrozomlarında; uzun yarılanma ömrü (t_{1/2} = 78.72 dk) ve düşük karaciğer klirensi (CL_{int} = 17.73 µL/dk/mg protein) ile in vitro şartlarda yüksek metabolik stabilite profili sergilemiştir. Potent antiproliferatif aktivitesi ve uygun in vitro ilaç benzeri özelliklerinin bir sonucu olarak, farelerde gerçekleştirilecek in vivo farmakokinetik çalışmalara Bileşik 89 ile devam edilmiş ve **Bileşik 89**'un yüksek oral biyoyararlanım (BY = % 63.6-79.7) gösterdiği gözlemlenmiştir.

SONUÇLAR

Tez kapsamında elde edilen veriler ışığında, 2,4-diaminopirimidin motifini taşıyan bileşiklerin potent antiproliferatif etkisi nedeniyle TACC3 aşırı eksprese eden kanser türlerine karşı ileri klinik gelişim potansiyeline sahip olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu farmakofor yapıya sahip öncü bileşik BO-264 üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar ile yetmiş adet final bileşik sentezi gerçekleştirilmiş ve meme kanseri hücre hattına karşı sitotoksiteleri incelenerek YEİ belirlenmiştir. Sonuç olarak, sentezlenen türevler arasında, Bileşik 89'un biyolojik aktivite profili ve antikanser ilaç geliştirmedeki farmakokinetik özellikleri bakımından daha ileri klinik geliştirme için uygun bir aday olabileceğine işaret edilmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249.
- [2] Ha G-H, Kim J-L, Breuer E-KY. Transforming acidic coiled-coil proteins (TACCs) in human cancer. *Cancer Lett.* 2013;336(1):24-33.
- [3] Hosseinzadeh Z, Ramazani A, Razzaghi-Asl N. Anti-cancer Nitrogen-Containing Heterocyclic Compounds. *Curr. Org. Chem.* 2018;22(23):2256-2279.
- [4] Prachayasittikul S, Pingaew R, Worachartcheewan A, et al. Roles of Pyridine and Pyrimidine Derivatives as Privileged Scaffolds in Anticancer Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017;17(10):869-901.
- [5] Campo L, Breuer E-K. Inhibition of TACC3 by a small molecule inhibitor in breast cancer *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018;498(4):1085-1092.
- [6] Akbulut O, Lengerli D, Saatci O, et al. A Highly Potent TACC3 Inhibitor as a Novel Anticancer Drug Candidate. *Mol. Cancer Ther.* 2020;19(6):1243-1254.
- [7] Banoglu EC, Burcu; Sahin, Ozgur; Lengerli, Deniz; Akbulut, Ozge; Lim, Chaemin; Cruz, Emmanuel; Vempati, Sridhar; Ibis, Kubra. Isoxazole Derivatives Targeting TACC3 as Anticancer Agents. *WO2021097352A1*, 2021.
- [8] Pai MY, Lomenick B, Hwang H, Schiestl R, McBride W, Loo JA, et al. Drug affinity responsive target stability (DARTS) for small-molecule target identification. *Methods Mol Biol* 2015;1263:287-98.

TEŞEKKÜR

Tüm doktora sürecim ve tez çalışmalarım boyunca engin tecrübe ve bilgi birikimini büyük bir özveri ile paylaşarak bana yol gösteren, her türlü yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Erden BANOĞLU'na; çalışma disiplini, azmi ve güçlü duruşu ile örnek aldığım ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesinden sıklıkla faydalanmaya imkan bulduğum sevgili hocam Prof. Dr. Burcu ÇALIŞKAN'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Doç. Dr. Özgür ŞAHİN ve kendisinin danışmanlığında biyolojik aktivite çalışmalarını büyük bir titizlikle gerçekleştiren Dr. Özge AKBULUT'a; analiz çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Hakan GÖKER'e içtenlikle teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim süresince aldığım bursla bana destek olan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-215S015); ayrıca 100/2000 Doktora Programı dahilinde bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ediyorum.

BİR GRUP HETEROSİKLIK BİLEŞİĞİN AMİT, HİDRAZİT VE HİDROKSAMİK ASİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

S3

Merve SAYLAM¹, Fadime AYDIN KÖSE², Aysun PABUÇÇUOĞLU³, Muhittin AYGÜN⁴, Varol PABUÇÇUOĞLU⁵

¹ İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35620 İzmir.

² İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 35620 İzmir.

³ Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 35040 İzmir.

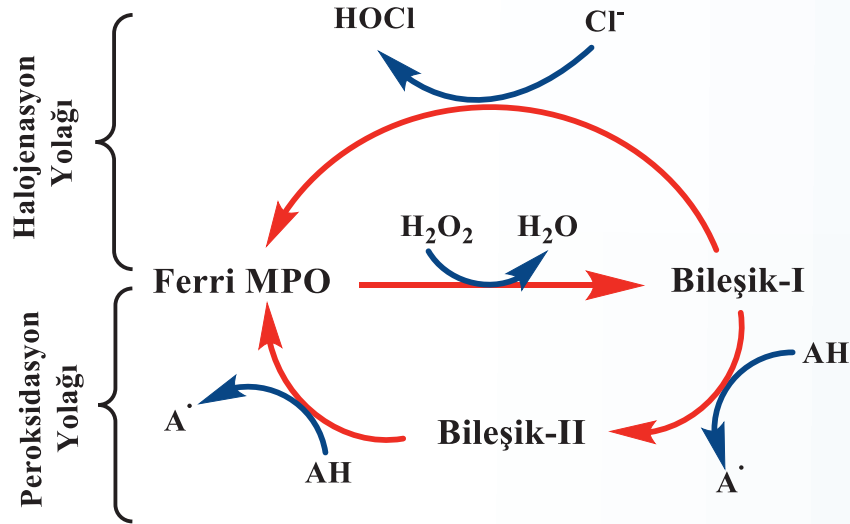
⁴ Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, 35390 İzmir.

⁵ Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35040 İzmir.

(e-posta : merve.saylam@ikc.edu.tr)

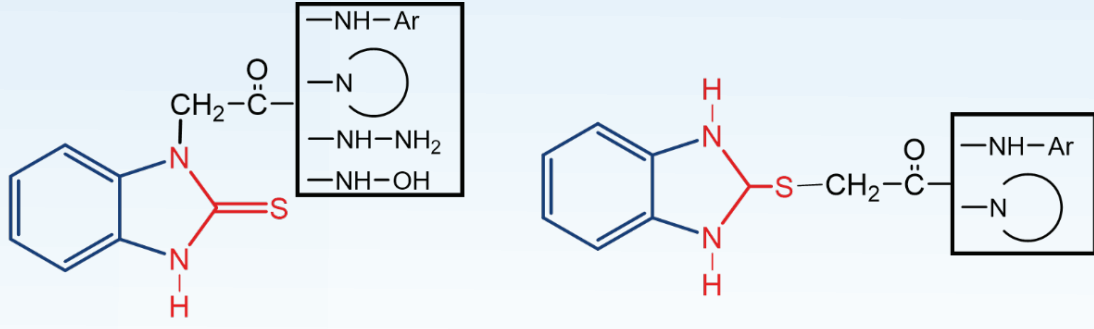
GİRİŞ

Miyeloperoksidaz (MPO), nötrofillerde bulunan ve antimikrobiyal etkinliğin gerçekleştirilmesine aracılık eden bir enzimdir. Bu enzim doğal enzim döngüsünü klorinasyon ve peroksidasyon adı verilen iki farklı yola aracılığıyla tamamlamaktadır. MPO, fagozom içerisinde hidrojen peroksit (H₂O₂) ile klorür anyonları (Cl⁻) arasındaki reaksiyonu katalizler ve bu reaksiyonun sonucunda oluşan hipokloröz asit (HOCl) mikroorganizmaların hayati biyomoleküllerini oksitleyerek antimikrobiyal etkinliğin ortaya çıkmasını sağlar (Şema 1). Bu enzim çeşitli nedenlerle nötrofil içerisinden salındığında enzimatik döngüsünü hücre dışı ortamda gerçekleştirir ve oluşan hipokloröz asitler konağa ait biyolojik makromolekülleri oksitleyerek inflamasyon oluşma sürecini, dolayısıyla kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, renal hastalıklar gibi inflamasyonla ilişkilendirilen hastalıkların ortaya çıkmasını tetikleyen kimyasal değişikliklere sebep olur [1,2]. MPO'nun önemli patofizyolojik olaylarda görev aldığı tespit edilerek birçok inflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilmesi ve son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda yapısının daha detaylı aydınlatılması, bu enzimi ilaç geliştirme çalışmalarında ilgi çeken bir terapötik hedef haline getirmiştir.



Şekil 1 MPO'nun katalitik döngüleri.

Literatür taramaları sonucunda elde edilen bilgilerle MPO inhibitörü olarak rapor edilen bileşiklerin çoğunlukla indol, indazol ve benzoksazol gibi kaynaşmış halkalar ve tiyöüre grubuna sahip olduğu belirlenmiştir [3-7]. Ayrıca hidrazit, hidrosamik asit ve amit fonksiyonel grubu taşıyan bileşiklerin de MPO inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [7-11]. Rapor edilen bu bilgiler değerlendirildiğinde, çalışmamız kapsamında, kaynaşmış azotlu halka ve halka içi tiyöüre işlevsel grubu taşıyan 1,3-dihidro-2H-benzo[d]imidazol-2-tiyon molekülünün azot veya kükürt atomu üzerinden amit, hidrazit ve hidrosamik asit gruplarıyla sübtitüe edildiği bileşikler tasarlanmıştır (Şema 2).



Şekil 1 Tasarlanan bileşiklerin genel formülleri.

Çalışmamız kapsamında bileşiklerin hem klorinasyon hem de peroksidasyon döngüsü üzerindeki MPO inhibitör aktivitesi tespit edilmiş, bunun yanı sıra moleküler modelleme çalışmalarıyla yapısal farklılıklarının enzim aktif yoresindeki etkileşimler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

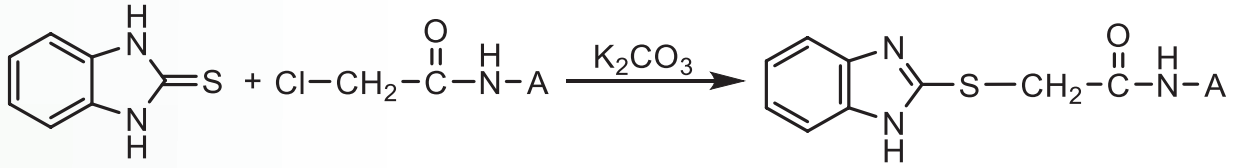
GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Tasarlanan iki farklı grup bileşiğin sentezi farklı yöntemlerle gerçekleştirilmiştir:

S-Süstitüe bileşiklerin sentezi

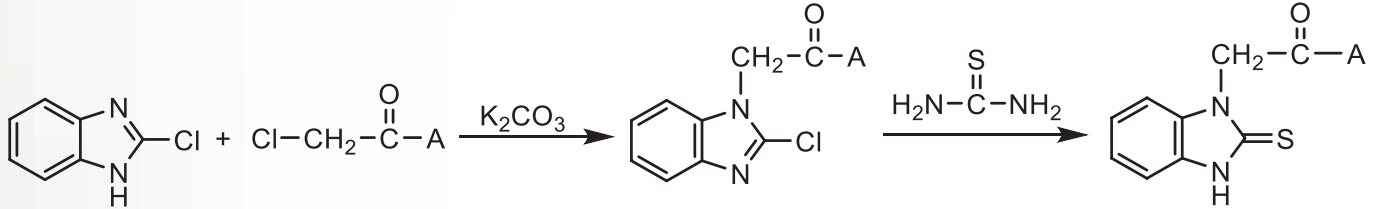
2- Tiyoksobenzimidazol halkasının klorasetamit türevi ara ürünleriyle K_2CO_3 varlığında reaksiyonu sonucunda bu grup bileşiklerin sentezi gerçekleştirilmiştir (Şema 3) [7].



Şema 3 S-Süstitüe bileşiklerin sentezi.

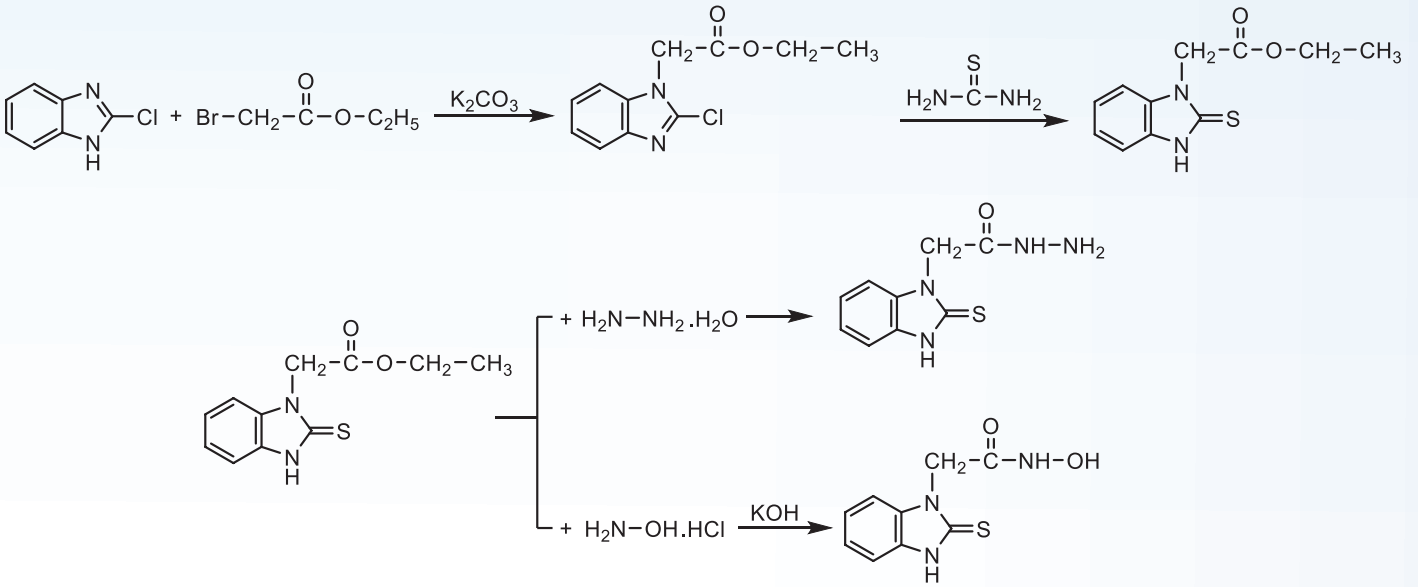
N-Süstitüe bileşiklerin sentezi

Yan zincirinde farklı işlevsel gruplar taşıyan bu bileşiklerin sentezi amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır. Amit türevi bileşiklerin sentezi için kloroasetamit ara ürünleri 2-klorobenzimidazol ile reaksiyona sokulmuş daha sonra tiyüre aracılığıyla yapıdaki klor, kükürt ile değiştirilmiştir (Şema 4) [12,13].



Şema 4 N-Süstitüe amit türevi bileşiklerin sentezi.

Hidrazit ve hidroksamik asit grupları taşıyan bileşiklerin sentezi için ise öncelikle 2-klorobenzimidazolün etil bromoasetat ile reaksiyonu sonucunda ester türevi sentezlenmiş, elde edilen yapıdaki klor, kükürt ile değiştirilmiştir [7,13]. Bu bileşiğin hidrazin hidrat ve hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyonu sonucunda sırasıyla hidrazit ve hidroksamik asit türevleri elde edilmiştir [14,15] (Şema 5).



Şema 5 N-Süstitüe hidrazit ve hidroksamik asit türevi bileşiklerin sentezi.

Biyolojik aktivite çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin yapıları spektral yöntemlerle teyit edilmiş ve her seriden birer adet bileşiğin X-ray kristalografi analizi gerçekleştirilmiştir. Yapı tayininin ardından biyolojik aktivite çalışmaları yürütülmüştür. Yapıda bulunan kükürt atomunun inhibisyona katkısını belirleyebilmek amacıyla 2-klorobenzimidazol türevi ara ürünler de biyolojik aktivite çalışmalarına dahil edilmiştir. Bileşiklerin klorinasyon döngüsü üzerindeki inhibisyon potansiyeli taurin-kloramin deneyi ile belirlenirken; peroksidasyon döngüsü üzerindeki inhibisyonu tespit etmek için Amplex Red yöntemi kullanılmıştır [4,16]. Gayakol MPO'nun bilinen substratlarından bir tanesidir ve bileşiklerin gayakol ile yarışma kapasitesini belirlemek için gayakol oksidasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bunların yanı sıra bileşiklere ait HOCl süpürücü aktivite de ölçülmüştür [17,18].

Moleküler modelleme çalışmaları

Bileşiklerin yapısal farklılıklarının enzim aktif yoresinde bileşiklerin bağlanma pozisyonları üzerine etkileri GOLD ve MOE yazılımları kullanılarak incelenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma kapsamında potansiyel MPO inhibitörü olabilecek benzimidazol türevi bileşikler tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Biyolojik aktivite sonuçları test edilen çoğu bileşiğin peroksidasyon yolağı üzerinde değil klorinasyon yolağı üzerinde farklı oranlarda inhibitör etkinliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bileşiklerin gayakol ile yarışmalı inhibisyon göstermediği ve HOCl süpürücü aktiviteye sahip olmadığı da ilgili deneyler sonucunda tespit edilmiştir. Test edilen seriler arasında inhibitör etkinlik N-süstitüe, S-süstitüe ve 2-klorobenzimidazol türevleri sıralamasında azalmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar kükürt atomunun yapıdaki varlığının biyolojik aktivite için önemli olduğunu ve kükürtün süstitüe olmamış serbest halde bulunmasının aktiviteye pozitif yönde katkı sağladığını ortaya çıkarmıştır. Elde edilen bütün bulgular değerlendirildiğinde ise en aktif bileşik 2-(2-tiyokso-2,3-dihidro-1H-benzo[d]imidazol-1-il)asetohidrazit olarak belirlenmiştir.

SONUÇLAR

Sentezlenen bileşiklerin biyolojik aktivite sonuçları, benzimidazol-2-tiyon ana yapısının yeni ve potansiyel aktif MPO inhibitör bileşiklerinin tasarımı açısından önemli bir başlangıç noktası olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] J. Soubhye, I. Aldib, C. Delporte, M. Prévost, F. Dufrasne, P. Antwerpen, Myeloperoxidase as a Target for the Treatment of Inflammatory Syndromes: Mechanisms and Structure Activity Relationships of Inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 3975–4008. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160607111806>.
- [2] T. Lazarević-Pasti, A. Leskovac, V. Vasić, Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs., *Curr. Drug Metab.* 16 (2015) 168–190. <https://doi.org/10.2174/138920021603150812120640>.
- [3] Y. Li, T. Ganesh, B.A. Diebold, Y. Zhu, J.W. McCoy, S.M.E. Smith, A. Sun, J.D. Lambeth, Thioxo-dihydroquinazolin-one Compounds as Novel Inhibitors of Myeloperoxidase, *ACS Med. Chem. Lett.* 6 (2015) 1047–1052. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.5b00287>.
- [4] J. Ward, S.N. Spath, B. Pabst, P.A. Carpino, R.B. Ruggeri, G. Xing, A.E. Speers, B.F. Cravatt, K. Ahn, Mechanistic Characterization of a 2-Thioxanthine Myeloperoxidase Inhibitor and Selectivity Assessment Utilizing Click Chemistry–Activity–Based Protein Profiling, *Biochemistry.* 52 (2013) 9187–9201. <https://doi.org/10.1021/bi401354d>.
- [5] J. Soubhye, M. Prévost, P. Van Antwerpen, K. Zouaoui Boudjeltia, A. Rousseau, P.G. Furtmüller, C. Obinger, M. Vanhaeverbeek, J. Ducobu, J. Nève, M. Gelbcke, F. Dufrasne, Structure-Based Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of 3-(Aminoalkyl)-5-fluoroindoles as Myeloperoxidase Inhibitors, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 8747–8759. <https://doi.org/10.1021/jm1009988>.
- [6] A. Roth, S. Ott, K.M. Farber, T.A. Palazzo, W.E. Conrad, M.J. Haddadin, D.J. Tantillo, C.E. Cross, J.P. Eiserich, M.J. Kurth, Inhibition of myeloperoxidase: Evaluation of 2H-indazoles and 1H-indazolones, *Bioorg. Med. Chem.* 22 (2014) 6422–6429. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.044>.
- [7] Z. Soyer, M. Bas, A. Pabuccuoglu, V. Pabuccuoglu, Synthesis of Some 2(3H)-Benzoxazolone Derivatives and their in-vitro Effects on Human Leukocyte Myeloperoxidase Activity, *Arch. Pharm. (Weinheim).* 338 (2005) 405–410. <https://doi.org/10.1002/ardp.200500106>.
- [8] B. Davies, S.W. Edwards, Inhibition of myeloperoxidase by salicylhydroxamic acid, *Biochem. J.* 258 (1989) 801–806.
- [9] A.J. Kettle, C.A. Gedye, M.B. Hampton, C.C. Winterbourn, Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides, *Biochem. J.* 308 (1995) 559–563. <https://doi.org/10.1042/bj3080559>.
- [10] A. Malvezzi, R.F. Queiroz, L. de Rezende, O. Augusto, A.T. -d. Amaral, MPO Inhibitors Selected by Virtual Screening, *Mol. Inform.* 30 (2011) 605–613. <https://doi.org/10.1002/minf.201100016>.
- [11] L. V. Forbes, T. Sjögren, F. Auchère, D.W. Jenkins, B. Thong, D. Laughton, P. Hemsley, G. Pairaudeau, R. Turner, H. Eriksson, J.F. Unitt, A.J. Kettle, Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 36636–36647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507756>.

[12] J.F. Bonfanti, F. Doublet, J. Fortin, J. Lacrampe, J. Guillemont, P. Muller, L. Queguiner, E. Arnoult, T. Gevers, P. Janssens, H. Szel, R. Willebrords, P. Timmerman, K. Wuyts, F. Janssens, C. Sommen, P. Wigerinck, K. Andries, Selection of a respiratory syncytial virus fusion inhibitor clinical candidate, part 1: Improving the pharmacokinetic profile using the structure-property relationship, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 4572–4584. <https://doi.org/10.1021/jm070143x>.

[13] S. Susanto, N. Jung, S. Bräse, Solid phase syntheses of: S, N -substituted 2-mercaptobenzoimidazoles, *RSC Adv.* 6 (2016) 39573–39576. <https://doi.org/10.1039/c6ra05702k>.

[14] J.J. D'amico, F.G. Bollinger, Synthesis of 2-oxo-3-benzothiazolineacetyl chloride, 5-chloro-2-oxo-3-benzothiazolineacetyl chloride and derivatives, *J. Heterocycl. Chem.* 25 (1988) 1183–1190.

[15] D. Cerniauskaite, J. Rousseau, A. Sackus, P. Rollin, A. Tatibouët, Glucosinolate synthesis: A hydroxamic acid approach, *European J. Org. Chem.* (2011) 2293–2300. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201001438>.

[16] M.L. Zeraik, V.F. Ximenes, L.O. Regasini, L.A. Dutra, D.H.S. Silva, L.M. Fonseca, D. Coelho, S.A.S. Machado, V.S. Bolzani, 4'-Aminochalcones As Novel Inhibitors of the Chlorinating Activity of Myeloperoxidase, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 5405–5413. <https://doi.org/10.2174/092986712803833344>.

[17] C. Capeillère-Blandin, Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: A two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation, *Biochem. J.* 336 (1998) 395–404. <https://doi.org/10.1042/bj3360395>.

[18] T.L. Ching, J. Dejong, A. Bast, A Method for Screening Hypochlorous Acid Scavengers by Inhibition of the Oxidation of 5-Thio-2-Nitrobenzoic Acid: Application Anti-asthmatic Drugs, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 377–381. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1195>.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16ECZ014 numaralı proje ve TÜBİTAK tarafından 319S004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BAZI YENİ MONOKATYONİK GUANİDİNO BENZİMİDAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE ANTİPARAZİTER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

S4

Fatıma DOĞANÇ¹, İsmail ÇELİK², Gökçen EREN³, Marcel KAISER⁴, Reto BRUN⁴, Hakan GÖKER¹

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100 Ankara.

²Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 38280 Kayseri.

³Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

⁴İsviçre Tropikal ve Halk Sağlığı Enstitüsü, 4002 Basel.

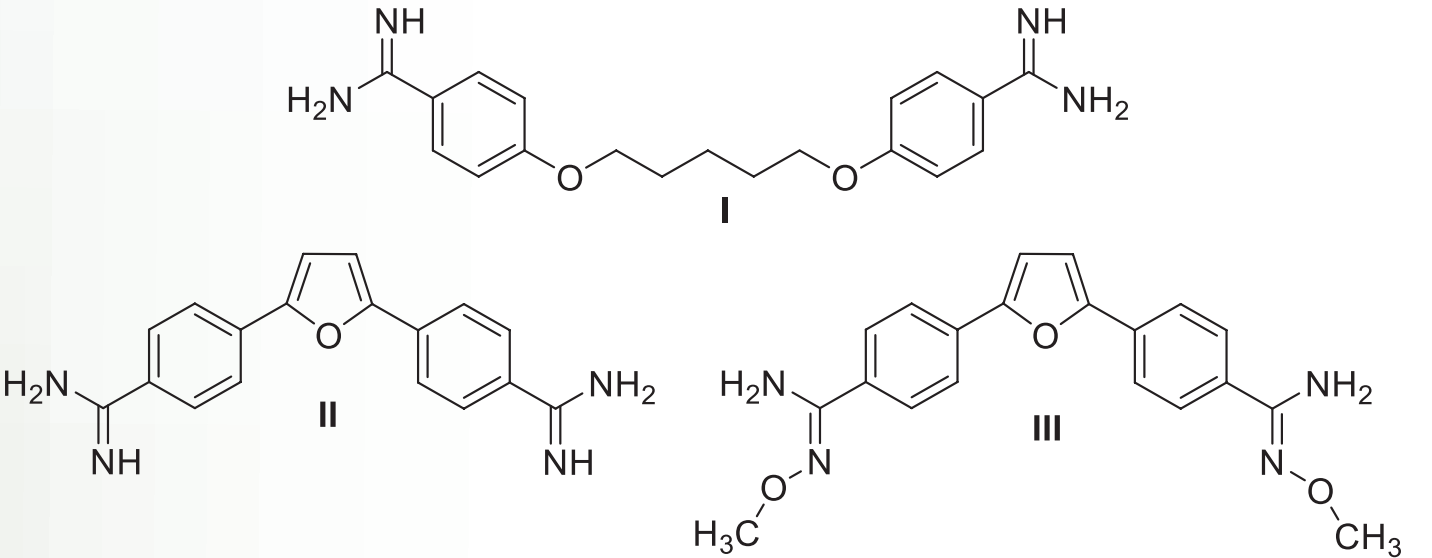
(doganc@ankara.edu.tr)

GİRİŞ

Tropikal hastalıklar, tropikal ve subtropikal bölgedeki 149 ülkede yaygın olan çeşitli bulaşıcı hastalıklar grubudur ve her yıl bir milyardan fazla insanı etkilemektedir [1]. Bu hastalıklar arasında yer alan paraziter enfeksiyonlar gelişmekte olan ülkelerde yaygın olmasının yanı sıra gelişmiş ülkelerde de immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli fırsatçı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bunlar arasında yer alan sıtma (malarya), uyku hastalığı (Afrika tripanozomiyazisi, HAT), Chagas hastalığı ve layşmanyazis önemli miktarda mortalite ve morbiditeye neden olup, ciddi anlamda maliyet sıkıntısı yaratmaktadır [2,3].

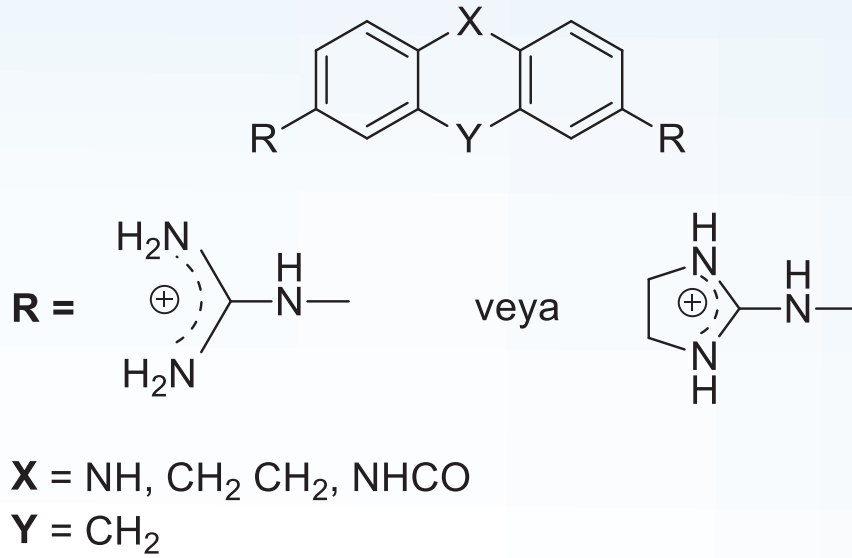
Protozoan parazitler çok sayıda ilaca dirençlidir. Tedavide kullanılan ilaçlar oldukça toksiktir, uzun tedavi süreleri ve önemli yan etkileri vardır. Ayrıca, maliyetle ilgili problemler ve oral biyoyararlanım eksikliği, yeni antiparaziter bileşiklerin geliştirilmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır [3].

Aromatik amidin türevleri (Şekil 1), DNA ile etkileşen bileşik grubu olarak bilinmektedir. Bu bileşikler, DNA minör kavitenin özellikle AT baz çiftlerine bağlanarak in vitro antiprotozoal aktivite göstermektedir. Bu türevler protozoal hastalıkların tedavisinde yıllardır kullanılmaktadır [4].



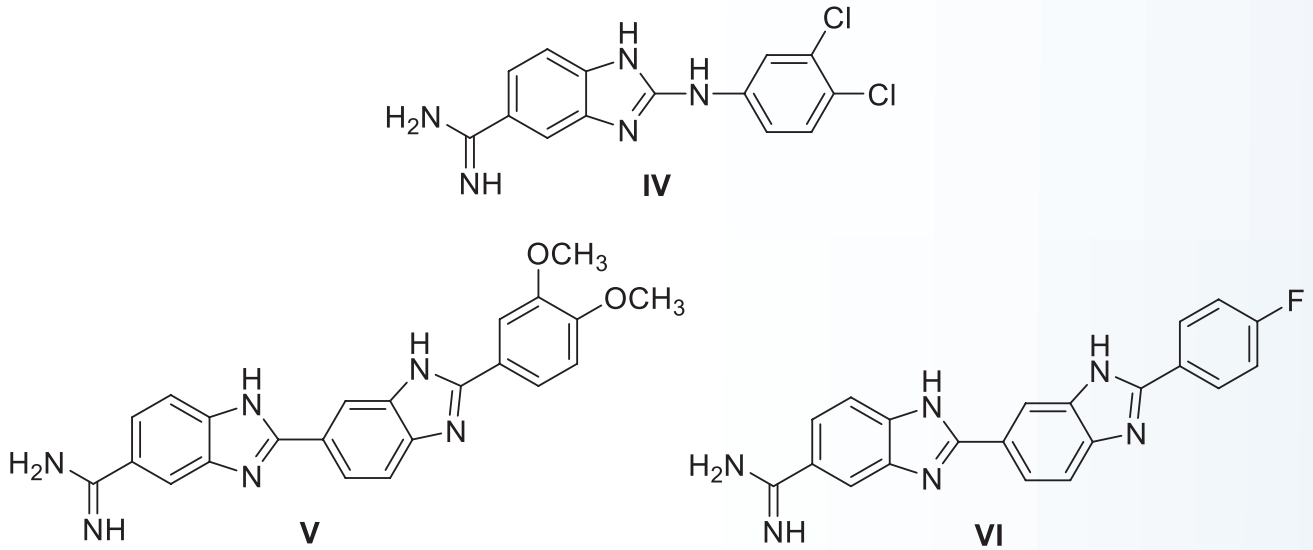
Şema 1. Pentamidin (I), Furamidin (II) ve Pafuramidin (III).

Son zamanlarda, amidinlerin biyoizosterleri olan aromatik diguanidin türevi bileşiklerin de önemli antiprotozoal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bisguanidin ve bis(2-aminoimidazolin) gibi dikatyonik DNA minör kaviteye bağlanan bileşikler (Şekil 2), nanomolar konsantrasyonlarda *Trypanosoma brucei rhodesiense* ve *Plasmodium falciparum*'a karşı in vitro aktivite göstermiştir [5].



Şema 2 Dikasyonik bisguanidin ve bis(2-aminoimidazolin) bileşikleri

Daha önceki çalışmalarda, sadece dikasyonik bileşiklerin değil, aynı zamanda monokasyonik bileşiklerin de protozoan parazitlere karşı iyi inhibitör aktivite sergilediğini göstermiştir. Bunlar arasında bileşik IV [6] ve V-VI [7] (Şekil 3), *P. falciparum*'a karşı önemli inhibitör aktiviteye sahiptir. Ayrıca, bileşik V ve VI, *T. b. rhodesiense*'e karşı da iyi bir inhibitör aktivite sergilemiştir.



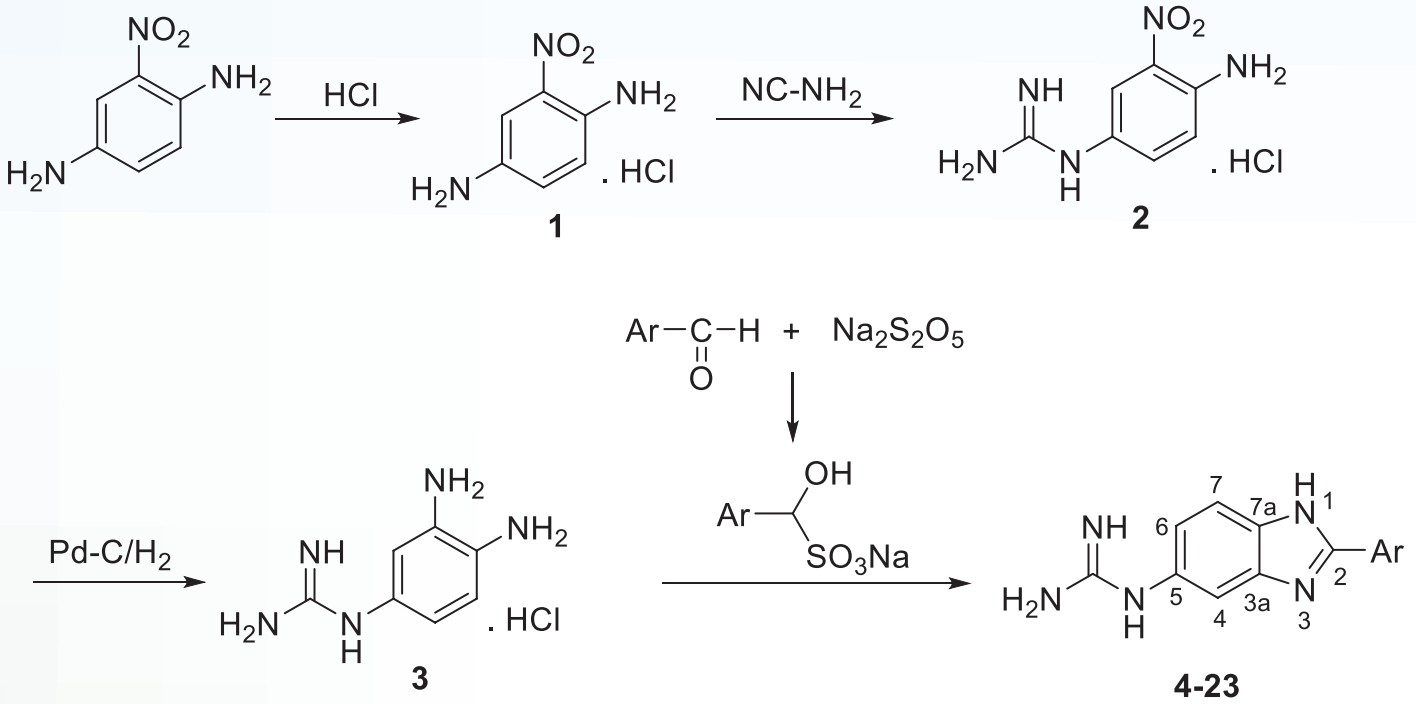
Şema 3 Daha önceki çalışmalarda bildirilen potent antiprotozoal aktiviteye sahip monokasyonik bileşikler

Bu çalışmada monokasyonik guanidino grupları taşıyan yeni benzimidazol türevlerinin sentezi, kimyasal yapılarının aydınlatılması ve *P. falciparum*, *T. b. rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*'ye karşı in vitro antiprotozoal etkilerinin incelenmesi yer almaktadır. Bileşiklerin DNA ile nasıl etkileşime girdiğini araştırmak için moleküler doking çalışmaları yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Tasarlanan türevler Şekil 4'te verilen yöntemler kullanılarak hazırlanmıştır. İlk olarak 2-nitro-1,4-fenilendiamin, 4M HCl (dioksan içinde) ile etanol içinde oda sıcaklığında karıştırılarak HCl tuzuna (**1**) dönüştürülmüştür. Sonraki basamakta 1-(4-amino-3-nitrofenil) guanidin HCl (**2**) elde etmek için siyanamid ile reaksiyona sokulmuştur. Bu moleküldeki nitro grubu Pd/C katalizöründe hidrojen gazı ile redüklenerek 1-(3,4-diaminofenil)guanidin HCl (**3**) bileşiği hazırlanmıştır [8]. Bileşik **3** ile karşılık gelen süstitüe benzaldehyitlerin sodyum metabisüfit katım ürünleri, DMF içinde halka siklizasyonuna tabi tutularak hedeflenen bileşikler olan guanidino benzimidazol türevleri elde edilmiştir (**4-23**) (Tablo 1) [9]. Bileşiklerin HCl tuzları ise HCl gazı geçirilmiş etanol içinde yapılmıştır.



Şema 4 Tasarlanan guanidinobenzimidazol türevlerinin sentezi

Hücre kültürü çalışmaları

Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin *P. falciparum* NF54, *T. b. rhodesiense* STIB900, *T. cruzi* Tulahuen C4 ve *L. donovani* MHOM-ET-67/L82'ye karşı in vitro etkilerinin incelenmesi ve sitotoksitelerinin değerlendirilmesi Bernal ve ark. tarafından belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir [10].

Moleküler doking çalışmaları

Bileşik 7 ve 14'ün DNA ile etkileşimlerinin moleküler seviyede incelenmesi amacıyla moleküler doking çalışmaları (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2020-2, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020 ve Schrödinger Release 2020-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) gerçekleştirilmiştir. Reseptör olarak 1.9 Å çözünürlüğünde DB819 bağlı d(CGCGAATTCGCG)₂ sekansına sahip DNA kompleksi (PDB kodu: 3OIE) kullanılmıştır [11].

Moleküler dinamik çalışmaları

Moleküler dinamik simülasyon çalışmaları için, GROMACS 2020.4 [12] versiyonu (GRONingen MACHine) kullanılmıştır. DNA ve bileşiklerin topoloji dosyası Amber99sb-ildn kuvvet alanı [13] kullanılarak oluşturulmuştur ve 200 ns süreli moleküler dinamik simülasyonları gerçekleştirilmiştir. RMSD, RMSF ve moleküller arası hidrojen bağı analizleri yapılmıştır. Son olarak, protein ve ligand arasındaki ortalama etkileşim enerjisi, Lennard-Jones enerjisine göre hesaplanmıştır.

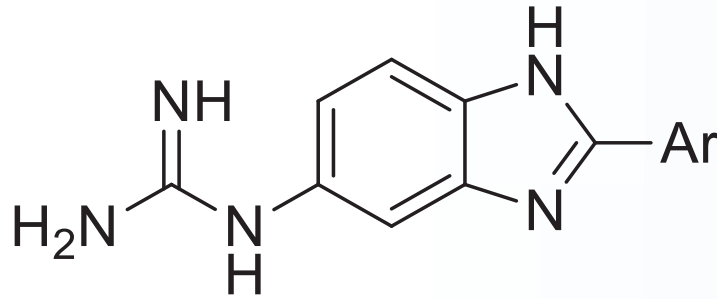
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma ile 5(6). konumlarında guanidino yapısı taşıyan benzimidazol türevlerinin 2. konumuna farklı sübstitüentler getirilerek monokatyonik bileşiklerin sentezlenmesi, yapılarının aydınlatılması, *P. falciparum*, *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi*, *L. donovani*'ye karşı in vitro antiprotzoal aktivitelerinin ve sitotoksik (L-6 sıçan miyoblast hücrelerine karşı) etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır (Tablo 1).

Sentezi yapılan bileşiklerin saflık kontrolleri, erime noktaları ve İTK incelemeleri yapıldıktan sonra, yapılarını kanıtlamak üzere spektral analizleri gerçekleştirilmiş, elementel analiz, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve COSY, NOESY, HSQC, HMBC gibi 2 boyutlu NMR analizleri ve kütle analizleri ile elde edilen bulguların beklenen yapıları kanıtlar nitelikte olduğu bulunmuştur.

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik etkileri L-6 sıçan miyoblast hücreleri üzerinde incelenmiş, referans bileşik podofilotoksine (IC₅₀ = 0.006 µg/mL) kıyasla IC₅₀ değerlerinin (39.95 µg/mL ile >100 µg/mL) sitotoksik olmadığı anlaşılmıştır. Dolayısıyla bu durum sentezlenen maddelerin sitotoksosite açısından herhangi bir problem oluşturmadığını göstermektedir. *P. falciparum*'a karşı IC₅₀ değerleri 0.018 ile 37.15 µg/mL arasında bulunmuştur. Özellikle bileşik 7 (IC₅₀ = 0.018 µg/mL) ve 14 (IC₅₀ = 0.052 µg/mL) diğerlerine göre en iyi inhibitör aktiviteye sahiptir. Ayrıca, bileşik 13, 17 ve 20 bileşikleri de sırasıyla 0.153, 0.168 ve 0.19 µg/mL IC₅₀ değerleri ile iyi inhibitör aktivite göstermiştir. Bu moleküllerin ortak özelliği, benzimidazol yapısının C-2 konumunda bifenil, 4-(3,4-dimetoksi-fenoksi)fenil, floren ve bitiyofen gibi hacimli aromatik halkalara sahip olmalarıdır. Bileşik 11 (IC₅₀ = 6.04 µg/mL), 16 (IC₅₀ = 3.8 µg/mL) ve 22 (IC₅₀ = 5.62 µg/mL), *T. b. rhodesiense*'e karşı, bileşik 16 (IC₅₀ = 8.57 µg/mL) ise *T. cruzi*'ye karşı orta düzeyde aktivite sergilemiştir. Test edilen bileşiklerin hiçbirinin *L. donovani*'ye karşı aktif olmadığı gözlenmiştir.

Şema 3 Sentezlenen bileşiklerin formülleri ve in vitro antiprotzoal aktiviteleri

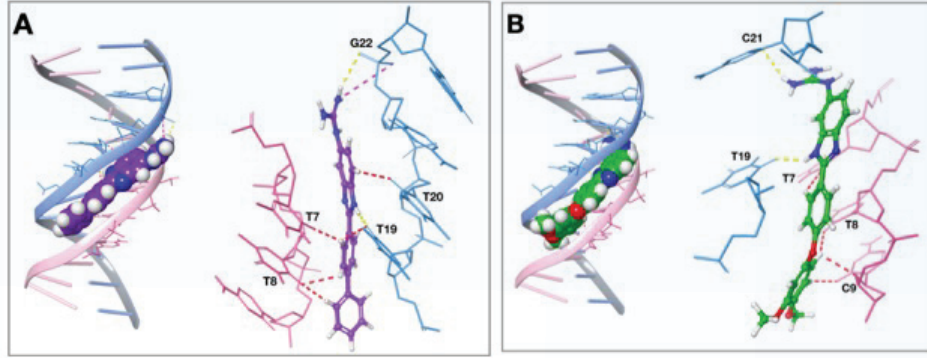


IC₅₀ (µg/mL)

No	Ar	P.f.	T.b.r.	T.c.	L.d.	Cytotoxicity L6 cells
4		4.07	11.6	61.2	>100	>100
5		1.89	29.5	90.5	64.5	71.1
6		1.17	18.2	89.5	>100	>100
7		0.018	21.5	54.3	52.55	42.6
8		37.2	72.1	59.1	>100	>100
9		0.226	13.6	38	>100	43.2
10		1.87	16.1	49.5	>100	51.6
11		2.67	6.04	67	>100	>100
12		6.26	40.8	62	>100	97.8
13		0.153	23.8	>100	>100	78
14		0.052	12.5	58.6	58	>100
15		1.41	11.8	63.6	>100	48.9
16		2.72	3.8	8.57	46.3	44.6
17		0.168	6.03	34.3	40.3	43.6
18		0.82	10.1	75.1	56.2	73.5
19		0.57	12.1	53.1	58.6	40
20		0.19	11.8	46.1	37.7	49.9
21		0.279	16	36.5	44	48.4
22		1.14	5.62	21.7	7.7	46.8
23		3.03	17.3	64	90.2	93
Chl.		0.003	-	-	-	-
Mel.		-	0.003	-	-	-
Bnz.		-	-	0.757	-	-
Mil.		-	-	-	0.555	-
Pod.		-	-	-	-	0.006

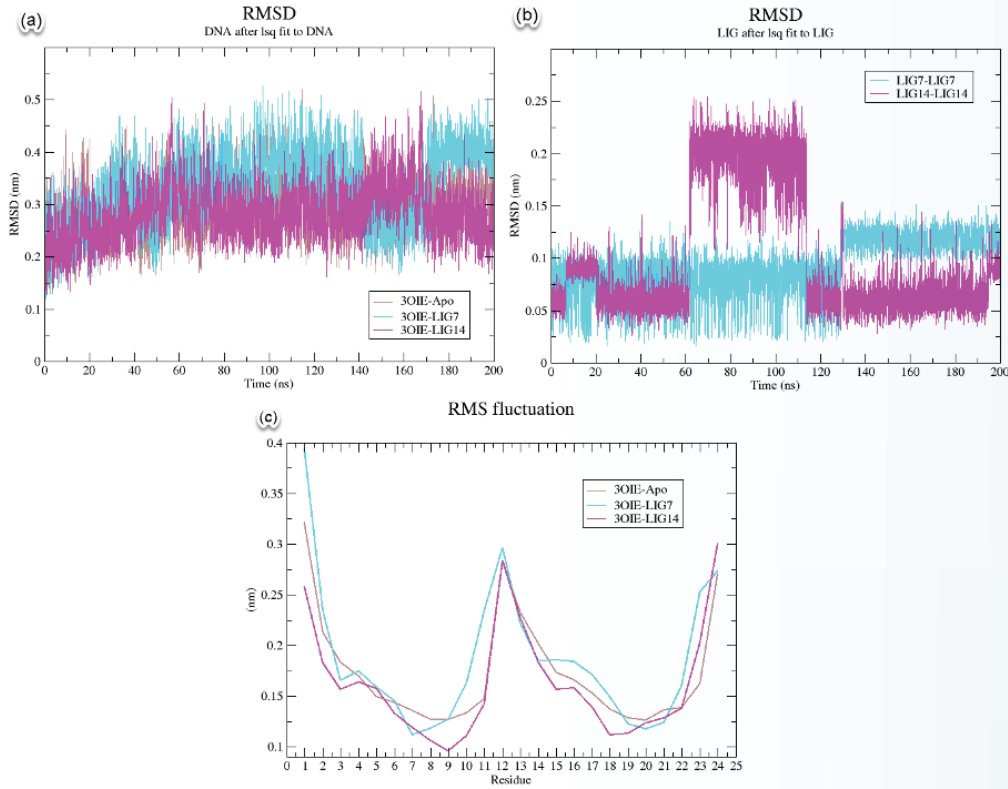
P.f.: Plasmodium falciparum NF54, T.b.r.: Trypanosoma brucei rhodesiense STIB900, T.c.: Trypanosoma cruzi Tulahuen C4, L.d.: Leishmania donovani MHOM-ET-67/L82, Chl: Klorokin, Mel: Melarsoprol, Bnz: Benznidazol, Mil: Miltefosin, Pod: Podofilotoksin.

Moleküler doking çalışmalarının sonuçlarına göre bileşik 7 ve 14, DNA yapısının minör kavitesine yerleşerek etkileşim göstermiştir (Şekil 5). Bileşik 7'nin minör kavitenin özellikle AT zengin bölgesine yaklaşık beş baz çiftini karşılayacak şekilde yerleştiği ve her iki DNA monomeriyle de etkileşim gösterdiği gözlenmiştir. Bileşik 7 için bağlanma enerjisi -9.372 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Bileşik 14'ün ise bileşik 7'ye nazaran minör kaviteye daha kıvrımsal bir konformasyonla yerleştiği ve yaklaşık altı baz çiftini kapsayacak bir bölgeyi doldurduğu gözlenmiştir. DNA yapısının tek monomeri ile etkileşmiştir. Bileşik 14 için bağlanma enerjisi -9.764 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5 Bileşik 7 (A) ve 14'ün (B) DNA yapısındaki tahmini bağlanma görüntüsü (PDB code: 3OIE). Sarı çizgiler hidrojen bağlarını ve kırmızı çizgiler aromatik hidrojen bağlarını göstermektedir.

Moleküler dinamik çalışmalarında oluşturulan ortamın güvenilirliği açısından ve bileşik 7 ve 14'ün DNA ile etkileşiminde meydana gelebilecek değişiklikleri saptamak için ligand içermeyen DNA simülasyonu da hazırlanmıştır. RMSD, RMSF, moleküller arası hidrojen bağı ve protein-ligand etkileşiminin yörünge analizi yapılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6 (a) DNA-root mean square deviation (RMSD), (b) Ligand-RMSD ve (c) root mean square fluctuation (RMSF), apo formu (3OIE-Apo) analizi, 200 ns boyunca bileşik 7 (3OIE-LIG7) ve 14'ün (3OIE-LIG14) protozoal DNA holo formları.

SONUÇLAR

Bu çalışmada 2-(aril-sübtitüe-1H-benzimidazol-5(6)-il)guanidin türevlerinin *P. falciparum*'a karşı iyi bir inhibitör aktivite profili gösterdiğini belirtilmiştir. Özellikle bileşik 7 ve 14 referans ilaç klorokin ile karşılaştırıldığında *P. falciparum*'a karşı yakın aktivite göstermiştir. Benzimidazol yapısının 2. konumunda büyük hacimli grupların yer almasının antimalaryal aktivite için önemli olduğu gözlenmiştir. Sentezlenen bileşikler ayrıca referans ilaç melarsoprol ile karşılaştırıldığında *T. b. rhodesiense*'ye karşı orta düzeyde aktivite gösterirken, *T. cruzi* veya *L. donovani*'ye karşı iyi bir aktivite sergilememiştir. Bileşik 7 ve 14 için yapılan moleküler doking çalışmaları, bu bileşiklerin DNA minör kaviteye bağlandığını biyolojik veriler ile desteklemiştir. Moleküler dinamik çalışmalarına göre, 7 ve 14 numaralı bileşikler 200 ns süreli simülasyon sırasında stabil kalarak 4 veya 5 hidrojen bağı ve sırasıyla -167.75 kJ mol⁻¹ ve -220.67 kJ mol⁻¹ ortalama Lennard-Jones DNA-ligand enerjisi oluşturmuştur.

KAYNAKÇA

- [1] WHO neglected tropical diseases. https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/, 2019. (Accessed 1 October 2019) accessed.
- [2] Soeiro MNC, De Souza EM, Stephens CE, Boykin DW. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2005;14(8):957-972.
- [3] Bartlett MS, Edlind TD, Lee CH, Dean R, Queener SF, Shaw MM, Smith JW. Albendazole inhibits *Pneumocystis carinii* proliferation in inoculated immunosuppressed mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(8):1834-1837.
- [4] Ismail MA, Batista-Parra A, Miao Y, Wilson WD, Wenzler T, Brun R, Boykin DW. Dicationic near-linear biphenyl benzimidazole derivatives as DNA-targeted antiprotozoal agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2005;13:6718-6726.
- [5] Saczewski F, Balewski L. Biological activities of guanidine compounds. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2009;19(10):1417-1448.
- [6] Karaaslan C, Kaiser M, Brun R, Göker H. Synthesis and potent antiprotozoal activity of mono/di amidino 2-anilinobenzimidazoles versus *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Bioorg. Med. Chem.* 2016;24:4038-4044.
- [7] Alp M, Göker H, Brun R, Yıldız S. Synthesis and antiparasitic and antifungal evaluation of 2'-arylsubstituted-1H,1'H-[2,5'] bisbenzimidazolyl-5-carboxamidines. *Eur. J. Med. Chem.* 2009;44:2002-2008.
- [8] Church TJ, Cutshall NS, Gangloff AR, Jenkins TE, Linsell MS, Litvak J, Rice KD, Spencer JR, Wang VR. Compounds and Compositions for Treating Diseases Associated with Serine Protease, Particularly Trypsin, Activity. 1998;WO 98/45275.
- [9] Ridley HF, Spickett RGW, Timmis GM. A new synthesis of benzimidazoles and aza-analogs. *J. Heterocycl. Chem.* 1965;2:453-456.
- [10] Bernal FA, Kaiser M, Wunsch B, Schmidt TJ. Structure-activity relationships of cinnamate ester analogues as potent antiprotozoal agents. *ChemMedChem.* 2020;15(1):68-78.
- [11] Chai Y, Munde M, Kumar A, Mickelson L, Lin S, Campbell NH, Banerjee M, Akay S, Liu Z, Farahat AA, Nhili R, Depauw S, David-Cordonnier MH, Neidle S, Wilson WD, Boykin DW. Structure-dependent binding of arylimidamides to the DNA minor groove. *Chembiochem.* 2014;15:68-79.
- [12] Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Pall S, Smith JC, Hess B, Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 2015;1:19-25.
- [13] Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* 2010;78(8):1950-1958.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün 17L0237006 proje numarası ile desteklenmiştir. Bidirilen tüm moleküler dinamik simülasyonları TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu), ULAKBİM (Türkiye Akademik Ağ ve Bilgi Merkezi), Yüksek Başarımlı ve Grid Hesaplama Merkezi (TRUBA kaynakları) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

YENİ BAZI PÜRİN, PİRİMİDİN NÜKLEOZİT ANALOĞU BİLEŞİKLERİN SENTEZ, YAPI AYDINLATILMASI VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

S5

Duygu ALTIPARMAK¹, Meral TUNÇBİLEK¹, İrem DURMAZ ŞAHİN², Rengül ÇETİN ATALAY³

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100 Ankara.

²Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 34450 İstanbul.

³Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoinformatik Bölümü, 06800 Ankara.

(duygusac@gmail.com)

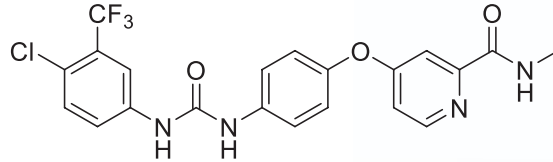
GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve yayılmasıyla karakterize bir grup hastalıktır. Dünya genelinde, her yedi ölümden birinin nedeni kanser olarak karşımıza çıkmaktadır. Kanser, AIDS, tüberküloz ve malarya gibi hastalıklardan hayatını kaybedenlerin toplamından daha fazla sayıda ölüme neden olmaktadır.

Dünya nüfusunun ve ortalama insan yaşam süresinin artmasından dolayı 2030 yılı itibarıyla 21,7 milyon yeni kanser vakasının meydana geleceği ve 13 milyon kişinin de kanser sebebiyle hayatını kaybedeceği öngörülmektedir [1].

Hepatosellüler Karsinoma (HSK) ise dünya genelinde kanser ile ilişkili ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. HSK'nın risk faktörleri Hepatit B ve/veya Hepatit C ile kronik enfeksiyon, alkol kullanımı, obezite, diyabet, sigara kullanımı ve hemakromatozis gibi nadir olarak görülen genetik bozukluklardır [2,3].

HSK tanısı konulmuş hastalar için pek çok tedavi seçeneği mevcuttur. Tedavi seçenekleri tümör yükü, karaciğer fonksiyonu ve hastanın durumu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak belirlenmektedir. Sorafenib, ilerlemiş HSK'sı olan ve cerrahi rezeksiyon için uygun olmayan hastaların sistemik tedavisinde öncelikle kullanılan ve onay alan ilk ilaçtır [4].

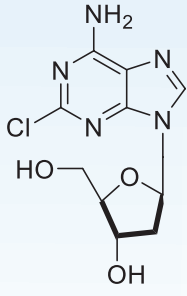


Sorafenib

Karaciğer kanseri tedavisinde başarı şansının çok düşük olmasında hedefe yönelik kemoterapötik ajanların yetersiz kalmasının rolü vardır. Bu yüzden, hedefe yönelik yeni özgün ilaç adaylarının keşfi bu hastalığın tedavisinde açısından çok önemlidir.

Nükleozit analogları, kanser tedavisinde ilk kullanılan kemoterapötik ilaçlar arasında yer almaktadır. Antikanser nükleozit türevleri, çeşitli pürin ve pirimidin nükleozit analoglarını içermektedir.

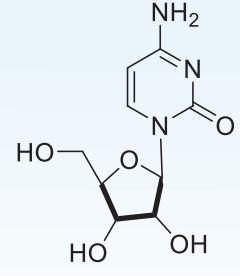
Pürin nükleozit analogu olan kladribin ve fludarabin, akut miyeloid lösemi (AML) hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onay almıştır. Pirimidin nükleozit analoglarından sitarabin, akut lösemi tedavisinde; gemcitabin ise çeşitli solid tümörlerin ve bazı hematolojik malignitelerin tedavisinde yaygın oranda kullanılmaktadır. Ayrıca, floropirimidin türevi 5-florourasil ve kapesitabin kolorektal ve meme kanserlerinde kullanılan pirimidin nükleozit türevi bileşiklerdir [5].



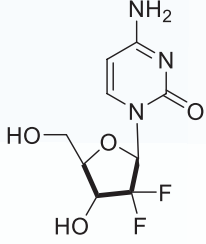
Kladrinin



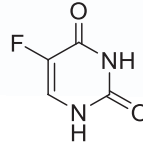
Fludarabin



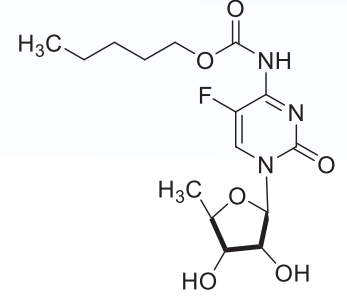
Sitarabin



Gemsitabin



5-Florourasil



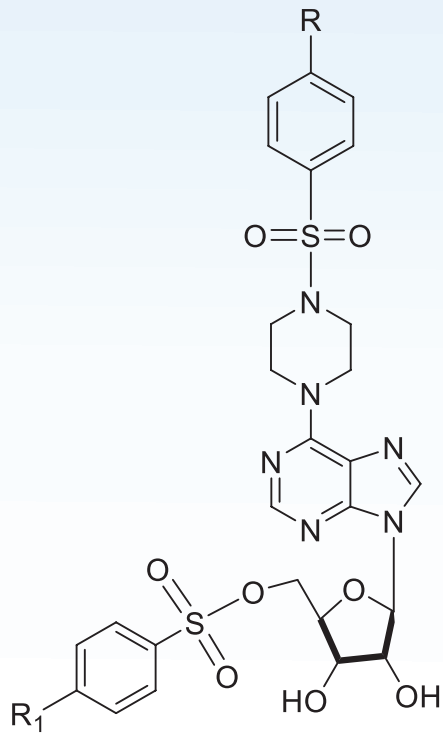
Kapesitabin

Nükleozit analoglarının sitotoksik bileşikler olarak artan önemi, yeni türevlerin geliştirilmesine ve bu türevlerin antitümör etkilerinin artırılması ve etki mekanizmalarının anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Geçen yüzyılda modern tıbbın birçok alanında oldukça başarılı çalışmalar yapılmasına rağmen, kanserin başarılı tedavisi için 21. yüzyıl başında önemli fırsatlar yakalanmıştır. Bu amaçla birçok yeni bileşik sentezlenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır; ancak, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların toksik etkilerinin fazla olması kullanımı sınırlı hale getirmektedir.

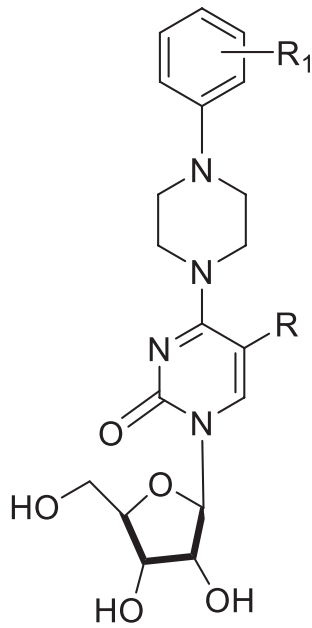
Kanser tedavisinde, selektif olarak tümör hücrelerini etkileyen ve genel toksisitesi olmaksızın kanserin yayılmasını inhibe eden yeni ilaçların sentezlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada 6-(4-süstitüe fenilsülfonilpiperazin)-9-(-D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) ve 4-(süstitüe fenilpiperazin)-1-(-D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon türevlerinin (Şekil 1 ve Şekil 2) sentezlenmesi ve antikanser aktivitelerinin öncelikle üçlü hücre hattında (Huh7 karaciğer, HCT116 kolon ve MCF7 meme kanser hücre hatları) in vitro olarak test edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca ilk taramada IC50 değeri 10 µM ve altında olan bileşiklerin daha sonra ileri sitotoksik aktivite çalışmalarına alınması ve genişletilmiş karaciğer hücre hattı panelinde (Huh7, HepG2, Hep3B, PLC, MV, FOCUS, SNU182, SNU387, SNU398, SNU423, SNU449, SNU475 kanser hücre hatları) aktivitelerinin incelenmesi planlanmıştır.



R	R ₁	R	R ₁
H	H	OCH ₃	H
H	CH ₃	OCH ₃	CH ₃
H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
CH ₃	H	F	H
CH ₃	CH ₃	F	CH ₃
CH ₃	OCH ₃	F	OCH ₃
CH(CH ₃) ₂	H	Cl	H
CH(CH ₃) ₂	CH ₃	Cl	CH ₃
CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	Cl	OCH ₃
CF ₃	H	Br	H
CF ₃	CH ₃	Br	CH ₃
CF ₃	OCH ₃	Br	OCH ₃

Şekil 1 Sentezlenen purin nükleozit türevleri.



R	R ₁	R	R ₁
H	H	CH ₃	H
H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
H	CF ₃	CH ₃	CF ₃
H	F	CH ₃	OCH ₃
H	Cl	CH ₃	F
H	3,4-diCl	CH ₃	Cl
		CH ₃	3,4-diCl

Şekil 2 Sentezlenen pirimidin nükleozit türevleri.

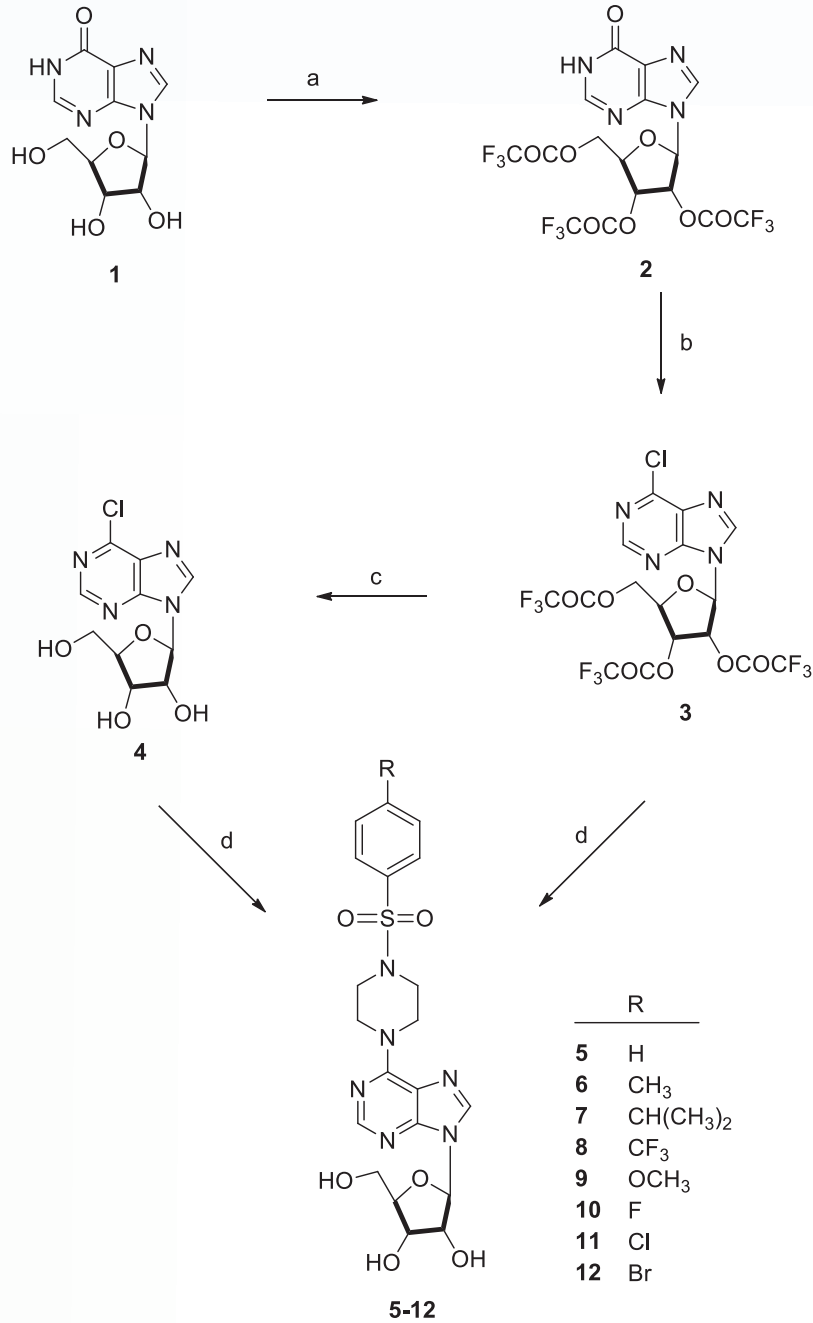
GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

1. 6-(4-Süstitüe fenilsülfonilpiperazin)-9-(β-D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) (45-68) Türevlerinin Sentezi

1.1. 6-(4-Süstitüe fenilsülfonilpiperazin)-9-(β-D-ribofuranozil) pürin Türevlerinin (5-12) Sentezi:

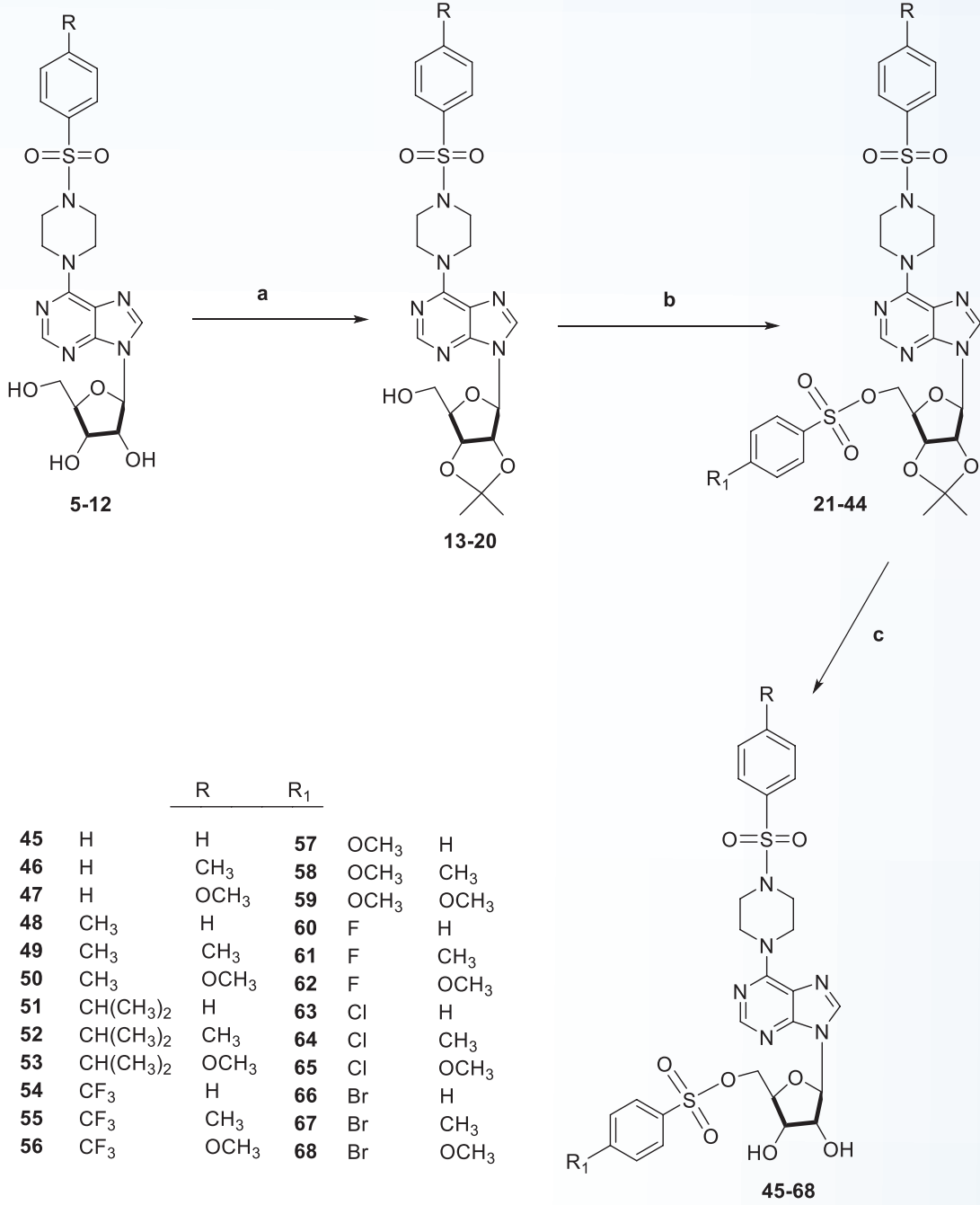
Sentezi tasarlanan sonuç pürin nükleozit analoglarına (45-68) ulaşmak için öncelikle (6-(4-süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β-D-ribofuranozil)pürin (5-12) ara ürünlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu türevlerin eldesi için kullanılacak olan başlangıç maddesi 6-kloro-9-(β-D-ribofuranozil)pürin (4), inozinden (1) hareketle trifloroasetik asit anhidrit ile asetilasyon, tiyonil klorür ile halojenasyon ve metanol ile hidrolizi takiben sentezlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda bileşik 4'ten hareketle 6. konumundaki klor atomunun trietilamin varlığında 1-(4-süstitüe fenilsülfonil)piperazin türevleri ile nükleofilik süstitüsyonu sonucu 6-süstitüe pürin nükleozit türevlerine ulaşılabilirdiği gibi hidroliz öncesi basamaktan (3) hareketle de hem hidroliz hem de süstitüsyon reaksiyonunun aynı basamakta yürüdüğü görülmüş ve hidroliz ürünü elde edilmeden direkt olarak bileşik 3'ten hareketle sonuç nükleozit türevlerine geçilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3 6-(4-Süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β-D-ribofuranozil) pürin türevlerinin (5-12) sentezi. Reajanlar: (a) TFAA, CH₂Cl₂; (b) SOCl₂, CH₂Cl₂, DMF; (c) MeOH; (d) 1-(4-süstitüe fenilsülfonil) piperazin, Et₃N, EtOH.

1.2. 6-(4-Süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β-D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) Türevlerinin (45-68) Sentezi:

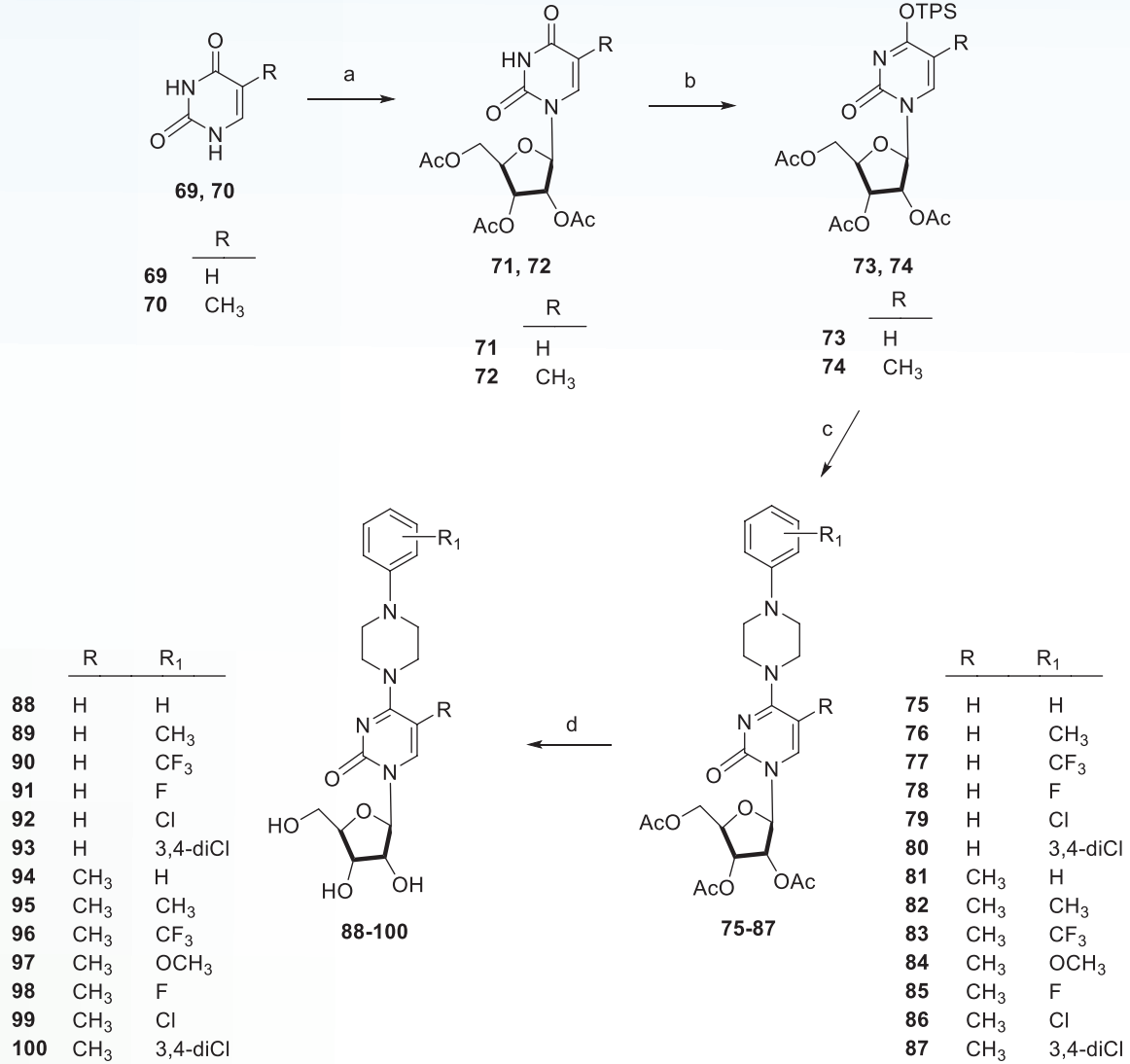
6-(4-süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β-D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) türevlerinin (45-68) sentezi için kullanılacak olan başlangıç maddelerinden (5-12) hareketle 2',3'-OH gruplarının 2,2-dimetoksipropan ile proteksiyonunu (13-20) takiben 5'-OH grubunun sülfonasyonu süstitüe benzen sülfonil klorürler ile yapılmıştır (21-44). Sonuç bileşiklerimiz 45-68, THF-H₂O (8:3) içinde trifloroasetik asit ile hidroliz reaksiyonu ile elde edilmiştir (Şekil 4)



Şekil 4 Şekil 4. 6-(4-Süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β-D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) türevlerinin (45-68) sentezi. Re ajanlar: (a) Me₂C(OMe)₂, p-TsOH, aseton; (b) 4-süstitüe benzen sülfonil klorür, piridin, CH₂Cl₂/4-süstitüebenzen sülfonil klorür, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; (c) CF₃COOH, THF-H₂O (8:3).

2.4-(Süstitüe fenilpiperazin)-1-(β -D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon Türevlerinin (88-100) Sentezi:

4-(Süstitüe fenil piperazin)-1-(2,3,5-tri-O-asetil- β -D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon (88-100) türevlerine ulaşmak üzere ilk basamakta urasil (69) ve timin (70) bileşiklerinin 1,2,3,5-tetra-O-asetil- β -D-ribofuranozil ile reaksiyonu sonucu bileşik 71, 72 elde edilmiştir. Bu bileşiklerin 4. konumundaki hidroksil grubunun tosilasyonu ile elde edilen bileşik 73 ve 74'den hareketle süstitüe fenil piperazin türevleriyle süstitüsyon reaksiyonu sonucu 75-87 bileşiklerine ulaşılmıştır. Bu bileşiklerin metanol içinde sodium metilat ile hidroliz reaksiyonu ile pirimidin nükleozit türevleri elde edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. 4-(Süstitüe fenil piperazin)-1-(β -D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon türevlerinin (88-100) sentezi. Reajanlar: (a) 1,2,3,5-tetra-O-asetil- β -D-ribofuranoz, heksametildisilazan (HMDS), trimetilsilil trifluorometansülfonat (TMSOTf), SnCl₄; (b) 2,4,6-tri izopropilbenzen sulfonil klorür (TPS-Cl), piridin, DMAP, Et₃N; (c) süstitüe fenil piperazin, Et₃N, EtOH (d) NaOMe, MeOH.

Hücre kültürü çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri SRB yöntemi ile üçlü kanser hücre hattında (Huh7 karaciğer, HCT116 kolon, MCF7 meme) çalışılmış ve bu bileşiklerin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonunda uygulanan bileşiklerin yarattığı inhibisyon yüzdeleri, kanserli hücre hatlarında sitotoksik etkisi önceden bilinen (S)-(+)-kamptotesinin (CPT) nükleobaz analogu 5-florourasil (5-FU) ve nükleozit türevleri kladribin ve fludarabine karşı hesaplanmıştır.

Ayrıca ilk taramada IC₅₀ değeri 10 μ M ve altında olan bileşikler ileri sitotoksik aktivite çalışmalarına alınmış ve genişletilmiş karaciğer hücre hattı panelinde (Huh7, HepG2, Hep3B, PLC, MV, FOCUS, SNU182, SNU387, SNU398, SNU423, SNU449, SNU475 kanser hücre hatları) aktiviteleri incelenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

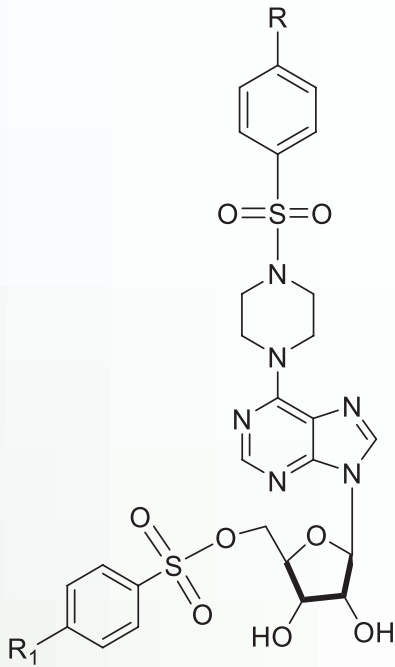
Bu çalışmada 6-(4-Sübstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β -D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-sübstitüe fenil sülfonat) türevleri inozin'den hareketle yedi basamakta ve 4-(Sübstitüe fenil piperazin)-1-(2,3,5-tri-O-asetil- β -D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon türevleri ise urasil ve timinden hareketle dört basamakta sentezlenmiştir. Bu şekilde 59 adet ara ürün ve 37 adet orjinal sonuç ürün olmak üzere toplamda 96 bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir.

Sentezi gerçekleştirilen orjinal sonuç pürin ve pirimidin nükleozit türevlerinin (45-68, 88-100) antikanser aktiviteleri ilk olarak Huh7 karaciğer, HCT116 kolon ve MCF7 meme kanser hücre hatlarında NCI-SRB yöntemiyle dublike olarak test edilmiştir. Aynı zamanda bu kanser hücre hatlarında yürütülen sitotoksik aktivite çalışmalarında, bilinen antikanser ilaçlardan DNA topoizomeras inhibitörü (S)-(+)-kamptotesinin (CPT) yanı sıra nükleobaz analogu 5-florourasil (5-FU) ve nükleozit analogları kladribin ve fludarabin de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

6,5'-Disübstitüe pürin nükleozit yapısı içeren 6-(4-sübstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β -D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-sübstitüe fenil sülfonat) (45-68) türevlerinden 6. konumdaki fenil sülfonil piperazin yapısında 4-bromofenil ve 5' konumunda nonsübstitüe fenil sülfonat grubu taşıyan pürin nükleozit analogunun (66) Huh7 karaciğer hücre hattında $IC_{50} = 1.5 \mu M$ değeri ile en aktif nükleozit türevi belirlenmiş ve bu IC_{50} değerinin ilaç olarak kullanılabilir etkin doz aralığında olduğu ($< 5 \mu M$) saptanmıştır. Ayrıca aynı hücre hattında sentezlenen sonuç ürünlerinden tamamına yakınının (46-56, 58-62, 64-67) nükleobaz analogu 5-FU ve nükleozit türevi fludarabin'den daha aktif olduğu tespit edilmiştir. HCT116 kolon kanser hücre hattında bileşikler 50, 55, 56 $IC_{50} \leq 13.2 \mu M$ değerleri ile bu hücre hattında en iyi aktivite gösteren bileşikler olmuştur ($IC_{50} = 10.7 \mu M, 13 \mu M$ ve $13.2 \mu M$; sırasıyla). MCF7 meme kanser hücre hattında nükleozit türevleri içinde en aktif bileşikler 56 ve 66 ($IC_{50} < 10 \mu M$) olmuştur. Aynı zamanda MCF7 hücre hattında bileşikler 47, 51-56, 61, 66-68 nükleozit türevi olan fludarabinden daha iyi sitotoksikite göstermiştir.

Tablo 1. 6-(4-Süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β -D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) (45-68) türevlerinin karaciğer (Huh7), meme (MCF7) ve kolon (HCT116) kanseri hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri.

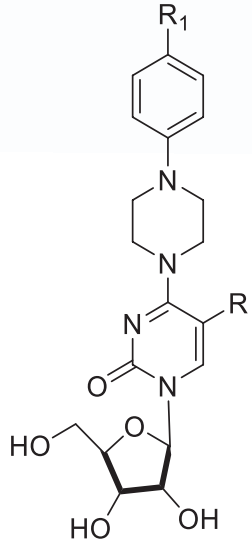
Bileşik	R	R ₁	IC ₅₀ μ M		
			Huh7	HCT116	MCF7
45	H	H	30.9	47.7	42.1
46	H	CH ₃	19.9	22.3	50.4
47	H	OCH ₃	22.1	18.9	14.1
48	CH ₃	H	24.5	32.5	24.8
49	CH ₃	CH ₃	15.7	23.8	20.3
50	CH ₃	OCH ₃	14	10.7	18.9
51	CH(CH ₃) ₂	H	19.4	47.1	12.5
52	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	17.9	27.9	12.2
53	CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	14.4	18.3	11.6
54	CF ₃	H	18.9	18.2	14.9
55	CF ₃	CH ₃	11.6	13.2	13.3
56	CF ₃	OCH ₃	12.9	13	8.8
57	OCH ₃	H	47.5	52.7	16.5
58	OCH ₃	CH ₃	18.3	155.9	16.5
59	OCH ₃	OCH ₃	13.6	34.9	20.5
60	F	H	28.7	181.8	45.2
61	F	CH ₃	15.2	EG	11.1
62	F	OCH ₃	21.1	EG	25
63	Cl	H	173.6	EG	35
64	Cl	CH ₃	20.8	35.1	13.5
65	Cl	OCH ₃	16.4	77.3	20.3
66	Br	H	1.5	30.8	7
67	Br	CH ₃	15.9	EG	14.5
68	Br	OCH ₃	40.8	33.3	12
CPT			<0.1	<0.1	<0.1
5-FU			30.7	6.0	3.5
Kladribin			1.3	<0.1	2
Fludarabin			29.9	8.3	15.2



Maddeler 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ve 2,5 μ M dozlarında uygulandıktan sonra 72 saatlik inkübasyon sonunda SRB analizi ile IC₅₀ (μ M) değerleri hesaplandı). EG: Etki Görülmedi.

Pirimidin nükleozit grubu 4-(süstitüe fenil piperazin)-1-(β -D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon türevlerinin (88-100) antikanser aktiviteleri Huh7 karaciğer, HCT116 kolon ve MCF7 meme kanser hücre hatlarında test edilmiş; ancak anlamlı sitotoksik aktiviteye rastlanmamıştır. Ancak, baz olarak timin içeren nükleozit analoglarından 4-(3,4-diklorofenil)piperazin yapısı taşıyan bileşik (100) MCF7 meme hücre hattında bilinen sitotoksik nükleozit türevi fludarabine yakın sitotoksik aktivite göstermiştir (IC₅₀= 17.5 μ M ve 15.2 μ M; sırasıyla).

Tablo 2. 4-(Süstitüe fenil piperazin)-1-(β -D-ribofuranozil)-2(1H)-pirimidinon türevlerinin (88-100) karaciğer (Huh7), meme (MCF7) ve kolon (HCT116) kanseri hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri.



Bileşik	R	R ₁	IC ₅₀ μ M		
			Huh7	HCT116	MCF7
88	H	H	EG	EG	EG
89	H	CH ₃	EG	EG	EG
90	H	OCH ₃	EG	EG	EG
91	H	F	EG	EG	EG
92	H	Cl	EG	EG	EG
93	H	3,4-diCl	EG	EG	EG
94	CH ₃	H	EG	72.5	29.1
95	CH ₃	CH ₃	EG	EG	55.2
96	CH ₃	CF ₃	47.6	46.1	30.2
97	CH ₃	OCH ₃	EG	EG	41.5
98	CH ₃	F	EG	EG	40.6
99	CH ₃	Cl	EG	EG	EG
100	CH ₃	3,4-diCl	82.9	28.3	17.5
CPT			<0.1	<0.1	<0.1
5-FU			30.7	6.0	3.5
Kladribin			1.3	<0.1	2
Fludarabin			29.9	8.3	15.2

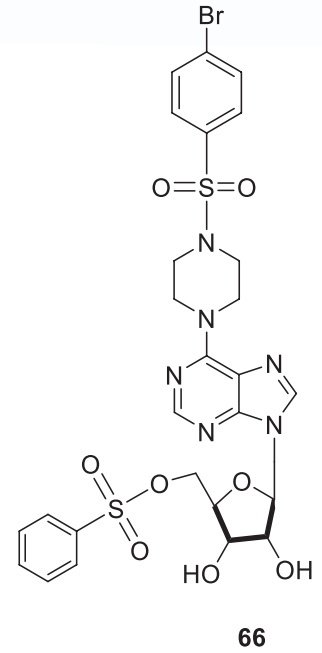
Maddeler 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M ve 2,5 μ M dozlarında uygulandıktan sonra 72 saatlik inkübasyon sonunda SRB analizi ile IC₅₀ (μ M) değerleri hesaplandı). EG: Etki Görülmedi.

Huh7 karaciğer, HCT116 kolon ve MCF7 meme kanser hücre hatlarında sitotoksik aktivitesi belirlenen nükleozit analoglarından IC50 değeri 10 µM'ın altında çıkan madde (66) daha sonra genişletilmiş karaciğer kanseri hücre panelinde Huh7, Hep3B, HepG2, PLC, Mahlavu, FOCUS, SNU475, SNU182, SNU387, SNU398, SNU423, ve SNU449 hücre hatlarında NCI-SRB deneyi ile triplike olarak test edilmiştir. Genişletilmiş HCC panelde yürütülen sitotoksik aktivite çalışmalarında, kladribin ve fludarabin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Pürin nükleozit analogu olan bileşik 66, karaciğer kanseri hücre hatlarından Huh7, HEP3B, SNU475 ve SNU423'e karşı nükleozit analogu fludarabine göre daha iyi sitotoksik aktivite göstermiştir (66 için IC50= 24.2 µM, 15.5 µM, 40.7 µM ve 22.5 µM; sırasıyla ve fludarabin için IC50= 24.4 µM, 27.8 µM, 41.5 µM ve 32.6 µM; sırasıyla).

Tablo 3 Bileşik 66'nın HSK genişletilmiş paneline karşı IC₅₀ değerleri.

		HUH7		HEP3B		HEPG2		PLC	
		IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂
66	Kladribin	24.2	0.9	15.5	1	37.2	0.8	46.3	0.8
	Fludarabin	0.6	0.9	0.1	0.6	0.4	0.9	9.1	0.8
		24.4	0.8	27.8	0.9	17	0.9	41.7	0.6
		MV		FOCUS		SNU475		SNU182	
		IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂
66	Kladribin	40	0.9	17.2	0.8	40.7	0.9	EG	
	Fludarabin	<0.1		<0.1		2.5	1	23.3	0.9
		14.2	1	13.7	0.9	41.5	1	37.2	0.7
		MV		FOCUS		SNU475		SNU182	
		IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂	IC ₅₀	R ₂
66	Kladribin	EG		34	0.7	22.5	0.9	EG	
	Fludarabin	7.1	1	<0.1		6.7	1	37.3	1
		33.8	0.8	0.2	0.7	32.6	0.9	25.1	1



Maddeler 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM ve 2,5 µM dozlarında uygulandıktan sonra 72 saatlik inkübasyon sonunda SRB analizi ile IC50 (µM) değerleri hesaplandı). EG: Etki Görülmedi.

SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında antikanser bileşik olarak 24 adet pürin nükleozit türevi ve 13 adet pirimidin nükleozit türevi bileşik sentezlenmiştir. Toplamda 37 adet orijinal sonuç bileşik elde edilmiş ve bu türevlerin sitotoksik aktiviteleri öncelikle Huh7 karaciğer kanser hücre hattı, HCT116 kolon kanser hücre hattı ve MCF7 meme kanser hücre hattında (S)-(+)-kamptotesin, 5-florourasil, kladribin ve fludarabin pozitif kontrolüne karşı incelenmiştir ve bileşiklerin farklı konsantrasyonlardaki inhibisyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

6,5'-Disüstitüe pürin nükleozit yapısı içeren 6-(4-süstitüe fenil sülfonil piperazin)-9-(β-D-ribofuranozil)pürin-5'-(4-süstitüe fenil sülfonat) (45-68) türevlerinden en aktif bileşiğin 6. konumda 4-(4-bromofenilsülfonil)piperazin ve 5' konumunda nonsüstitüe fenil sülfonat grubu taşıyan ve Huh7 karaciğer hücre hattında IC50= 1.5 µM değeri ile 66 no'lu bileşik olduğu gözlenmiştir. Bileşik 66 bu IC50 değeri ile bilinen antikanser ilaçlar olan 5-florourasil ve fludarabinden daha aktif olmakla birlikte bir diğer sitotoksik bileşik olan kladribin'e hemen hemen benzer aktivite göstermiştir.

Aynı hücre hattında (Huh7) sentezlenen pürin nükleozit anaglarının neredeyse tamamına yakınının (46-56, 58-62, 64-67) (IC50= 1.5 µM – 28.7 µM) nükleobaz analogu 5-FU (IC50= 30.7 µM) ve nükleozit türevleri fludarabin (IC50= 29.9 µM)'den daha yüksek sitotoksikite gösterdiği tespit edilmiştir.

HCT116 kolon kanser hücre hattında 50 (IC50= 10.7 µM), 55 (IC50=13 µM) ve 56 (IC50= 13.2 µM) en iyi aktivite gösteren bileşikler olmuştur (5-FU için IC50= 6.0 µM; kladribin için IC50 < 0.1 µM; fludarabin için IC50= 8.3 µM).

MCF7 meme kanser hücre hattında pürin nükleozit türevleri içinde en aktif bileşikler 56 (IC50= 8.8 µM) ve 66 (IC50= 7.0 µM) olduğu görülmüştür. Aynı zamanda MCF7 hücre hattında bileşikler 47, 51-56, 61, 66-68 IC IC50= 7 – 14.9 µM değerleri ile nükleozit türevi olan fludarabinden (IC50= 15.2 µM) daha yüksek sitotoksikite göstermiştir.

Pirimidin nükleozit analoglarından timin bazı içeren nükleozit türevlerinden 4-(3,4-diklorofenil)piperazin yapısı taşıyan bileşik (100) (IC50= 17.5 µM) MCF7 meme hücre hattında bilinen antikanser nükleozit yapısında ilaç olan fludarabine (IC50= 15.2 µM) benzer sitotoksik aktivite göstermiştir.

İleri sitotoksikite çalışmaları için bileşik 66 (IC50= 1.5 µM) seçilmiş ve genişletilmiş karaciğer kanseri hücre panelinde (Huh7, Hep3B, HepG2, PLC, Mahlavu, FOCUS, SNU475, SNU182, SNU387, SNU398, SNU423, ve SNU449) NCI-SRB deneyi ile triplike olarak test edilmiştir. Genişletilmiş HSK panelde yürütülen sitotoksik aktivite çalışmalarında kladribin ve fludarabin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu sonuçlara göre pürin nükleozit analogu (66) karaciğer kanseri hücre hatlarından Huh7, HEP3B, SNU475 ve SNU423'e karşı (IC50= 24.2 µM, 15.5 µM, 40.7 µM ve 22.5 µM; sırasıyla) nükleozit analogu fludarabin (IC50= 24.4 µM, 27.8 µM, 41.5 µM ve 32.6 µM; sırasıyla) göre daha yüksek sitotoksik aktivite göstermiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2012;65:2:87-108.
- [2] Lonardo A, Loria P. Potential for statins in the chemoprevention and management of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol. 2012;27:11:1654-1664.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin. 2015;65:1:5-29.
- [4] Raoul JL, Kudo M, Finn RS, Edeline J, Reig M, Galle PR. Systemic therapy for intermediate and advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib and beyond. Cancer Treat Rev. 2018;68:16-24.
- [5] Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. The Lancet Oncology. 2002;3:7:415-424.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından SBAG-112S182 kodlu 1001 – Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

BAZI VISİNAL DİARİL HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

S6

Fümeyye TURANLI¹, Esra NALBAT², Ece AKHAN GÜZELCAN², Rengül ÇETİN ATALAY²,
Burcu ÇALIŞKAN³, Erden BANOĞLU³

¹ Adıyaman Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 02040 Adıyaman.

² Kanser Sistem Biyolojisi Laboratuvarı, Enformatik Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06800 Ankara.

³ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

(e-posta: sturanli@adiyaman.edu.tr)

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre kanser kardiyovasküler hastalıkların önüne geçerek en ölümcül hastalık olarak sınıflandırılmaktadır. Dünyada en çok tanı konulan kanserler arasında meme kanseri (%11,7) birinci sırada olup, kadın kanserleri içinde en fazla görülen ve en fazla ölüme neden olan kanserdir. Yine GLOBOCAN (Küresel Kanser İstatistikleri) verilerine göre en çok görülen kanserlerin arasında primer karaciğer kanseri altıncı sırada olmakla beraber, mortalite açısından üçüncü (%8,3) sırada yer almaktadır [1, 2]. Ayrıca dünyada artan obeziteye paralel olarak bu kanserin sıklığının artması beklenmektedir. Bu çalışmada kanser alanında yeni ilaç aday molekülü geliştirilme ihtiyacından yola çıkarak, ilaç adayı molekül tasarımı, optimizasyonu ile özellikle meme ve karaciğer kanserine karşı etkili yeni aday molekül geliştirme ve prelinik aşamalarının tamamlanması amaçlanmıştır.

Antikanser aktiviteye sahip tedavide kullanılan veya klinik geliştirilme aşamasında olan kimyasal ajanlar incelendiğinde izoksazol, oksazol, pirazol, imidazol, tiyazol tetrazol gibi 5 üyeli heterosiklik yapılara rastlamak mümkündür. Visinal diaril heterosiklik bileşikler antikanser alanında umut verici potansiyele sahiptir. Özellikle izoksazol ve pirazol heterosiklik merkeze sahip visinal diaril bileşikler tümör gelişiminde önemi olan HSP90 (Heat-shock protein 90)'ı inhibe ederek, tübülün polimerizasyonunu engelleyerek, COX-2 (siklooksijenaz-2 enzimi) inhibisyonu yaparak veya farklı etki mekanizmaları ile antiproliferatif aktivite göstermektedir.

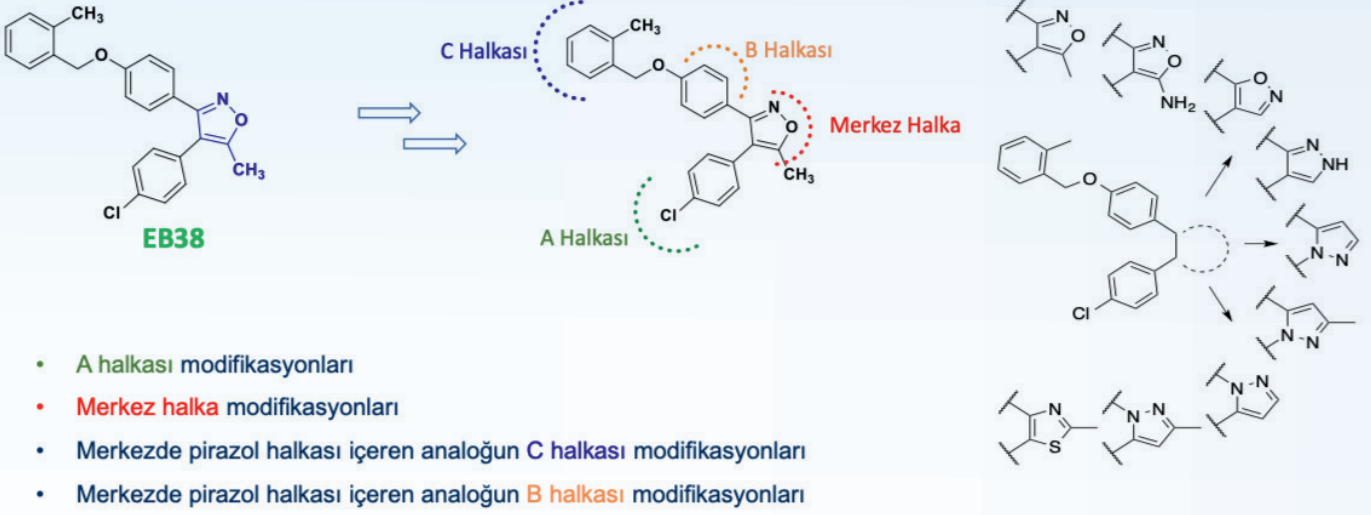
Karaciğer ve meme kanserine etkili olabilecek moleküller geliştirmek amacıyla, visinal diaril heterosiklik molekül iskeletine sahip olan, özgün bileşik serisinin sentezi, optimizasyonu ve karakterizasyonunun gerçekleştirilip epitelyal kökenli olan meme ve karaciğer kanserine karşı etkisi in vitro ve in vivo deneyler ile kanıtlanan yeni aday ilaç molekülü araştırma-geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Araştırma grubumuzun oluşturduğu bileşik koleksiyonundaki farklı kemotipler karaciğer ve meme kanseri hücre hatlarına karşı taranmış ve her iki kanser hücre hattında antiproliferatif etkili özgün bir lider molekül olan 5-metil-4-(4-klorofenil)-3-(4-((2-metilbenzil)oksi)fenil)izoksazol (EB38)'e ulaşılmıştır. Özgün bileşiğin karaciğer (Huh7 ve Mahlavu) ve meme (MCF7) kanser hücre hatlarına karşı sırasıyla 1,3; 3,2 ve 3,8 µM IC50 değerlerinde potent antitümör aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

EB38'den hareketle lider bileşik optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile meme ve karaciğer kanseri tedavisi için yeni moleküller tasarlanmış ve geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda visinal diaril heterosiklik yapıyı taşıyan orijinal bileşikler tasarlanmış, sentezlenmiş ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite değerleri belirlenerek lider molekülden daha aktif moleküllere ulaşılması hedeflenmiş ve biyolojik aktiviteler ile ilgili deneyler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca seçilen molekülün ADME özellikleri ve farmakokinetik parametrelerine yönelik çalışmalar Sygene firması tarafından yürütülmüştür.

GEREÇ VE YÖNTEM

Etkin bileşiklere ulaşılması amacıyla lider bileşiğin ana yapısından hareketle benziloksifenil grubu üzerinde, merkezi izoksazol halkasında ve izoksazol halkasına bağlı 4-klorofenil kısmında türevlendirmeler gerçekleştirilmiştir. Bu basamaklar, deneylerde elde edilen biyoaktivite çalışmaları sonuçlarına göre modifiye edilmiş ve merkez halkada yapılan değişikliklerin daha umut vadettiği göz önüne alınarak sentez çalışmaları optimize edilmiştir. Yapılan türevlendirmelerin genel yapı üzerindeki şematik gösterimi aşağıda verilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1 EB38 öncü bileşiğinin modifikasyonu sonucu elde edilen final ürünlerin şematik gösterimi.

Yapılan sentez çalışmalarında izlenen sentez prosedürleri belirlenirken güncel literatürlerdeki protokoller takip edilmiştir. Sentez işlemleri sonucunda elde edilen bileşiklerin saflaştırılması için kristalizasyon, flash kromatografi ve preparatif HPLC cihazı kullanılmıştır. Saf halde elde edilen bileşiklerin ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS spektrumları alınmış, erime dereceleri tespit edilmiş ve böylece karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca EB38'in ve ulaşılan aktif bileşikler olan Bileşik 36 ve Bileşik 51'in X-Ray kristalografileri alınmıştır [3-5].

BULGULAR VE TARTIŞMA

EB38 öncü bileşiğinden hareketle sentezlenen orijinal bileşik serisi ile kimyasal yapı ile biyolojik aktivite arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. 5 üyeli bir merkezi heterosiklik halka üzerinde visinal diaril sübstitüsyonu taşıyan genel yapıya sahip sentezlenen bileşiklerde merkezi heterosiklik halka değişikliklerinin aktivite açısından olumlu sonuçlandığı bulgulanmıştır.

EB38'den yola çıkılarak geliştirilen 1,5-diarilpirazol türevi Bileşik 36 farklı hücre hatlarında oldukça sitotoksik etkili bulunmuştur ve ileri in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bileşik 36 ile karaciğer kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilen ileri biyolojik aktivite çalışmaları (Western Blot analizi, Annexin V ile hücre ölümü mekanizması, Hoechst floresan boyama ile hücre ölümü) ile antitümör aktivitenin nasıl gerçekleştiği anlaşılmasına çalışılarak antikanser etkinin mekanizması üzerinde durulmuştur. Bileşik 36 ile muamele edilen kanser hücrelerinde, bileşiğin hücre döngüsünü durdurduğu ve böylece hücreleri apoptoza sürüklediklerine yönelik bulgular elde edilmiştir. Atimik farelerde meme ve karaciğer kanseri ksenograft tümör modelinde 4 hafta boyunca haftada iki kez 40 mg/kg dozda uygulanmış olan Bileşik 36'nın tümör hacmini azalttığı saptanmıştır (Meme kanser modelinde tümör hacmi kontrol grubuna göre %40 azalmış, karaciğer kanseri modelinde ise tümör hacminin %50'den fazla azaldığı bulgulanmıştır). Ayrıca NCI-60 insan tümör hatları tarama programı kapsamında yapılan çalışmalarda Bileşik 36'nın 10 µM konsantrasyonda 20 kanser hücre hattında %50 veya daha fazla oranda büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür. Bileşik 36 ile yapılan farmakokinetik çalışmalar analiz edilmiş, çözünürlük ve lipofilisite hakkında bilgi edinilmiştir.

Sonuç olarak "visinal diaril heterosiklik" genel yapısını taşıyan EB38 ve Bileşik 36'nın hüresel düzeyde etkinliğin mekanizmasına yönelik in vitro ve tümör büyümesi üzerindeki etkinliğini gösteren in vivo çalışmalar ile geliştirilen moleküllerin kanser tedavisi için klinik potansiyeli ortaya çıkartılmıştır.

SONUÇLAR

Karaciğer ve meme kanserine karşı etki potansiyeli yüksek moleküllerin geliştirilmesi amaçlanmış ve EB38 öncü bileşiğinden hareketle sentezlenen 33 adet orijinal bileşik serisi ile kimyasal yapı ile biyolojik aktivite arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. 5 üyeli bir merkezi heterosiklik halka üzerinde visinal diaril süstitüsüyonu taşıyan genel yapıya sahip bileşiklerde merkezi heterosiklik halka değişikliklerinin aktivite açısından olumlu sonuçlandığı bulgulanmıştır. Bununla beraber, visinal diaril grupları üzerinde gerçekleştirilen yapısal modifikasyonlar genelde aktivite kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu gruplardan 2-metilbenzil yapısının aktivite açısından oldukça önem arz ettiği, benzil grubu üzerinde farklı konumlarda ve karakterde süstitüsyonların bileşiğin aktivitesini azalttığı bulunmuştur.

EB38'den yola çıkılarak geliştirilen 1,5-diarilpirazol türevi Bileşik 36 farklı hücre hatlarında oldukça sitotoksik etkili bulunmuştur ve ileri in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Bileşik 36 ile muamele edilen kanser hücrelerinde, bileşiğin hücre döngüsünü durdurduğu ve böylece hücreleri apoptoza sürüklediklerine yönelik bulgular elde edilmiştir. Atimik farelerde meme ve karaciğer kanseri ksenograft tümör modelinde 4 hafta boyunca haftada iki kez 40 mg/kg dozda uygulanmış olan Bileşik 36'nın tümör hacmini azalttığı saptanmıştır. NCI-60 insan tümör hatları tarama programı kapsamında yapılan çalışmalarda ise Bileşik 36'nın 10 µM konsantrasyonda 20 kanser hücre hattında %50 veya daha fazla oranda büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür.

Bileşik 36'nın pH 7.4'te düşük çözünürlüğe ve yüksek LogD değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca insan karaciğer mikrozomlarındaki stabilitesinin kabul edilebilir olduğu bulgulanmıştır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirilip Bileşik 36'nın moleküler etki mekanizmasının belirlenmesi için ileri biyolojik çalışmalar yürütülmeye devam etmektedir.

KAYNAKÇA

[1] İnternet: Global Cancer Observatory. (2021). Globocan 2020 Turkey. Retrieved from Web: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>, Son Erişim Tarihi: 14.06.22.

[2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

[3] Aydın A, Akkurt M, Turanlı S, Banoğlu E, Özçelik N. Crystal Structure and Hirshfeld Surface Analysis of 1-(4-Chloro-phenyl)-5-{4-[(2-methylphenyl)methoxy]phenyl}-1H-Pyrazole. X-Ray Structure Analysis Online. 2021;37:77-79.

[4] Aydın A, Akkurt M, Turanlı S, Lengerli D, Banoğlu E, Özçelik N. Crystal structure and Hirshfeld surface analysis 4-(4-chlorophenyl)-5-methyl-3-{4-[(2-methylphenyl)methoxy]phenyl}-1,2-oxazole. Acta Crystallographica Section E-Crystallographic Communications. 2021;77:346-356.

[5] Aydın A, Turanlı S, Akkurt M, Banoğlu E, Özçelik N. 1-(4-klorofenil)-3-metil-5-{4-[(2-metilfenil)metoksi]fenil}-1H-pirazol'ün Kristal Yapısı ve Hirshfeld Yüzey Analizi. Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi. 2022;10(1):128-138.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 215S015 ve BİDEB) tarafından desteklenmiştir.

2019-nCoV VİRÜSÜNE KARŞI ETKİLİ OLABİLECEK MOLEKÜLLERİN İLAÇ YENİDEN YAPILANDIRMA VE MAKİNE ÖĞRENİM YAKLAŞIM YÖNTEMLERİ İLE SAPTANMASI

S7

Ersin GÜNER¹, Özgür ÖZKAN², Süreyya ÖLGEN¹

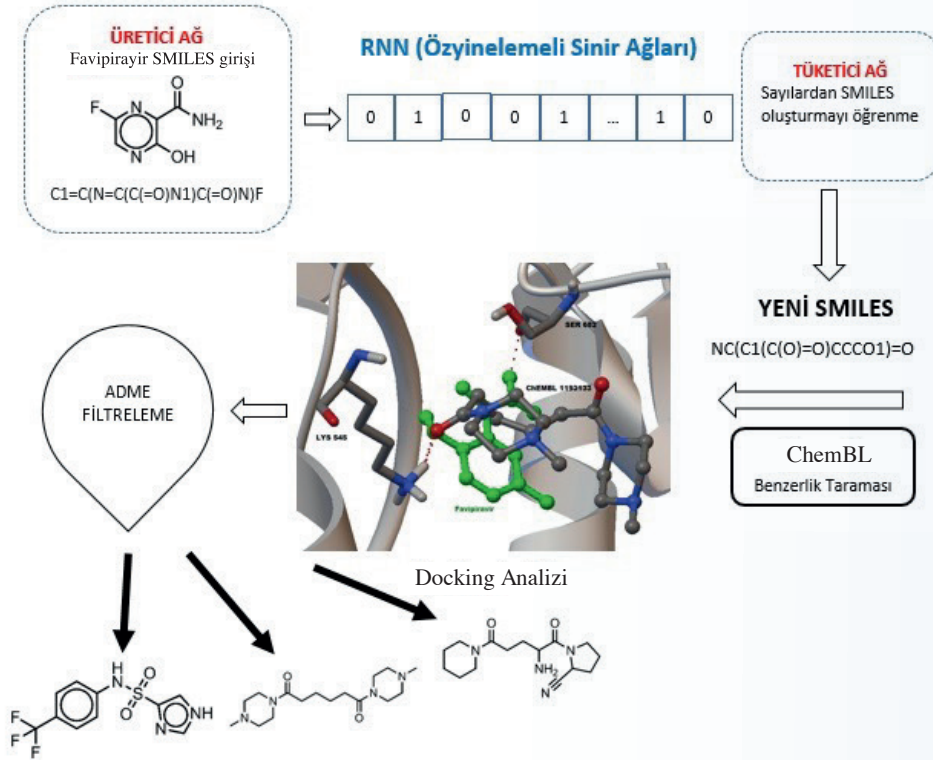
¹ Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34010 Topkapı, İstanbul, Türkiye

² Teknokent Arı, Pinticks Yazılım Şirketi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Reşitpaşa Mah. Katar Caddesi, No:4/B204 Sarıyer, İstanbul, Türkiye

(e-posta: 180813001@st.biruni.edu.tr)

GİRİŞ

Tez kapsamında virüsün hızla yayılmasını ve kendi kendine replikasyonunu önlemek için Sars-CoV-2'nin yeni inhibitörlerinin bulunması hedeflendi. İnhibitör tasarlamak için derin öğrenme yöntemi kullanılarak RdRp inhibitörü olarak kullanılan Favipiravir'e benzer moleküller üretilmesi hedeflendi. Bu amaçla, SMILES temsilleri kullanılarak Favipiravir'e benzer molekül üretmek için Eğitilmiş Yapay Sinir Ağları kullanıldı (Şekil 1). Moleküler yerleştirme çalışmaları kullanılarak moleküllerin RdRp'ye bağlanma özellikleri incelendi. Bu bileşikler ayrıca Sars-CoV-2 yaşam döngüsü için bir diğer önemli enzim olan 3CLpro'ya karşı da test edildi. Favipiravir'den daha iyi bağlanma enerjilerine ve RMSD değerlerine sahip bileşikler, RdRp ve 3CLpro inhibitör aktivitelerine sahip benzer yapıları bulmak için ChEMBL ilaç veri tabanında benzerlik analizi ile arandı. Benzerlik araştırması, üretilen moleküllere yapısal olarak benzer yeni 220 potansiyel RdRp ve 3CLpro inhibitörü buldu ve bu bileşikler, moleküler yerleştirme çalışmaları ile reseptör etkileşimleri açısından tekrar değerlendirildi. Bileşiklerin, RdRp proteaz'a karşı 3CLpro'dan daha iyi etkileşim gösterdiği bulundu. Bu sonuç, yapay zekanın daha spesifik olarak RdRp inhibitörleri olarak hareket eden favipiravire benzer yapıları doğru bir şekilde ürettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca RdRp ile en iyi etkileşimi gösteren moleküllere Lipinski kuralları uygulanmış ve potansiyel ilaç adayı olarak 6 bileşik belirlenmiştir.



Şekil 1 Makine öğrenimi, yerleştirme, benzerlik arama ve filtreleme özellikli analiz yöntemlerinin şematik bir gösterimi.

GEREÇ VE YÖNTEM

RNN (recurrent nöronal network) kullanılarak yapay zekanın ChEMBL ve ZINC gibi bileşik kütüphanelerdeki moleküller kullanılarak SMILES karakterlerini öğrenerek yeni molekül türetmesi sağlandı [1] (Tablo 1). Yapay zeka tarafından üretilen 75 molekül, Autodock 4.2.6 yazılımı kullanılarak Sars-CoV-2 yaşam döngüsünde önemli enzimler olan RdRp (Pdb ID: 7AAP) [2] ve 3CLpro (Pdb ID: 7TLL) [3] enzimleri ile etkileşimleri değerlendirildi (Tablo 2, Tablo 3). Proteinin ligand bağlanma yöresinde, bileşikler ile RdRp inhibitör ligandin üstüste karşılaştırıldığı 3D protein-ligand kompleksinin görüntülerini elde etmek için, PMW 1.5.6 moleküler modelleme programı kullanıldı.

Benzerlik Araştırması

Yapay zekanın oluşturduğu bu moleküllerden, doking sonuçlarına göre bağlanma enerjileri ve RMSD değeri favipiravir'den daha iyi olanlara ChEMBL ilaç veri bankası üzerinden benzerlik taraması yapıldı.

Bu amaçla ilk olarak <https://www.urlencoder.org/> web sitesi kullanılarak, yapay zeka tarafından üretilen moleküllerin SMILES kodları ChEMBL veri tabanında smiles kod olarak taranabilmesi için yeniden kodlandı.

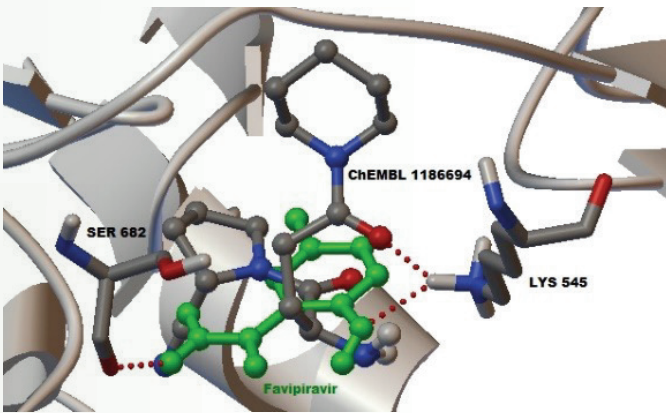
İkinci aşama olarak ChEMBL web hizmeti kaynaklarından molekül benzerliği araması ile <https://www.ebi.ac.uk/chembl/api/data/similarity.json?limit=1000&offset=0&similarity=40&smiles=> web adresi üzerinden yeniden kodlanan SMILES kodlar girilerek ChEMBL veri bankasından benzerlik taraması yapıldı. Daha sonra çıkan sonuç Json dosya formatında kaydedildikten sonra <https://json-csv.com/> web servis sağlayıcı üzerinden xml dosya formatına çevrildi (Tablo 4). Benzer olarak bulunan 220 molekül moleküller yeniden doking çalışmaları ile değerlendirildi (Tablo 5 ve Tablo 6).

İlaç Benzerlik Özellikleri İçin Filtreleme

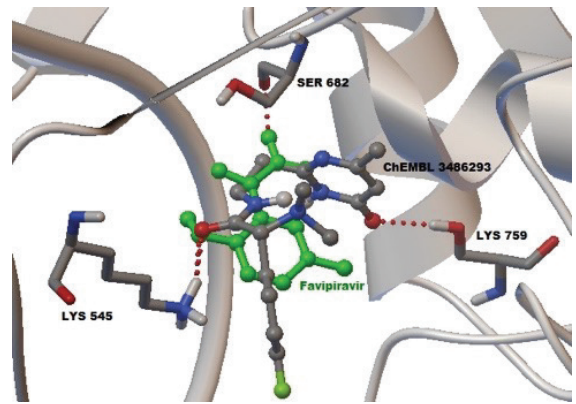
Doking sonuçlarına göre bağlanma enerjileri ve RMSD değeri Favipiravir'den daha iyi olan moleküller skorlanarak ayrılmış, daha sonra da Lipinski kuralına göre ikinci bir eleme yapıldı (ALogP:0-3, HBD 5'ten az, HBA 10'dan az, MW 290-500, PSA 140 A°'den az, dönebilen bağ sayısı 10'dan az).

BULGULAR VE TARTIŞMA

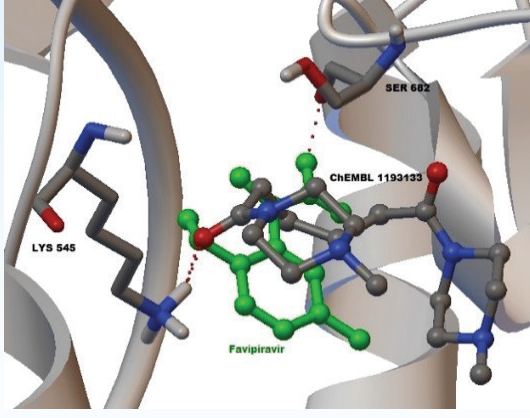
Aktif yöre aminoasitleri ile bağ yapan bileşiklerin ve favipiravir'in bağlanma enerjisi olan -6.93 kcal/mol'den daha düşük bağlanma enerjisi ile bağlandığı bulunmuştur. Şekil 2'de de görüldüğü gibi, aktif bölgeye bağlanan bileşikler, referans bileşik favipiravir ile aynı reseptör bölgesi ile etkileşime girmektedir. Reseptör etkileşimi ve ADME özellikleri en iyi olarak saptanan bu 6 bileşik daha sonra sentezlenecek ve antiviral aktivitesi tayin edilecektir.



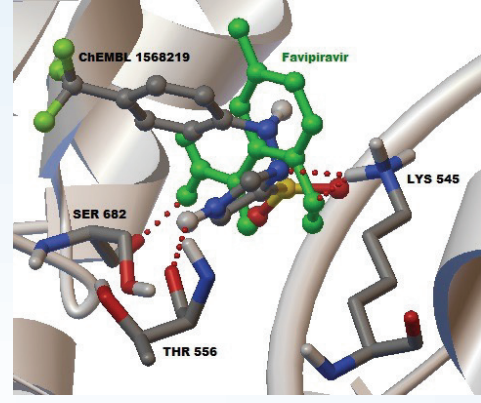
ChEMBL 1186694



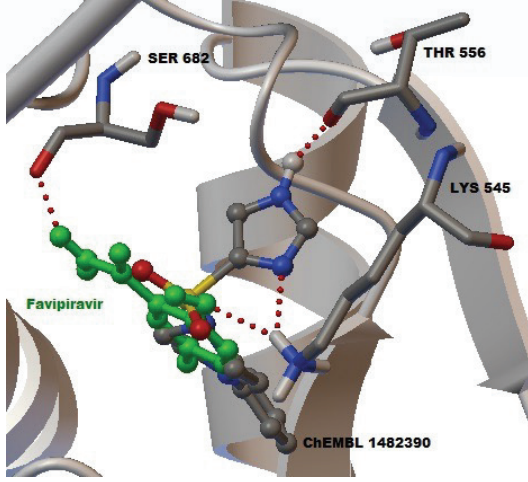
ChEMBL 3486293



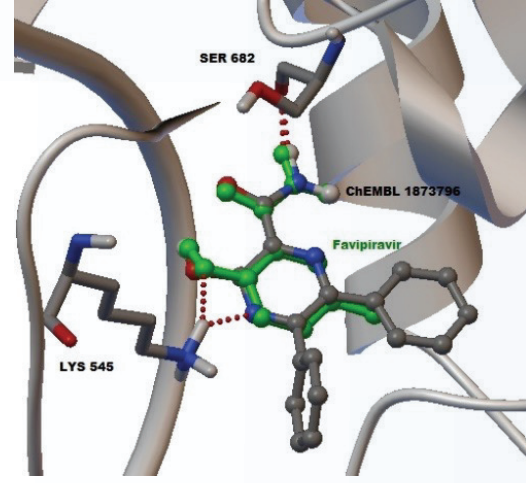
ChEMBL 1193133



ChEMBL 3486293



ChEMBL 1482390



ChEMBL 1873796

Şekil 2 RdRp proteinaz'a karşı ChemBL1186694, ChemBL3486293, ChemBL1193133, ChemBL1568219, ChemBL1482390 ve ChemBL1873796 bileşiklerinin en iyi yerleştirilmiş pozlarının etkileşimi (Favipiravir: yeşil; Bileşikler: top-çubuk, atom renklerine göre).

KAYNAKÇA

[1] Kotsias, P., Arús-Pous, J., Chen, H., Engkvist, O., Tyrchan, C., & Bjerrum, E. (2019). Direct Steering of de novo Molecular Generation using Descriptor Conditional Recurrent Neural Networks (cRNNs). ChemRxiv. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.9860906.v2>

[2] Naydenova, K., et al (2021). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(7), e2021946118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021946118>

[3] Greasley, S. E., et al. (2022). The Journal of biological chemistry, 298(6), 101972. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101972>

YENİ PLATELET İNHİBİTÖRÜ TUZLARIN İLAÇ ETKİN MADDESİ OLARAK GELİŞTİRİLMESİ VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

S8

Harun USLU^{1,2*}, Basri SATILMIŞ³, Ayşe Burçin UYUMLU³, Begüm Nurpelin SAĞLIK^{4,5}, Serkan LEVENT^{4,5}, Yusuf ÖZKAY^{4,5}, Metin Fikret GENÇ⁶, Kadir BATÇIOĞLU³, Suat KAMIŞLI⁷, Kadriye BENKLİ^{2,4,8}

1 Fırat Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, 23119 Elazığ.

2 İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 44280 Malatya.

3 İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 44280 Malatya.

4 Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir.

5 Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarı, 26470 Eskişehir.

6 İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, 44280 Malatya.

7 İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı, 44280 Malatya.

8 Badakbaşı Eczanesi Altıntepe Caddesi Köknarlı 6/C Maltepe, 34840, İstanbul.

(e-posta: huslu@firat.edu.tr)

GİRİŞ

Aterotrombotik vasküler hastalık, önemli bir morbidite ve her yıl yaklaşık 17 milyon hastayı öldüren mortalite nedenidir ve bu sayı sürekli olarak artmaktadır aynı zamanda, batı ülkelerindeki tüm ölüm sebeplerinin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır [1, 2]. Trombositler, aterotromboz patogenezinde temel rol oynadığından dolayı farmasötik araştırmalar antitrombosit ilaçların geliştirilmesine odaklanmıştır [3-5].

Diabetes mellituslu hastalarda ölümlerin çoğunluğunu, üst üste trombüs oluşumu ile aterosklerotik lezyon bozulması olarak tanımlanan aterotromboz oluşturmaktadır. Son tahminler, 2000 ve 2050 yılları arasında diyabetin küresel prevalansının %165 artacağını öngörmektedir [6-8].

Aterotrombozlu hastalar için trombosit P2Y₁₂ inhibitörleri, arteriyel trombozda trombosit P2Y₁₂ reseptörlerinin önemi nedeniyle tedavi stratejisinin merkezi bir bileşeni haline gelmiştir. P2Y₁₂ inhibitörleri, akut koroner sendromları olan hastalarda advers kardiyovasküler olay riskini etkili bir şekilde azaltır. Bununla birlikte, akut koroner sendromlu hastalar tekrarlayan aterotromboz ve mortalite riski taşımaya devam etmektedir. Ek olarak, P2Y₁₂ inhibitörlerinin kanama riskini arttırması klinik faydalarını sınırlar. Bu nedenle, P2Y₁₂ inhibitörlerinin farmakoloji ve tedavi stratejilerinde daha fazla optimizasyon gerektirdiği açıktır [9].

Son araştırmalar trombosit aktivitesinin tümör büyümesi, damar proliferasyonu ve metastatik potansiyel için de önemli olduğunu varsaymıştır. P2Y₁₂'nin inhibe edilmesinin, malign mikro çevre içindeki trombosit aktivitesinin azaltılmasını sağlayabileceğini düşündürmüştür. Araştırmalar Prasugrel kullanımının tümör oluşumu riskini azalttığını göstermektedir. Sonuç olarak, bu ilaçlar ile P2Y₁₂ yolu üzerinde yapılan çalışmaların, bu reseptörü inhibe eden ilaçların potansiyel etkinliğinde göstergeler olarak kabul edilebileceği söylenebilir [10]. Bu nedenle, Prasugrel de dâhil P2Y₁₂ reseptör antagonistlerinin, etkili antitrombotik ilaçlar olarak bu rollerine ek anti-kanser ajanları potansiyel olarak temsil edebilecekleri söylenir [11].

Birçok ilaç için çözünürlük ve çözünme oranları, in vivo biyoyararlanımı belirleyen özelliklere sahiptir, bu nedenle bu özelliklerin manipülasyonu çok önemlidir [12]. Aktif farmasötik bileşenin farmakofor yapısını değiştirmeden fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde iyileştirmenin en basit yollarından biri, tuzlar veya ko-kristaller gibi yeni katı formlar geliştirmektir. Tuz oluşturmanın ilaç endüstrisinde en çok tercih edilen yöntem olduğu ve günümüzde ilaç etkin maddelerinin %50'den fazlasının tuz olarak pazarlandığı bildirilmektedir [13]. Zayıf bazik aktif farmasötik bileşenler için inorganik asitlerle (HCl) tuz oluşumu genellikle bir ilacın biyoyararlanımı için en belirgin yoldur. Fakat örneğin HCl tuzları, parenteral formülasyonlarda yüksek asitliğe, endüstriyel ekipmanın korozyon riskine ve ortak iyon etkisine bağlı olarak midede daha az çözünürlük gibi bazı potansiyel dezavantajlara neden olmaktadır [14]. Bu sorunlardan bazıları, farmasötik olarak kabul edilebilir karboksilik asitler ve diğer zayıf bazik aktif farmasötik bileşenlerle kararlı kristal/tuz formları oluşturabilen organik bileşikler kullanılarak önenebilir [15].

Tüm bunların ışığında bu doktora tezi kapsamında, klinikte kullanılmakta olan Prasugrel'in farklı tuzlarının sentezlenmesi, bu bileşiklerin antiplatelet aktivitelerinin in vitro araştırılması ve diyabette artan ateroskleroza etkisini anlayabilmek için diyabetik ve nondiyabetik hayvanlarda in vivo-ex vivo antiplatelet aktivitelerinin karşılaştırılması ayrıca tiyeniopridin türevlerinin kanıtlanmış antikanser etkileri göz önüne alınarak sentezlenen bu tuzlarda in vitro antikanser etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Prasugrel ile uygun karşıt iyonlar kuru aprotik solvan içerisinde, ışıktan korunarak literatüre uygun reaksiyona sokularak [16] trans-1,2-Sikloheksandikarboksilik asit (1a), Maleik asit (2a), Sitrik asit (3a), Trometamol (4a) ve Oksalik asit (5a) tuzları sentezlenmiştir.

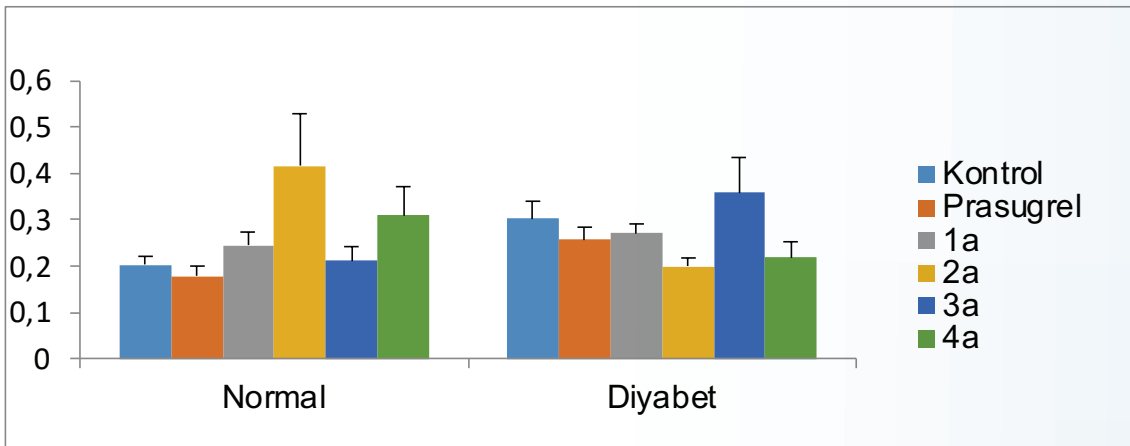
Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Prasugrel tuzlarının in vitro antiplatelet ve antikanser aktiviteleri araştırılmış ve diyabette artan ateroskleroza etkisini anlayabilmek için diyabetik ve nondiyabetik hayvanlarda in vivo-ex vivo antiplatelet aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Ex vivo ölçümlerde Chrono-Log agregometre cihazı ile sitratlı tam kanda antiagregan aktivite belirlenmiştir. Trombosit aktivasyon yolağında yer alan bileşenlerin, serumdan ve tam kandan izole edilen trombositlerde ELISA tekniği ile ölçümü yapılmıştır. In vitro antiplatelet ve antikanser çalışmalarında ELISA kitleri kullanılmıştır.

Bileşiklerin in vivo-ex vivo antiplatelet aktivite tayinleri İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2013/A-39 sayılı etik kurul onayı alınarak yapılmıştır. 8 aylık Wistar Albino cinsi ağırlıkları 215 ± 35 g olan ratlar her kafeste 10 rat bulunacak şekilde gruplandırılmış ve ad libitum beslenmiştir. 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde gün içi aydınlık/karanlık periyodu uygulanmıştır. Çalışma ana hatlarıyla iki temel hayvan grubu ve bu gruplar bünyesinde yer alan alt grupları kapsamaktadır. Temel gruplar nondiyabetik ve diyabetik gruplardır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Prasugrel'in trans-1,2-Sikloheksandikarboksilik asit (1a) maleik asit (2a), Sitrik asit (3a) ve Trometamol tuzları (4a) ile baz Prasugrel'in deney hayvanlarına uygulanması sonucu elde edilen veriler istatistiksel sonuçlarla beraber özet tablo halinde aşağıda verilmiştir. In vivo-ex vivo plateletçe zengin plazma (PRP) kullanılarak gerçekleştirilen antiplatelet aktivite çalışmalarında, ADP ile gerçekleştirilen uyarımlarda kollajen için olduğu gibi trombosit agregasyonu diyabetik grupta daha şiddetli gerçekleşmiştir. Nondiyabetik grupta Prasugrel ve diğer tüm tuzlar etkili bulunmuştur, diyabetik grupta da benzer şekilde etki gözlenmiş ancak 4a Prasugrel'e göre daha zayıf etkili iken 2a ve 3a güçlü etki gösteren tuzlar olmuştur (Tablo 1).



Şekil 1 ELISA-VASP(ng/ml) Ölçüm Sonuçları.

VASP için nondiyabetiklerde bileşik 2a anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 1). In vitro antiplatelet ve antikanser çalışmalarında standartlarla yapılan karşılaştırmada aktivitelerin daha düşük olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4 PRP Optik Agregasyon (%Agr) Ölçüm Sonuçları.

	Bileşik	R	Ortalama	Değişim (%)	N	Ortalama	Değişim (%)
Kollajen	Kontrol	10	16.9 ± 5.012 ^{b,c,d,e,f,h,i,k,m}		10	42.1	
	Prasugrel	10	3.1 ± 0.3145 ^a	-81.6568	8	50.4	-79.9242
	1a	10	2.1 ± 0.1 ^a	-87.5740	10	14.1	-82.4242
	2a	10	4.6 ± 0.4269 ^a	-72.7811	10	24.8	-85.1515
	3a	10	3.7 ± 0.5385 ^a	-78.1065	10	20.3	-86.3636
	4a	10	2.3 ± 0.1528 ^a	-86.3905	10	18.9	5.4545
ADP	Kontrol	10	11.3 ±		10	12.5	
	Prasugrel	10	2.9 ± 0.4069 ^a	-74.3363	8	12.2	-94.1489
	1a	10	2.7 ± 0.2603 ^a	-76.1062	10	11.6	-91.2766
	2a	10	2.6 ± 0.6 ^{a,n}	-76.9912	10	14.9	-95.3191
	3a	10	4 ± 0.5774 ^a	-64.6018	10	13.3	-95.5319
	4a	10	2.3 ± 0.1528 ^{a,n}	-79.6460	10	8.8	-81.2766
Epinefrin	Kontrol	10	6.9 ± 0.9939 ^{c,d,g}		10	16.5	
	Prasugrel	10	5.3 ± 0.5385 ^{c,m}	-23.1884	8	16.5	-26.5267
	1a	10	12.4 ± 1.4079 ^{a,b,e,f,k,n}	79.7101	10	20.5	-32.8244
	2a	10	14.3 ± 1.6803 ^{a,f,h,i}	107.2464	10	45.2	-54.9618
	3a	10	6.5 ± 1.0028 ^{c,g}	-5.7971	10	11.1	-19.8473
	4a	10	6.8 ± 1.5333 ^{c,d,g}	-1.4493	10	25	-51.9084

Normal ^aKontrol ile, ^bPrasugrel ile, ^c1a ile, ^d2a ile, ^e3a ile, ^f4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

Diyabet ^eKontrol ile, ^hPrasugrel ile, ⁱ1a ile, ^k2a ile, ^m3a ile, ⁿ4a ile karşılaştırıldığında p<0,05

SONUÇLAR

Genel anlamda in vivo-ex vivo çalışmalara bakıldığında bileşik 2a ve 3a etkili Prasugrel tuzları olarak görülmüştür. Prasugrel maleat (2a) ve Prasugrel sitrat'ın (3a) diğer tuzlardan olan Prasugrel trans-1,2-siklohesan dikarboksilat'a (1a) göre daha polar yapıda oluşu, muhtemelen Prasugrel'in suda çözünmeyen yapısını daha çözünür hale getirdiğinden, aktif metabolitine biyotransformasyonunu kolaylaştırarak daha yüksek antiplatelet aktivite görülmesine neden olmuştur. Günümüzde sitratlı hematoloji test tüpleri içinde antikoagülan olarak kullanılan sitrik asitten elde edilen Prasugrel sitrat'ın (3a) deney sonuçları beklendiği üzere yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu tuzlar ile daha ileri çalışmalar yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y, Stroke AHASC. Heart disease and stroke statistics - 2008 update - A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117:E25-E146.
- [2] Sugidachi A, Asai F, Yoneda K, Iwamura R, Ogawa T, Otsuguro K, Koike H. Antiplatelet action of R-99224, an active metabolite of a novel thienopyridine-type G(i)-linked P2T antagonist, CS-747. *Brit J Pharmacol*. 2001;132:47-54.
- [3] Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA, Jennings LK. Advances in Antiplatelet Therapy: Agents in Clinical Development. *Am J Cardiol*. 2009;103:40a-51a.
- [4] Xiang YZ, Kang LY, Gao XM, Shang HC, Zhang JH, Zhang BL. Strategies for antiplatelet targets and agents. *Thromb Res*. 2008;123:35-49.
- [5] Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemostasis*. 2008; 99:480-486.
- [6] Peterson ED, Spertus JA, Cohen DJ, Hlatky MA, Go AS, Vickrey BG, Saver JL, Hinton PC. Vision and creation of the American Heart Association pharmaceutical roundtable outcomes research centers. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2009;2(6):663-670.
- [7] Morel O, Kessler L, Ohlmann P, Bareiss P. Diabetes and the platelet: Toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis. *Atherosclerosis*. 2010;212(2):367-376.
- [8] Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New Engl J Med*. 1998;339(4):229-234.
- [9] Thomas MR, Storey RF. The future of P2Y12 receptor antagonists. *Platelets*. 2015;26:392-398.
- [10] Benkli K. PO-35 - Designing of the new antithrombotic and also anticancer gold complexes. *Thromb Res*. 2016;140: S189.
- [11] Ballerini P, Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. P2Y12 Receptors in Tumorigenesis and Metastasis. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9.
- [12] Bannigan P, Durack E, Madden C, Lusi M, Hudson SP. Role of Biorelevant Dissolution Media in the Selection of Optimal Salt Forms of Oral Drugs: Maximizing the Gastrointestinal Solubility and in Vitro Activity of the Antimicrobial Molecule, Clofazimine. *ACS Omega*. 2017;2:8969-8981.
- [13] Guillyory JK. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use Edited by P. Heinrich Stahl and Camile G. Wermuth. VHC, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, Switzerland, and Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2002. ISBN 3-906390-26-8.
- [14] Li S, Wong S, Sethia S, Almoazen H, Joshi YM, Serajuddin AT. Investigation of solubility and dissolution of a free base and two different salt forms as a function of pH. *Pharmaceutical research*. 2005;22:628-635.
- [15] Biswas N. Chapter 7 Solid Forms and Pharmacokinetics. *Pharmaceutical Salts and Co-crystals: The Royal Society of Chemistry*; 2012;128-153.
- [16] Asai F, Ogawa T, Naganuma H, Yamamura N, Inoue T, Nakamura K, inventors; Sankyo Company, Ltd., Japan; Ube Industries, Ltd. assignee. Tetrahydrothienopyridine derivative acid addition salts. patent; WO2002004461A1, 2002.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezi T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü ile Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından SAN-TEZ projesi kapsamında O122.STZ.2013-1 Proje numarası ile desteklenmiş ve İnönü Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir.

Bildiride adı geçen tüm hocalarıma ve ekiplerine, Erden BANOĞLU ve Arzu KARAKURT hocalarıma, ayrıca bu çalışmaya maddi destek veren kurum ve kuruluşlara teşekkür ederim.

TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE FARMAKOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Zafer ŞAHİN^{1,6}, Sevde Nur BİLTEKİN², Leyla YURTTAŞ³, Barkın BERK¹, Yağmur ÖZHAN⁴, Hande SİPAHİ⁴, Zhan-Guo GAO⁵, Kenneth A. JACOBSON⁵, Şeref DEMİRAYAK¹

¹ İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34815 İstanbul.

² İstanbul Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 34815 İstanbul

³ Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir

⁴ Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı, 34755 İstanbul

⁵ Ulusal Sağlık Enstitüsü, NIDDK, Biyoorganik Kimya Laboratuvarı, Moleküler Tanıma, Bethesda, MD 20892-0810, ABD

⁶ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34668 İstanbul

(e-posta: zafer.sahin@sbu.edu.tr)

GİRİŞ

Pürin ve pirimidin heterosiklik halkaları, nükleotitlerin yapısında yer alan önemli bir kimyasal gruptur. Adenin, guanin, sitozin, urasil ve timin gibi pürin ve pirimidin bazlarının hem kendilerinin, hem de fosfatlı yapılarının çeşitli reseptörler üzerinde fonksiyonları mevcuttur. Bu maddelerin kendileri dolaşımda uzun süre kalmadıklarından ilaç olarak kullanılamazlar. Ancak bu bileşikler temel alınarak pürin ve pirimidin reseptörleri ilaç hedefleri olarak ele alınmıştır [1]. Pirimidin bazlarının alt grubu olan tiyourasil ve tiyositozin, farmakolojik çeşitliliğe sahip önemli heterosiklik farmakoforlardır. Antitümör ve antiviral aktivite yaygın olarak tiyoürasil ve tiyositozin türevleri ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanında, yakın zamanda yapılan çalışmalarda adenzin reseptör afinitesi için üzerinde çalışılmış moleküller bulunmaktadır. Bu kapsamda iki grupta 33 yeni bileşik (24 tiyourasil türevi (4a-x) ve 9 tiyositozin türevi (5a-i)) sentezlenmiştir. Tüm bileşiklerin antitümör aktivitesi U87 MG glioblastoma hücre hattında belirlenmiş, sitotoksikite testi ise HEK293 insan sağlıklı böbrek hücrelerinde yapılmıştır. In vitro proliferasyon testinde yüksek etkinlik gösteren 11 bileşik, NIH (Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü) 'te adenzin reseptör bağlanma testine tabi tutulmuştur. Son olarak, U87MG üzerinde etkili iki bileşik fosfodiesteraz enzim testine tabi tutulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

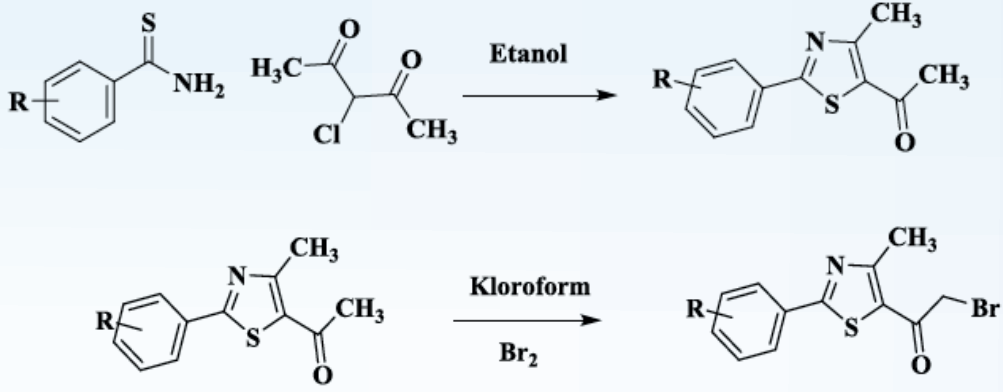
Çalışmada kullanılan malzeme, kimyasal ve ekipmanlar, deneylerin yapıldığı İstanbul Medipol Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Yeditepe Üniversitesi Toksikoloji Anabilim Dalı ve NIH NIDDK moleküler tanıma laboratuvarlarında temin edilmiş ve kullanılmıştır.

Yöntem

Sentez

1-(4-Metil-2-(4'-sübstitüefeniltiyazol-5-il) etan-1-on türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem A)

Hantzsch yöntemine göre uygun tiyoamidin (300 mmol) absölu etanoldeki sıcak çözeltisine 3-kloro-2,4-pentandion (330 mmol) eklenir (Şekil 4.1) ve 8 saat kaynamaya bırakılır. Reaksiyonun tamamlandığı İTK ile kontrol edildikten sonra soğumaya bırakılır, soğuk suya dökülür ve sodyum asetat ile nötrale edilir. Çökelek süzülerek alınıp kurutulduktan sonra etanolden kristallendirilir [2].



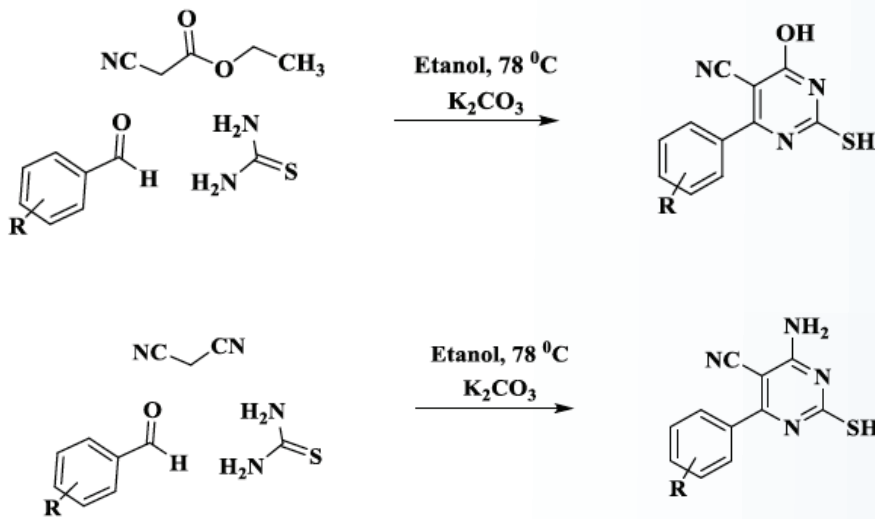
Şekil 1 2-Bromo-1-(4-metil-2-(4'-sübstüüfeniltiyazol-5-il) etan-1-on türevlerinin genel sentez yöntemi.

2-Bromo-1-(4-metil-2-(4'sübstüüfeniltiyazol-5-il) etan-1-on türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem B)

Hantzsch yöntemine göre uygun tiyoamidin (300 mmol) absöü etanoldeki sıcak çözültisine 3-kloro-2,4-pentandion (330 mmol) eklenir (Şekil 4.1) ve 8 saat kaynamaya bırakılır. Reaksiyonun tamamlandığı İTK ile kontrol edildikten sonra soğumaya bırakılır, soğuk suya dökülür ve sodyum asetat ile nötrale edilir. Çökelek süzülerek alınıp kurutulduktan sonra etanolde kristallendirilir [2].

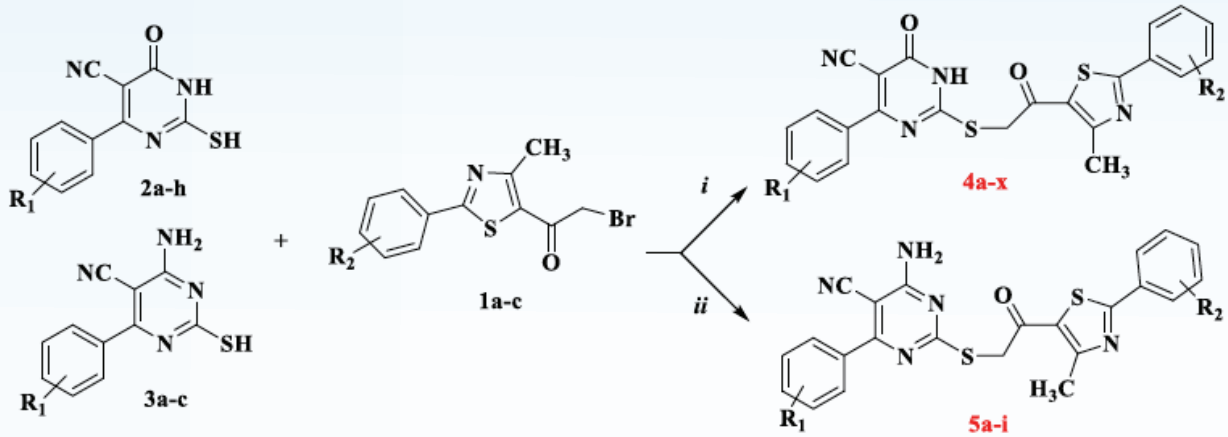
Uygun 1-(4-metil-2-(4'sübstüüfeniltiyazol-5-il)etan-1-on türevi (200 mmol) kloroformda çözüdür ve reaksiyon ortamı O OC'ye getirilir. 10 dakika karıştıktan sonra üzerine damla damla kloroform içinde çözünmüş brom (200 mmol) ilave edilir (Şekil 1). Ardından 12 saat oda sıcaklığında karıştırlır. Gerekirse ısıtılarak bir süre daha karıştırlır. Reaksiyonun tamamlandığı İTK ile kontrol edildikten sonra sodyum bikarbonat çözültisi ilave edilerek 10 dakika karıştırlır. Fazlar ayrılır ve sulu kısım kloroform ile tekrar ekstre edilir. Organik fazlar sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra çözücü düşük basınçta uçurularak ürün elde edilir [3].

2-Merkapto-4-hidroksi-6-sübstüüfenilpirimidin-5-karbonitril türevlerinin genel sentez yöntemi (Yöntem C-D)



Şekil 2 Siyanotiyourasil ve siyanotiyositidin halkalarının sentez yöntemi.

Uygun aldehit (100 mmol), tiyöüre (100 mmol) ve etil siyanoasetat (100 mmol) susuz etanolde (100 ml) çözündürülür ve potasyum karbonat ilave edilir (Şekil 2). Reaksiyon 16 saat kaynatıldıktan sonra soğutulur. Çöken ürün 0,5 M NaOH çözeltisinde çözündürülür. 3 defa etil asetat ile ekstre edilerek yıkanır. Daha sonra yavaş 1M HCl ilavesiyle pH 2'ye getirilir ve ürünün çökmesi sağlanır. Ürün etanolden kristallendirilir [4,5].



Şekil 3 1-(4-Metil-2-(4'substitüfeniltiyazol-5-il) etan-1-on türevlerinin eldesi
(i: aseton, K₂CO₃, r.t. 12 h, reflüks 1h, ii: aseton, K₂CO₃, r.t. 8 h, reflüks 1h).

Yöntem C ve Yöntem D'ye göre elde edilen 2-merkpto-5-siyanopirimidinil türevleri (100 mmol) ile Yöntem B'ye göre elde edilen tiyazolil asetilbromür bileşikleri (110 mmol) asetonitril içinde çözündürülür ve potasyum karbonat (100 mmol) ilave edilir (Şekil 3). Reaksiyon oda sıcaklığında 12 saat karıştırılır. Bu sürede tamamlanmadıysa reaksiyon 1 saat kaynatılır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oda sıcaklığında soğuk suya dökülür. Ürünün iyice çökmesi beklenir. Bu sırada potasyum karbonatın suda iyice çözünmesi sağlanmalıdır. Çöken ürün süzülerek alınır. 1-24 bileşikler %80 DMSO (Dimetil sülfoksit) - %20 su karışımından, 25 - 33 bileşikler ise etanolden kristallendirilir. Elde edilen sonuç ürünleri 1 gece 45 OC'de fosfor pentaoksit (P₂O₅) bulunan vakum etüvünde tutularak analizler öncesi tamamen kuruması sağlanır [4,6]

Bileşiklerin yapıları, erime derecesi, ¹H ve ¹³C NMR, ve HRMS ile karakterize edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik etki taramaları, U87MG hücre dizisi kullanılarak MTT yöntemiyle gerçekleştirildi [7,8].

Reseptör radyoligand testi

Adenozin reseptör A₁, A_{2A} ve A_{2B} bağlanma deneyleri radyoligand bağlanma yöntemiyle gerçekleştirildi [9].

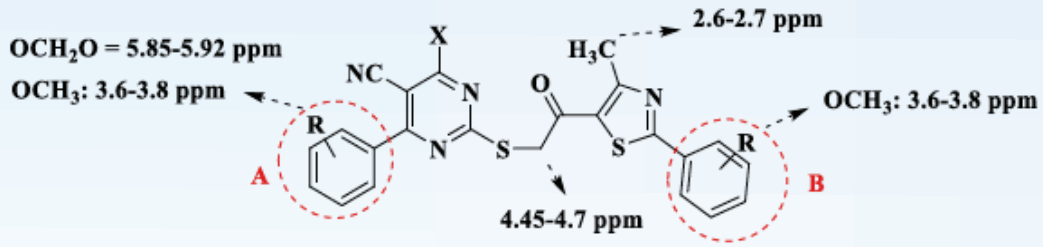
Enzim inhibisyon çalışmaları

Deneyler "PDE Activity Assay Kit" (ab139460, Abcam, Cambridge, UK) tarafından sağlanan talimatlar izlenerek Araiz ve diğerleri tarafından detaylandırılan değiştirilmiş yöntem kullanılarak yapıldı [10].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentez çalışmaları

Yöntem A'daki tiyazol türevleri, Hantzsch yöntemine göre %85-90 verimle sentezlenmiştir. Yöntem B'de elde edilen bromoasetil tiyazol türevleri, %70-80 verimle elde edilmiştir. Bu bileşiklerin sentezinde sıcaklık ve kinetik kontrolü oldukça önemli olduğu görülmüştür. Reaksiyon iyi kontrol edilmediğinde ikinci brom girişinin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Biginelli metodunun uyarlaması olarak yapılan pirimidin halka kapatmalarında (Yöntem C ve Yöntem D) urasil türevleri %65-87, sitidin türevleri ise %35-55 verimle elde edilmiştir. Sonuç bileşiklerinin sentezi (Yöntem E) ise %8-%70 aralığında verimlerle gerçekleşmiştir.

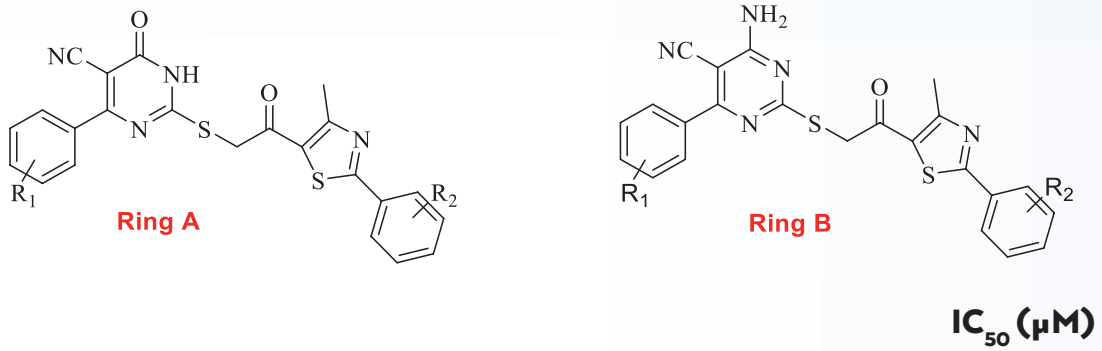


Şekil 4 Bileşiklerin 1HNMR karakterizasyon özetii.

Bileşiklerin karakterizasyonları, beklenen değerlerle uyum göstermiştir. 1H NMR özeti Şekil 4'te verilmiş olup, 13C NMR, HRMS ve IR sonuçları da uyum göstermiştir.

Antikanser etki çalışmaları

Tablo 1 HEK293 ve U87MG hücrelerinde sentezlenen bileşiklerin ve sisplatinin IC₅₀ değerleri.



Compound	Ring	R ₁	R ₂	U87MG	HEK293
4a	A	H	H	56.61 ± 0.02	93.54 ± 5.10
4b	A	3-OMe	H	59.72 ± 0.04	90.24 ± 3.63
4c	A	4-OMe	H	48.36 ± 0.01	76.24 ± 6.59
4d	A	3,4-diOMe	H	15.33 ± 0.03	91.77 ± 3.29
4e	A	3-Cl	H	28.21 ± 0.06	ND
4f	A	4-Cl	H	43.35 ± 0.05	ND
4g	A	3,4-diCl	H	65.04 ± 0.01	85,07 ± 0.33
4h	A	3,4-OCH ₂ O-	H	33.69 ± 0.02	ND
4i	A	H	4-OMe	4-OMe	EG
4j	A	3-OMe	4-OMe	4-OMe	EG
4k	A	4-OMe	4-OMe	4-OMe	EG
4l	A	3,4-diOMe	4-OMe	4-OMe	28.3
4m	A	3-Cl	4-OMe	4-OMe	<0.1
4n	A	4-Cl	4-OMe	4-OMe	6.0
4o	A	3,4-diCl	4-OMe	68.47 ± 0.02	45.60 ± 2.51

Compound	Ring	R ₁	R ₂	U87MG	HEK293
4p	A	3,4-OCH ₂ O-	4-OMe	65.28 ± 0.02	ND
4q	A	H	4-Cl	27.57 ± 0.03	ND
4r	A	3-OMe	4-Cl	40.97 ± 0.02	77.93 ± 0.41
4s	A	4-OMe	4-Cl	35.49 ± 0.03	ND
4t	A	3,4-diOMe	4-Cl	38.64 ± 0.05	ND
4u	A	3-Cl	4-Cl	40.13 ± 0.05	30.05 ± 1.92
4v	A	4-Cl	4-Cl	53.01 ± 0.01	75.07 ± 9.24
4w	A	3,4-diCl	4-Cl	83.89 ± 0.01	46.89 ± 1.72
4x	A	3,4-OCH ₂ O-	4-Cl	55.53 ± 0.01	81.44 ± 4.41
5a	B	H	H	28.95 ± 0.02	46.69 ± 4.65
5b	B	4-OMe	H	13.98 ± 0.03	ND
5c	B	4-Cl	H	10.80 ± 0.08	ND
5d	B	H	4-OMe	8.54 ± 0.04	ND
5e	B	4-OMe	4-OMe	1.56 ± 0.09	ND
5f	B	4-Cl	4-OMe	4.54 ± 0.06	39.16 ± 1.38
5g	B	H	4-Cl	11.42 ± 0.04	ND
5h	B	4-OMe	4-Cl	10.57 ± 0.04	ND
5i	B	4-Cl	4-Cl	3.42 ± 0.06	72.96 ± 2.33
cisplatin				1.67 ± 0.04	8.44 ± 0.86

(ND: Tespit edilmedi. Canlılığın 100µM konsantrasyonda 50%'den fazla olduğu anlamına gelir)

Bileşiklerin antitümör ve sitotoksik aktivitesi Tablo 1'de özetlenmiştir. Buna göre, bileşiklerin çoğu U87MG agresif glioblastoma üzerinde anti-proliferatif aktivite göstermiştir. Ayrıca, hemen hemen tüm bileşikler, sağlıklı, kanserli olmayan insan embriyonik böbrek (HEK)293 hücre hattının proliferasyonunu azaltmamış gibi görünmektedir. Genel olarak, 5b-i bileşikleri, 4d, 4j ve 4l hariç, serinin geri kalanından (4a-x) önemli ölçüde daha aktiftir. 4a-x grubundan farklı olarak, bu bileşikler (5a-i), pirimidin halkasının 4. konumunda okso yerine amino grubunu taşır. Bileşik 5a ayrıca 4 konumunda bir amino grubu içerir, ancak bileşiğin her iki ucundaki aromatik halkaları non-süstitüedir. Bu bileşik 5b-i'ye kıyasla azaltılmış inhibisyon gösterdi.

Tablo 2. MCF7’de bileşiklerin ve sisplatinin IC50 (ortalama \pm SD) değerleri.

Compound	IC ₅₀ (μ M)
4d	63.71 \pm 1.92
4l	24.02 \pm 0.95
5a	30.14 \pm 1.62
5b	27.15 \pm 0.95
5c	20.17 \pm 0.75
5d	72.12 \pm 2.33
5e	24.31 \pm 1.95
5f	11.25 \pm 0.09
5g	25.22 \pm 1.17
5h	10.09 \pm 0.03
5i	12.52 \pm 1.13
Sisplatin	2.51 \pm 0.29

Tablo 2’de, U87MG’ye karşı etkili bulunan 11 turevin MCF 7 huceleri uzerindeki etkinlikleri verilmiştir. Buna gore, bileşiklerin MCF7 uzerinde de etkinlik gosterdiği, ancak bu etkinliğin U87MG uzerindeki etki kadar yuksek olmadığı anlaşılmıştır.

Reseptör radyoligand bağlanma deneyi

Hucre kultu-runde aktif bulunan bileşiklerin adeno-zin reseptör A1 ve A2A alt tiplerine bağlanma dereceleri olcu-menmiştir. Tablo 3’te verilen bu verilere gore değerler reseptör blokörü sayılacak kadar yuksek olmamakla birlikte 1 μ M konsantrasyonda elde edilmişlerdir. A1 uzerinde en yuksek bağlanma değeri %9.99 ile bileşik 4d’dir. A2A uzerinde en yuksek bağlanma değeri ise %12.09 ile yine bileşik 4d’ye aittir. Bu değerlerden bazılarının negatif değerler olduğu goru-lmektedir. Metot, yapılışı esasıyla yer değiştirme (displacement) yontemiyle radyoligand bağlama esasına dayanır. Bu yontemde negatif (-) değerler anlamlı olmayıp, tartişma kısmında ‘O’ olarak değerlendirilecektir. Grafiğe bakıldığında bileşik 4, 12 ve 25’in A1 ve A2A alt tiplerinin her ikisinde de zayıf bağlanma gosterdiği gozlenmiştir. Diğer bileşiklerden ise 5e, 5g ve 5h yalnızca A1, 5b ve 5i ise yalnızca A2A uzerinde zayıf bağlanma gosterdiği tespit edilmiştir. Bileşik 5e’nin ayrıca A2B’de %18 lik bir değer verdiği goru-lmuştur.

Tablo 3 Sentezlenen maddeler tarafından insan A1 ve A2A reseptörü radyoligandı bağlanmasının inhibisyonu (1 uM'de, spesifik bağlanmanın yüzdesi olarak ifade edilir).

Bileşik No.	A ₁ [³ H] DPCPX	A _{2A} [³ H] ZM241385	Bileşik No.	A ₁ [³ H] DPCPX	A _{2A} /A _{2B} [³ H] ZM241385
4d	10	12	5e	9.0	-18 / 18 ^a
4l	2.5	8.5	5f	1.1	-7.1
5a	9.5	6.5	5g	8.7	-1.4
5b	-4.6	0.8	5h	1.2	-22
5c	-23	-9.9	5i	-3.7	1.8
5d	-2.8	-2.6			

Enzim inhibisyon çalışmaları

Tablo 4, PDE4 inhibisyonu için test edilen bileşiklerin IC50 değerlerini özetlemektedir. Genel bir fosfodiesteraz standardı olan 3-izobütil-1-metilsantin (IBMX), 14.31 uM'lik bir IC50 değerine sahipti. Güçlü bir PDE4B inhibitörü olan Rolipram, literatür verileriyle tutarlı olan 0.32 µM IC50 göstermiştir.

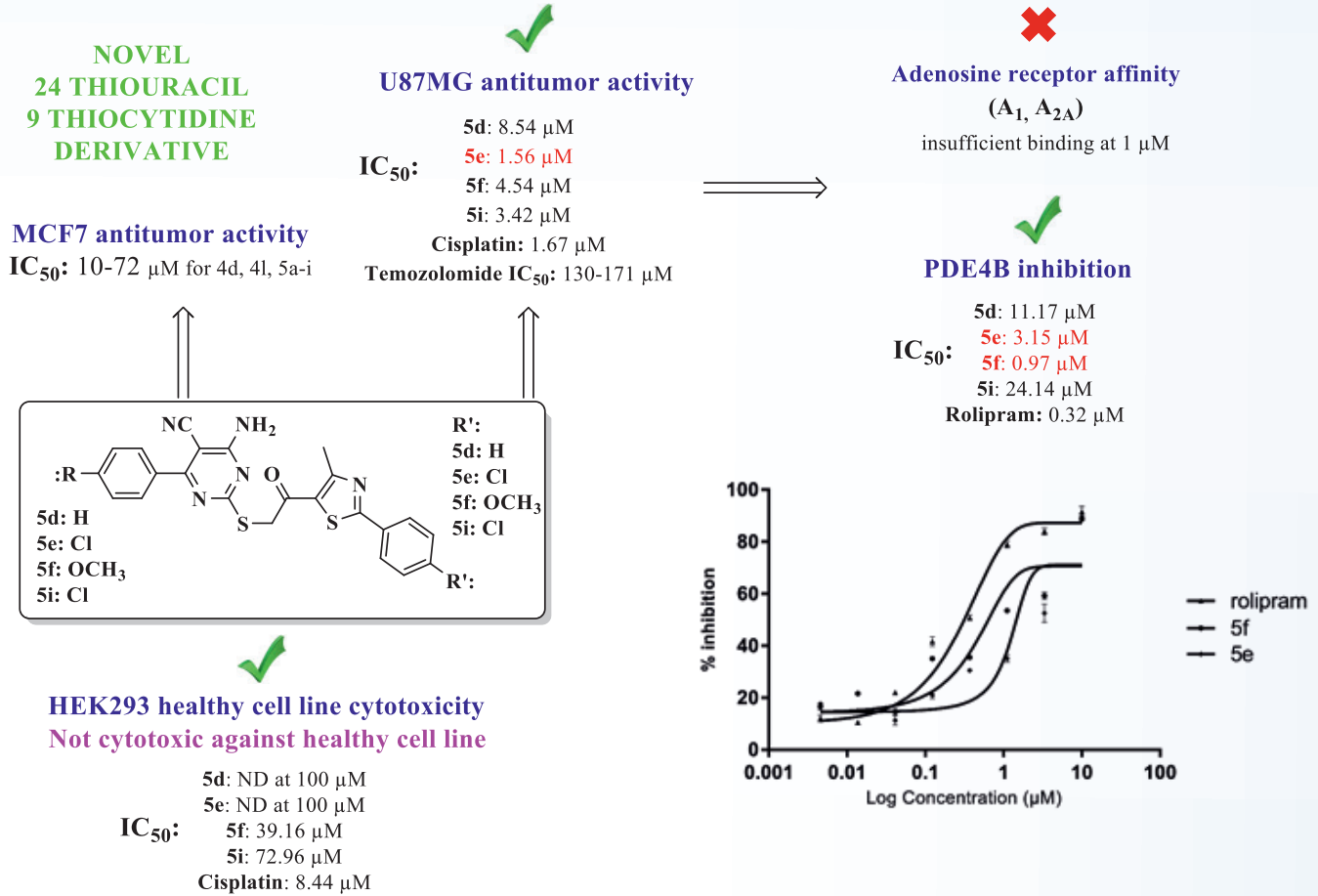
Tablo 2 MCF7'de bileşiklerin ve sisplatinin IC50 (ortalama ± SD) değerleri.

Cpd	PDE4B IC ₅₀ (µM)
4d	>100
4l	17.11 ± 0.32
5a	>100
5b	33.14 ± 0.13
5c	32.26 ± 0.37
5d	11.17 ± 0.12
5e	3.15 ± 0.12
5f	0.97 ± 0.35
5g	22.13 ± 0.56
5h	18.11 ± 0.34
5i	24.14 ± 2.15
Rolipram	0.32 ± 0.01
IBMX	14.31 ± 0.02

Bileşik 5e ve 5f, sırasıyla 3.15 μM ve 0.97 μM IC_{50} değerleri ile PDE4 üzerinde iyi güç gösterdi. Bu inhibitör potensler oldukça yüksektir, yani en güçlü PDE4B inhibitörü rolipram'a yakındır. U87MG hücrelerine karşı en aktif bileşikler ile PDE4B testinde yakın bir yazışma vardır. Bu paralellik, U87MG'de bir antitümör aktivite temeli önerme bağlamında dikkate değerdir.

SONUÇLAR

İlaç geliştirme çalışmalarında pirimidin ve tiyourasil türevlerinin önemi son yıllarda yapılan çalışmalarda açıkça ortaya konmuştur. Temozolomid ilacına karşı gelişen direnç, etkili yeni ilaçların keşfedilmesini ve glioblastoma tümörleri için kombinasyon tedavisinin geliştirilmesini teşvik etmektedir



Şekil 5 Çalışma özet şeması.

Bu makale kapsamında yapılan çalışmalar, tiyourasil ve tiyositozin türevlerinin birlikte değerlendirilmesi, biyokimyasal temellerinin araştırılması açısından önemlidir. antitümör etkisi ve yakın in vitro antitümör aktivitesinin belirlenmesi FDA onaylı ilaçlar. Ayrıca, daha ileri çalışmalar planlanmaktadır. diğer beyin tümörü hücre dizileri üzerindeki antiproliferatif aktiviteyi belirlemek, farklı sağlıklı hücre hatları, kinaz fosforilasyon seviyeleri aktif bileşiklerin mevcudiyeti ve ardından bir beyin tümörü modeli ile in vivo deneyler.

KAYNAKÇA

- [1] Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem*. 2002 Sep 12;45(19):4057-93.
- [2] Bondock S, Naser T, Ammar YA. Synthesis of some new 2-(3-pyridyl)-4,5-disubstituted thiazoles as potent antimicrobial agents. *Eur J Med Chem*. 2013 Apr;62:270-9.
- [3] Abhale YK, Deshmukh KK, Sasane AV, Chavan AP, Mhaske PC. Fused Heterocycles: Synthesis and Antitubercular Activity of Novel 6-Substituted-2-(4-methyl-2-substituted phenylthiazol-5-yl)H-imidazo[1,2-a]pyridine. *J Het Chem*, 2015. 53(1), 229-233.
- [4] Chen W, Huang YJ, Gundala SR, Yang H, Li M, Tai PC, Wang B. The first low microM SecA inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2010 Feb 15;18(4):1617-25.
- [5] Abbas SE, Aly El, Awadallah FM, Mahmoud WR. 4-Substituted-1-phenyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives: design, synthesis, antitumor and EGFR tyrosine kinase inhibitory activity. *Chem Biol Drug Des*. 2015 May;85(5):608-22.
- [6] Rami C, Patel L, Patel CN, Parmar JP. Synthesis, antifungal activity, and QSAR studies of 1,6-dihydropyrimidine derivatives. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013 Oct;5(4):277-89.
- [7] Solinas M, Massi P, Cinquina V, Valenti M, Bolognini D, Gariboldi M, Monti E, Rubino T, Parolaro D. Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and invasion in U87-MG and T98G glioma cells through a multitarget effect. *PLoS One*. 2013 Oct 21;8(10):e76918.
- [8] Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D. Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Mar;308(3):838-45.
- [9] Varano F, Catarzi D, Vincenzi F, Betti M, Falsini M, Ravani A, Borea PA, Colotta V, Varani K. Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of 2-(2-Furanyl)thiazolo[5,4-d]pyrimidine-5,7-diamine Derivatives: New Highly Potent A2A Adenosine Receptor Inverse Agonists with Antinociceptive Activity. *J Med Chem*. 2016 Dec 8;59(23):10564-10576.
- [10] Araiz C, Yan A, Betteadi L, Samuelson I, Virtue S, McGavigan AK, Dani C, Vidal-Puig A, Foukas LC. Publisher Correction: Enhanced-adrenergic signalling underlies an age-dependent beneficial metabolic effect of PI3K p110 α inactivation in adipose tissue. *Nat Commun*. 2020 Feb 21;11(1):1078.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmadaki bileşiklerin adenosin reseptör affinite ölçümleri, "NIDDK Intramural Research Program" (ZIADKO31117) projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

KARACİĞER KANSERİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNDE İNHİBİTÖR ETKİYE SAHİP, POTANSİYEL ANTİKANSER AJANLAR OLARAK YENİ İZOKSAZOL-PİPERAZİN HİBRİTLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

S10

Kübra İBİŞ¹, Esra NALBAT², Burcu ÇALIŞKAN¹, Rengül ÇETİN ATALAY², Erden BANOĞLU¹

¹ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

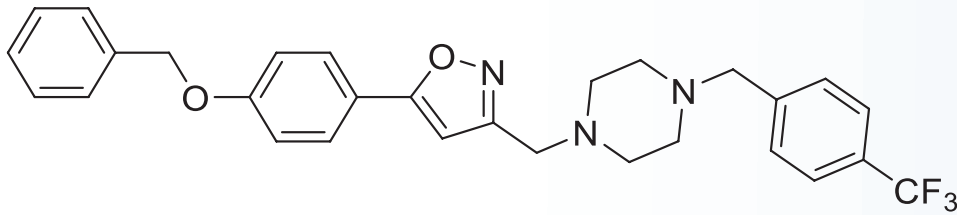
² Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Enformatik Enstitüsü, Kanser Sistem Biyolojisi Laboratuvarı, 06800 Ankara.

(e-posta: kubraibis@gazi.edu.tr)

GİRİŞ

Kanser; genetik, epigenetik ve çevresel koşulların etkisiyle tetiklenen birtakım biyolojik mekanizmalarla kontrolsüz büyüme ve çoğalma özelliği kazanmış hücrelerin, öncelikle yakın mesafedeki dokular olmak üzere vücuttaki farklı doku ve organlara metastazı ile karakterize bir hastalık tablosudur [1-2]. Küresel olarak önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan bu hastalığın dünya çapında en sık görülen 6. ve en ölümcül 2. türü olan hepatoselüler karsinoma (HSK) ise, tüm primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %75'ini oluşturan en yaygın karaciğer kanseri türüdür [3-5]. HSK'ye karşı geliştirilen yeni aday ilaç molekülleri başlangıçta iyi bir etkinlik gösterebilir de zamanla meydana gelen ilaç direnci, HSK'nin yüksek tümör heterojenitesinin kaçınılmaz bir sonucu olarak görülmekte ve bu durum ilaç geliştirme süreçlerini zorlaştırmaktadır [6]. Sorafenib'e dirençli karaciğer kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalar ise, kendi kendini yenileyebilen ve kanser hücrelerine farklılaşabilen 'kanseri kök hücreleri'nin de ilaç tedavisine karşı gelişen direncin önemli bir sebebi olduğunu ortaya koymaktadır [7-9].

Kanser tedavisinde yeni ilaç aday moleküllerini geliştirmek ve bu alanda bazı yenilikler ortaya koymak amacıyla tüm dünyada yapılan önemli araştırmalar incelendiğinde, 'izoksazol' halkası ve 'piperazin' halkası içeren bileşiklerin, farklı mekanizmalarla antikanser aktivite gösterdikleri birçok başarılı çalışma dikkat çekmektedir [10-14]. Bu kapsamda araştırma grubumuz tarafından antikanser etkili olabilecek yeni öncü bileşik keşfi amacıyla yürütülen bir tarama çalışmasında, 5-(4-(benziloksi)fenil)-3-((4-(4-(triflorometil)benzil)piperazin-1-il)metil)izoksazol kimyasal yapısında bir bileşik keşfedilmiştir (Şekil 1). BRP29 adı verilen bu bileşik karaciğer (Huh7, Mahlavu), meme (MCF7) ve kolon (HCT116) kanseri hücre hatlarına karşı test edildiğinde sırasıyla 1,7; 11,7; 2,9 ve 6,0 µM IC₅₀ değerlerinde sitotoksikite göstermiştir.



Şekil 1 Öncü bileşik BRP29'un kimyasal yapısı

BRP29'un özellikle bir HSK hücre hattı olan Huh-7'ye karşı yüksek inhibitör aktiviteye sahip olması; daha aktif türevlere ulaşabilmek için iyi bir başlangıç noktası oluşturmuştur. Bu çalışmada, BRP29'dan hareketle tasarlanarak sentezlenen tamamı orijinal 38 adet final bileşiğin yapı-etki ilişkileri incelenmiş ve bileşiklerin gösterdiği antiproliferatif etkinliğin mekanistik özellikleri aydınlatılarak sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

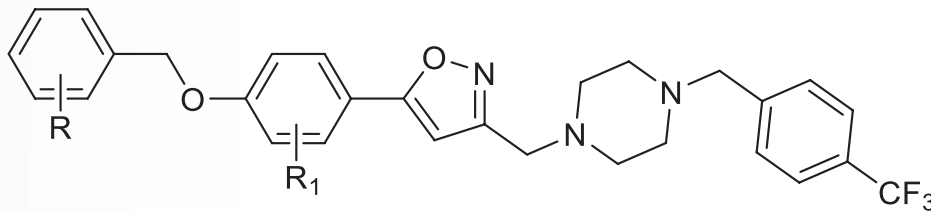
Bu çalışma kapsamında elde edilen bileşiklerin sentezleri, araştırma ekibimizce 2021 yılında yayınlanmış olan makaledeki yöntemler kullanılarak sentezlenmiştir [15]. Bileşiklerin sentezi amacıyla öncelikle; 4-hidroksi veya 4-metoksi asetofenon ve dietil okzalattan hareketle diketoester türevleri elde edilmiş; bu bileşiklerin hidroksilamin hidroklorür ile reaksiyonu sonucunda izoksazol halkası kapatılmıştır. Halka kapama işleminden sonra 4-metoksi asetofenon türevi ile sentezlenen türevlerin BBr_3 rejanı kullanılarak demetilasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, izoksazol türevlerindeki ester grubunun LiAlH_4 ile redüksiyonu sonucu alkol türevi ara başlangıç maddeleri elde edilmiştir. Alkol türevi, uygun süstitüe benzil bromür/klorür türevleri ile mikrodalga reaktöründe alkilasyon reaksiyonuna sokularak benzil süstitüe türevler elde edilmiştir. Elde edilen türevlerin PPh_3 varlığında CBR_4 ile bromlanması sonucunda (Appel reaksiyonu) bromür türevlerine veya SOCl_2 varlığında klorür türevlerine geçilmiştir. Son basamakta ise halojenür türevi ara bileşiklerin farklı amin gruplarıyla reaksiyonu sonucunda final bileşikler elde edilmiştir. Elde edilen bileşikler flash kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. HRMS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ spekturumları ve elementel analiz verileriyle yapı aydınlatma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Final bileşiklerin karaciğer (Huh7, MV) ve meme (MCF-7) kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik aktiviteleri Sulforadamin B (SRB) testi ile değerlendirilmiştir. Bileşiklerin hepatoselüler karsinomaya karşı etkinliğini değerlendirmek için; PTEN delesyonlu ve kötü huylu mezenkimal Mahlavu ve normal PTEN aktiviteli Huh7 hücrelerinde, ilgili analizler gerçekleştirilerek sonuçlar; IC_{50} değerleri ile ifade edilmiştir [16]. Elde edilen yapı-etki ilişkileri sonucunda biyolojik çalışmalar için Bileşik 26c seçilmiş ve öncü bileşik BRP29 ile kıyaslamalı olarak bileşiklerin moleküler etki mekanizmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Buna göre; bileşiklerin gerçek zamanlı sitotoksosite analizleri, hoechst boyama ile kanser hücreleri üzerinde oluşturduğu morfolojik etkilerin belirlenmesi, Western Blot yöntemi ile hücresel yollar üzerindeki etkilerin incelenmesi, hücre döngüsü üzerine etkileri ve Sphere formation assay ile kanser kök hücre çalışmaları tamamlanmıştır [8,17].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen ilk seri 18 bileşiğe ait üç farklı hücre hattındaki IC_{50} değerleri 0,1-10,6 μM değerleri arasındadır. Buradan hareketle belirlenen R grubu sabit tutularak farklı amin gruplarının (4-(triflorometil)benzil)piperazin yerine) süstitüe edildiği ikinci seri 14 bileşiğe ait IC_{50} değerleri ise 1,3-8,4 μM aralığındadır. Son seride ise uygun süstitüent kombinasyonunu birlikte içeren 6 farklı madde tasarlanarak sentezlenmiş ve en aktif türev Bileşik 26c'ye ulaşılmıştır. BRP29 ve diğer önemli aktif bileşiklerin IC_{50} değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1 Bazı önemli final bileşiklere ait IC_{50} değerleri



R_1	R_2	IC_{50} (μM)		
		Huh7	MCF7	MV
H	H	1,7	2,9	11,7
3-CN	H	0,1	0,8	10,6
3-CN	3-F	0,09	0,38	0,5

Hücresel yollar üzerindeki protein ifade analizi çalışmaları; BRP29 ve Bileşik 26c'nin apoptotik p53 ve kesilmiş PARP proteininin seviyesini ve Erk'yi artırırken, Akt yolağında önemli bir değişikliğe yol açmadığı göstermiştir. Ayrıca BRP29 ve Bileşik 26c ile inkübe edilen hücrelerin çekirdeklerinde, DNA parçalanması ile çekirdek yoğunlaşmasının arttığı ve karaciğer kanseri kök hücre hatlarıyla ilişkili biyomarkerlarda belirgin bir azalmanın meydana geldiği gözlemlenmiştir. Biyolojik bulgular ayrıntılı olarak ilgili makalemizde yayınlanmıştır [15].

SONUÇLAR

Elde edilen olumlu bulgular, benzioksifeniloksazol ve benzil/fenilpiperazin gruplarının birleştirilmesi ile oluşturulan hibrit yapının antikanser etki açısından özgün bir kimyasal iskelet olduğunu ve daha ileri klinik gelişim potansiyeline sahip olabileceğini göstermiş ve bu özgün bileşikler araştırma grubumuzca yapılan başvuru ile patentlenmiştir [18]. Bu kimyasal iskelet üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar ile ortaya çıkan yapı-etki ilişkisi sonuçlarına göre; genel olarak bu bileşik yapısına sahip bütün türevlerde önemli derecede sitotoksik etki gözlemlenmiş olup, benzioksi, orta fenil halkası ve piperazin grupları üzerindeki değişikliklerin test edilen kanser hücre hatlarına karşı aktiviteyi ve seçiciliği etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Özellikle orta fenil halkası üzerindeki süstitüsyonların test edilen her 3 hücre hattına karşı da potent sitotoksik etkinin ortaya çıkması açısından önem arz ettiği gösterilmiştir. Ayrıca en aktif türev olan Bileşik 26c'nin sadece HSK hücrelerinin proliferasyonunu değil, aynı zamanda kanser kök hücre hücrelerini de Sorafenib'e kıyasla güçlü bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Bu bakımdan Bileşik 26c daha ileri geliştirme çalışmaları açısından lider bileşik olarak belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- [2] Wallace TA, Martin DN, Ambs S. Interactions among genes, tumor biology and the environment in cancer health disparities: examining the evidence on a national and global scale, *Carcinogenesis* 2011;32:1107-1121.
- [3] Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J. Hepatol* 2012;56:1384-1391.
- [4] Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*, Lyon, 2014.
- [5] Sun B, Karin M. Obesity, inflammation, and liver cancer. *J. Hepatol* 2012;56:704-713.
- [6] Unsal H, Yakicier C, Marçais C, Kew M, Volkmann M, Zentgraf H, Isselbacher KJ, Ozturk M. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:822-826.
- [7] Chow AK, Ng L, Lam CS, Wong SK, Wan TM, Cheng NS, Yau TC, Poon RT, Pang RW. The Enhanced metastatic potential of hepatocellular carcinoma (HCC) cells with sorafenib resistance. *PloS One* 2013;8: e78675.
- [8] Kahraman DC, Hanquet G, Jeanmart L, Lanners S, Sramel P., Bohac A, Cetin-Atalay R. Quinoides and VEGFR2 TKIs influence the fate of hepatocellular carcinoma and its cancer stem cells. *MedChemComm* 2017;8:81-87.
- [9] Xin HW, Ambe CM, Hari DM, Wiegand GW, Miller TC, Chen JQ, Anderson AJ, Ray S, Mullinax JE, Koizumi T, Langan RC, Burka D, Herrmann MA, Goldsmith PK, Stojadinovic A, Rudloff U, Thorgeirsson SS, Avital I. Label retaining liver cancer cells are relatively resistant to sorafenib. *Gut* 2013;62:1777-1786.
- [10] Eccles SA, Massey A, Raynaud FI, Sharp SY, Box G, Valenti M, Patterson L, Brandon AD, Gowan S, Boxall F, Aherne W, Rowlands M, Hayes A, Martins V, Urban F, Boxall K, Prodromou C, Pearl L, James K, Matthews TP, Cheung KM, Kalusa A, Jones K, McDonald E, Barril X, Brough PA, Cansfield JE, Dymock B, Drysdale MJ, Finch H, Howes R, Hubbard RE, Surgenor A, Webb P, Wood M, Wright L, Workman P. Nvp-ay922: A novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 2008;68:2850-2860.

- [11] Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N. Drugging the cancer chaperone HSP90 combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann Ny Acad Sci.* 2007;1113:202-216.
- [12] Baruchello R, Simoni D, Grisolia G, Barbato G, Marchetti P, Rondanin R, Mangiola S, Giannini G, Brunetti T, Alloatti D, Gallo G, Ciacci A, Vesci L, Castorina M, Milazzo FM, Cervoni ML, Guglielmi MB, Barbarino M, Fodera R, Pisano C, Cabri W. Novel 3,4-isoxazolidiamides as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. *J Med Chem.* 2011;54:8592-8604.
- [13] Drysdale M, Dymock B, Finch H. Isoxazole compounds as inhibitors of heat shock proteins. *European Patent.* 2004;WO 2004/072051 A1.
- [14] Meng T, Zhang DD, Xie ZQ, Yu T, Wu SC, Wyder L, Regenass U, Hilpert K, Huang M, Geng MY, Shen JK. Discovery and optimization of 4,5-diarylisoxazoles as potent dual inhibitors of pyruvate dehydrogenase kinase and heat shock protein 90. *J Med Chem.* 2014;57:9832-9843.
- [15] İbiş K, Sinoplu E, Çalışkan B, Kahraman DC, Çetin Atalay R, Banoglu E. Synthesis and biological evaluation of novel isoxazole-piperazine hybrids as potential anti-cancer agents with inhibitory effect on liver cancer stem cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2021;221:113489
- [16] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Canc Inst.* 1990;82:1107-1112.
- [17] Durmaz I, Guven, EB, Ersahin T, Ozturk M, Calis I, Cetin-Atalay R. Liver cancer cells are sensitive to lanatoside c induced cell death independent of their pten status. *Phytomedicine.* 2016;231:42-51.
- [18] Banoğlu E, Çalışkan B, Çetin-Atalay R, Akhan-Güzelcan E, İbiş K. Antikanser aktiviteye sahip yeni izoksazol türevleri. *Türk Patent Buluş Tescil No: 2017/19951.*

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde ve tüm doktora sürecim boyunca verdikleri değerli desteklerden ötürü saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Erden Banoğlu ve Prof. Dr. Burcu Çalışkan'a, analiz çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Hakan Göker'e, biyolojik aktivite çalışmalarını gerçekleştiren Prof. Dr. Rengül Çetin Atalay ve doktorantı Esra Nalbat'a; 1001 programı ile projelendirdiğimiz (214S062) çalışmamıza verdiği desteklerden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve 100/2000 Doktora Programı kapsamında bursiyeri olduğum Yükseköğretim Kurulu (YÖK)'na teşekkür ederim.

BAZI YENİ 4-AMİNOKİNAZOLİN KARBOKSAMİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

S11

Cemre ACAR¹, Tuncagül ALTUNTAŞ¹, Hakan GÖKER¹, Arzu BEŞİKÇİ², Berna GÜVEN², İsmail ÇELİK³

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560 Ankara.

²Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 06560 Ankara.

³Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 38280 Kayseri.

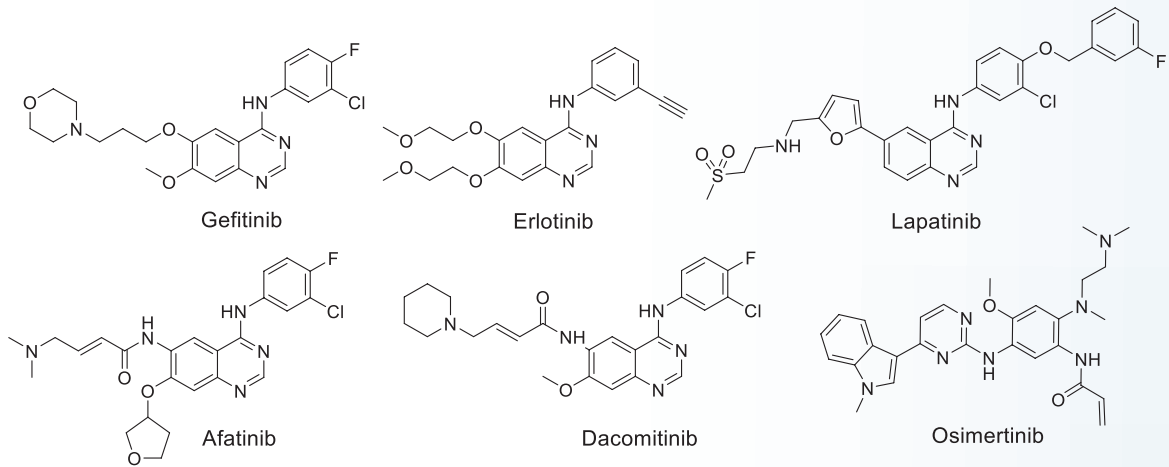
(e-posta: cemre.acar@ankara.edu.tr)

GİRİŞ

Kanser, sık görülmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle çağımızın en önemli sağlık sorunlarından biridir [1]. İlaç keşfindeki hızlı ilerlemeye rağmen, mevcut antikanser ilaçlarda etkinlik, güvenlik ve seçicilik problemi başlıca sorun olmaya devam etmektedir. Bir kemoterapi türü olan hedeflendirilmiş tedavi ile belirli genler veya proteinler hedeflenerek kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılması durdurulabilmektedir [2].

Protein kinazlar ve kanser ilişkisi, kanser araştırmalarının önemli bir kısmında yer almaktadır. Bir protein tirozin kinaz olan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), son yıllarda kanser tedavisi için bir hedef haline gelmiştir [3]. Hücre proliferasyonu, motilitesi ve adezyonu, invazyon gibi normal fizyolojik süreçlerde rol oynayan EGFR'nin, kanserli dokularda anormal davranış gösterdiği bulunmuştur. Bu nedenle hücrelerde, mutasyona uğramış veya aşırı artmış miktarlarda olduğu gözlenen EGFR, sıklıkla tümör büyümesi ile ilişkilendirilmektedir [4]. Akciğer, meme, yumurtalık, kolon, pankreas, mesane kanserleri gibi kanser türlerinde EGFR'nin yüksek düzeyde görüldüğü ve bu durumun hastalığın ilerlemesi ve metastaz ile bağlantılı olduğu bulunmuştur [5]. Bu ilişki göz önünde bulundurulduğunda, kanser tedavisi için, artmış seviyelerde görülen EGFR iyi bir hedef oluşturmakta ve EGFR'yi hedef alarak inhibe edebilen bileşikler bulunması için çaba harcanmaktadır [3, 6].

EGFR'yi inhibe etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında küçük moleküllü enzim inhibitörlerinin kullanımı ön plana çıkmıştır. Küçük moleküllü enzim inhibitörleri aracılığıyla EGFR'nin tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu ve böylelikle EGFR fonksiyonunun inhibisyonu amaçlanmaktadır [4]. 1990'lı yılların başında 4-anilinokinazolinlerin Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Tirozin Kinaz İnhibitörü (EGFR TKI) etkiye sahip olduğunun keşfedilmesinin [7] ardından bu tip ajanlarla ilgili çalışmalar hızlanmıştır ve pek çok küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörü geliştirilmiştir. Bu bileşikler arasında, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış ve kanser tedavisi için kullanılmakta olan gefitinib, erlotinib, lapatinib, afatinib, dacomitinib ve osimertinib bileşikler (Şekil 1) yer almaktadır [8, 9].



Şekil 1 FDA onaylı EGFR TKI bileşikler.

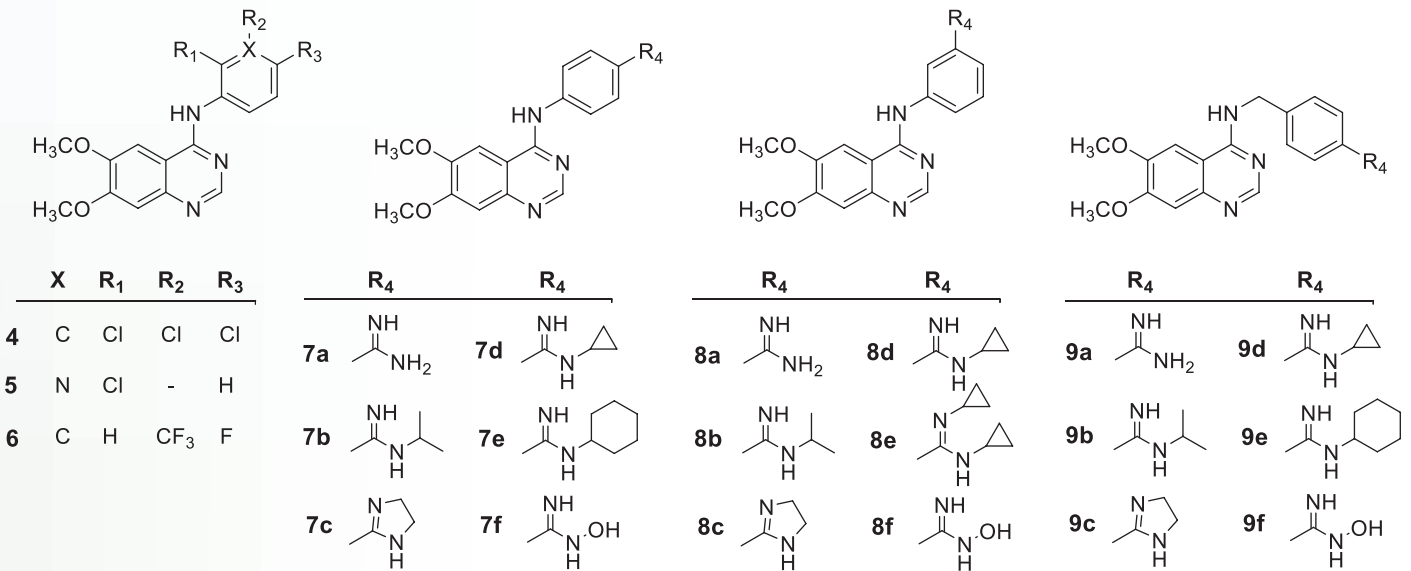
EGFR'yi inhibe eden belirli bileşikler bulunmuş olmasına rağmen kanserin oldukça komplike bir hastalık olması ve EGFR'nin bulunan ilaç moleküllerine karşı direnç geliştirmesi [10] nedeniyle tedavide istenen fayda sağlanamamıştır. Kanser tedavisi için EGFR'yi tam ve etkili şekilde inhibe edecek yeni ilaç moleküllerine gereksinim vardır.

Bu çalışmada; 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin yapısı taşıyan ve ilaç adayı olabilecek yeni moleküllerin tasarlanıp sentezlenmesi (4, 5, 6, 7a-7f, 8a-8f, 9a-9f), sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapılarının ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2D-COSY, 2D-HSQC, 2D-HMBC, 2D-NOESY, 2D-ROESY, Kütle Spektroskopisi, Elementel analiz yöntemleri kullanılarak aydınlatılması, in vitro ortamda EGFR kinaz aktivitesini inhibe etme potansiyellerinin referans bileşik olan erlotinib ile kıyaslanarak araştırılması ve moleküler doking çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Sentez çalışmalarında, formamid ve metil 2-amino-4,5-dimetoksibenzoatın reaksiyonu ile 6,7-dimetoksikinazolin-4-ol bileşiği elde edilmiştir [11]. Ardından bu bileşik, tyonil klorür ile reaksiyona sokularak 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin sentezlenmiştir [12]. 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin bileşiğinin sırasıyla 2,3,4-trikloroanilin, 3-amino-2-kloropiridin ve 4-floro-3-(triflorometil)anilin ile reaksiyonu sonucu bileşikler 4, 5 ve 6 elde edilmiştir. Daha sonra 4-kloro-6,7-dimetoksikinazolin, sırasıyla 4-aminobenzonitril, 3-aminobenzonitril ve 4-(aminometil)benzonitril ile reaksiyona sokularak benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler, uygun amin türevleriyle Pinner reaksiyonuna sokularak amidin yapısı taşıyan 7a-7e, 8a-8e, 9a-9e bileşikleri elde edilmiştir. Benzonitril yapısı taşıyan 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin ara ürünleri, hidroksilamin hidroklorür, DMSO ve potasyum tert-bütoksit ile reaksiyona sokularak amidoksim yapısı taşıyan 7f, 8f, 9f bileşikleri elde edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2 Sentezlenen 4-amino-6,7-dimetoksikinazolin türevleri.

Analitik inceleme yöntemleri

Bileşiklerin erime noktası tayinleri, Büchi B-540 cihazı ile kapiller yöntem uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elementel analizler, Leco 932 CHNS Elementel analiz cihazı ile yapılmıştır. Kütle analizleri, Waters ZQ Mikromass LC-MS spektrometresinde, elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. NMR spektrumları (¹H, ¹³C, 2D-COSY, 2D-HSQC, 2D-HMBC, 2D-NOESY, 2D-ROESY), Varian Mercury-400 Agilent FT-NMR spektrometresinde alınmıştır.

Enzim inhibisyon çalışmaları

EGFR testi, EGFR Kinaz Enzim Sistemi (Promega; V3831) ve ADP-Glo™ Kinaz Test kiti (Promega; V9101) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [13, 14].

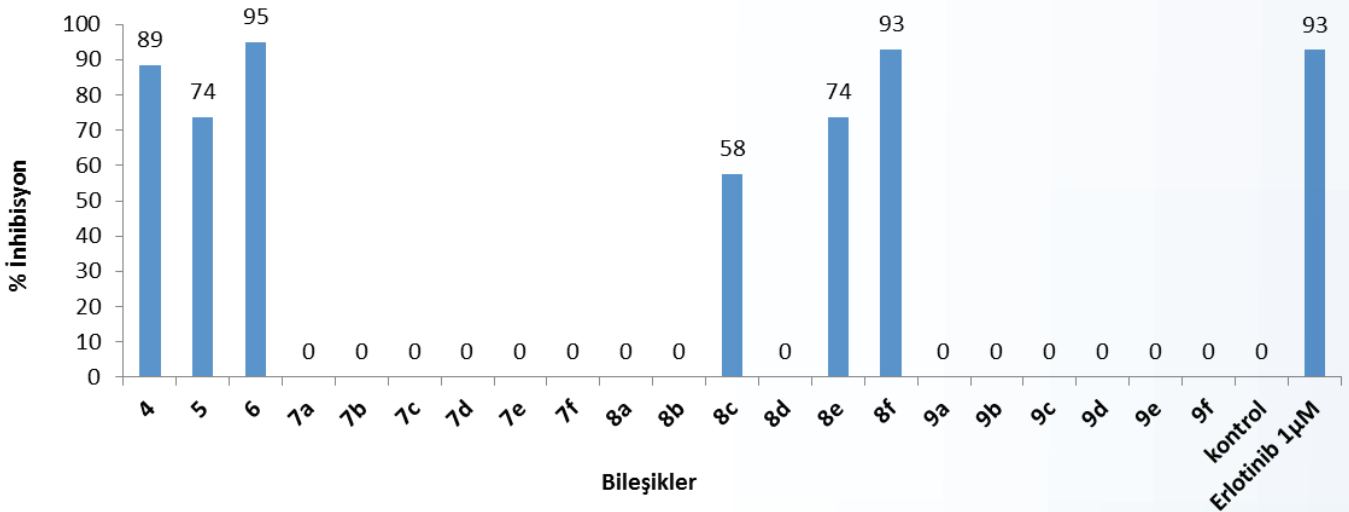
Moleküler modelleme çalışmaları

Moleküler doking çalışmaları, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2021-2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

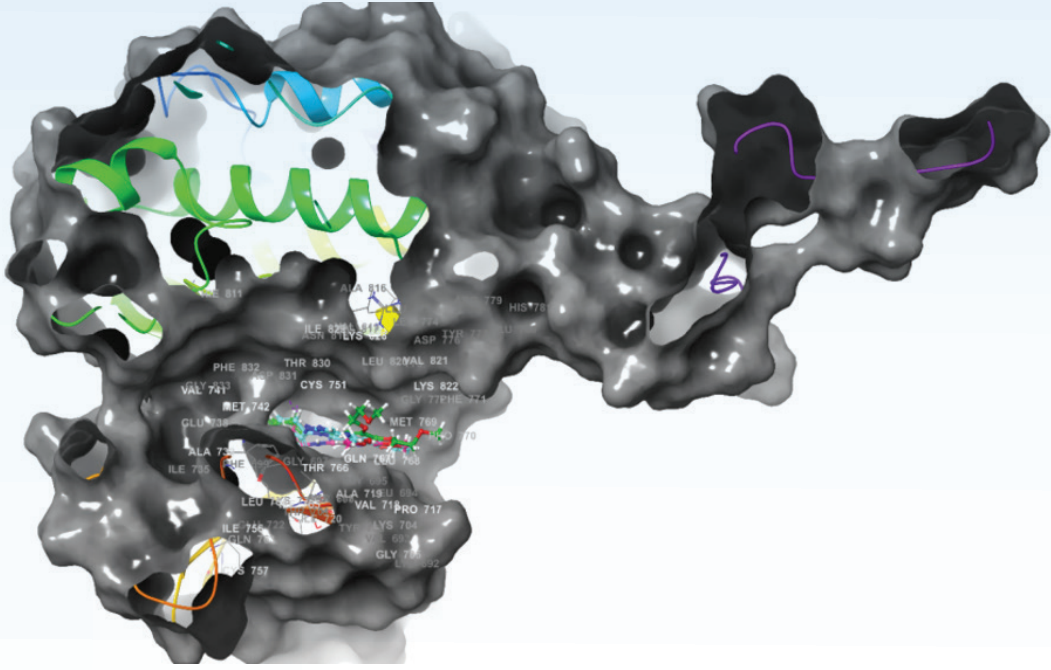
Çalışmada, 5 adet ara ürün ve 21 adet sonuç bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezi yapılan tüm bileşiklerin saflık kontrolleri, İTK ve erime noktalarının tayini ile yapıldıktan sonra, yapılarını kanıtlamak üzere spektral analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kütle analizleri Elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemi ile gerçekleştirilmiş, sonuç bileşikler (M+1)⁺ iyonları halinde gözlenmiştir. Elementel analiz sonuçları ve teorik olarak hesaplanan yüzde değerleri kıyaslanarak bileşiklerin yapı ve saflıkları kanıtlanmıştır. ¹H-NMR, ¹³C-NMR spektrumları, bileşiklerin çözünürlüklerine göre CDCl₃, CD₃OD veya DMSO-d₆ çözücülerinde alınmış ve tüm bileşiklerin beklenen yapılarını kanıtlar nitelikte olduğu bulunmuştur. COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC gibi 2 boyutlu NMR analizleri yardımıyla bazı bileşiklerin tüm proton ve karbonlarına ait kimyasal kayma değerleri belirlenebilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz inhibitör aktiviteleri, ADP-Glo™ test kiti kullanılarak in vitro olarak ölçülmüştür. Sentezlenen bileşikler deney ortamına eklenerek, bileşiklerin varlığında ölçülen enzim aktivitesi maksimum aktivite ile karşılaştırılmış ve inhibisyon değerleri bulunmuştur. Bileşikler EGFR kinazı, Şekil 3'de gösterildiği üzere, değişen derecelerde (% 0 - % 95) inhibe etmişlerdir. Sentezlenen bileşiklerin inhibisyon değerleri referans bileşik olan erlotinib (% 93) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3 Sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz için inhibisyon değerleri.

Aktivite çalışmalarında en etkili bulunan 4, 6 ve 8f bileşiklerinin enzimle iki boyutlu etkileşimleri ve üç boyutlu protein-ligant bağlanma konformasyonları belirlenmiştir (Şekil 4). Gerçekleştirilen doking işleminin validasyonunun sağlanması amacıyla X ışını kristal yapısında bulunan PDB: 1M17 kodlu yapıdan erlotinib bileşiği çıkarılmış ve aynı bölgeye re-docking işlemi yapılmıştır. Bileşik 4, 6 ve 8f, literatüre benzer şekilde [15], EGFR'nin aktif bölgesinde Met769 ile hidrojen bağı yapmakta ve çeşitli amino asitlerle hidrofobik etkileşimler kurarak enzime bağlanmaktadır.



Şekil 4 EGFR aktif bölgesinde erlotinib (koyu yeşil), bileşik 4 (pembe), bileşik 6 (yeşil) ve bileşik 8f (mavi)'nin üst üste çakışmış görüntüsü

SONUÇLAR

Bu çalışmada, 6,7-dimetoksi-4-aminokinazolin yapısına sahip 21 adet bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin (4, 5, 6, 7a-7f, 8a-8f, 9a-9f) safılıkları ve yapıları kütle analizleri, elementel analizleri, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC gibi 2 boyutlu NMR analizleri yardımıyla kanıtlanmıştır. Bileşiklerin in vitro EGFR kinaz inhibitör aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Erlotinib (% 93) ile karşılaştırıldığında, bileşik 4 (% 89), bileşik 5 (% 74), bileşik 6 (% 95), bileşik 8c (% 58), bileşik 8e (% 74) ve bileşik 8f (% 93)'nin EGFR kinaz inhibitör aktiviteye sahip ümit verici bileşikler oldukları bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre aktif bulunan moleküllerin etki mekanizmalarının aydınlatılması, sitotoksikite çalışmalarının yapılması ve özellikle EGFR mutasyonları üzerindeki etkinliklerinin araştırılması bu konudaki ilaç etken madde arayışına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] Hulvat MC. Cancer incidence and trends. Surgical Clinics of North America. 2020;100(3):469-481.
- [2] Bansal R, Malhotra A. Therapeutic progression of quinazolines as targeted chemotherapeutic agents. European Journal of Medicinal Chemistry. 2020;211:113016.
- [3] Cohen P. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? Nature Reviews Drug Discovery. 2002;1(4):309-315.
- [4] Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. Pharmacology & Therapeutics. 1999;82(2-3):241-250.
- [5] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 1995;19(3):83-232.
- [6] Chang J, Ren H, Zhao M, Chong Y, Zhao W, He Y, Zhao Y, Zhang H, Qi C. Development of a series of novel 4-anilinoquinazoline derivatives possessing quinazoline skeleton: Design, synthesis, EGFR kinase inhibitory efficacy, and evaluation of anticancer activities in vitro. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017;138:669-688.

- [7] Fry D, Kraker A, Mcmichael A, Ambroso L, Nelson J, Leopold W, Connors RW, Bridges A. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science*. 1994;265(5175):1093-1095.
- [8] Acar C, Altuntaş TG. Hedefe yönelik kanser tedavisinde kullanılan akıllı ilaçlar: EGFR inhibitörleri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;44(1):47-63.
- [9] Ismail RS, Ismail NS, Abuserii S, Ella DA. Recent advances in 4-aminoquinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;2(1):9-19.
- [10] Ayati A, Moghimi S, Salarinejad S, Safavi M, Pouramiri B, Foroumadi A. A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy. *Bioorganic Chemistry*. 2020;99:103811.
- [11] Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, Rewcastle GW, Mcmichael A, Showalter HH, Fry DW, Kraker AJ, Denny WA. Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure- activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996;39(1):267-276.
- [12] Boyer S, Cantin D, Liang SX. U.S. 2009; Patent Application No. 12/300,751.
- [13] Promega, ADP-Glo™ kinase assay technical manual TM313. Erişim Adresi: [<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/O/adp-glo-kinase-assay-protocol.pdf?la=en>]. Erişim Tarihi: 20/05/2019.
- [14] Promega, Using the kinase enzyme systems with the ADP-Glo™ assay technical manual, TM553. Erişim Adresi: [<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/tm553-using-the-kinase-enzyme-systems-with-the-adp-glo-assay.pdf?la=en>]. Erişim Tarihi: 20/05/2019.
- [15] Fry D. Mechanism of action of erbB tyrosine kinase inhibitors. *Experimental Cell Research*. 2003;284(1):131-139.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmaları 20L0237002 kodlu proje kapsamında Ankara Üniversitesi-BAP tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada yapılan NMR, kütle spektrometresi ve elemental analiz çalışmaları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

BAZI PİRİDAZİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

S12

Burcu KILIÇ¹, Deniz S. DOĞRUER¹

¹Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

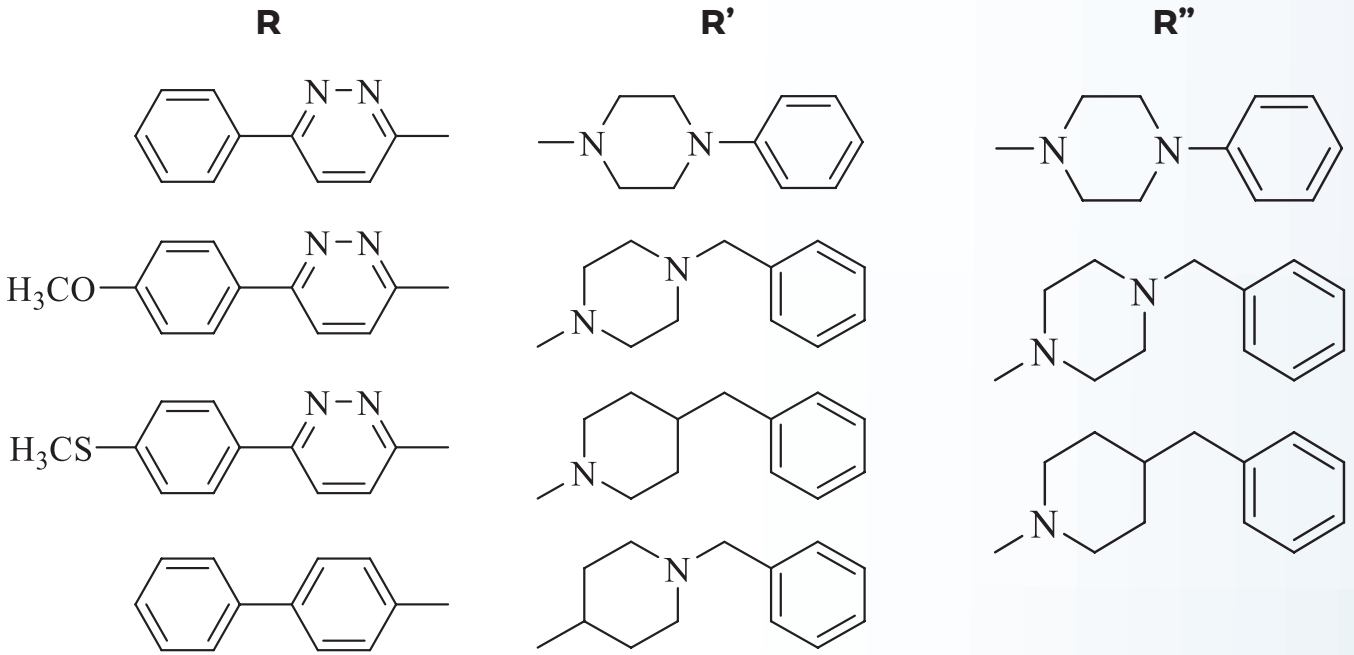
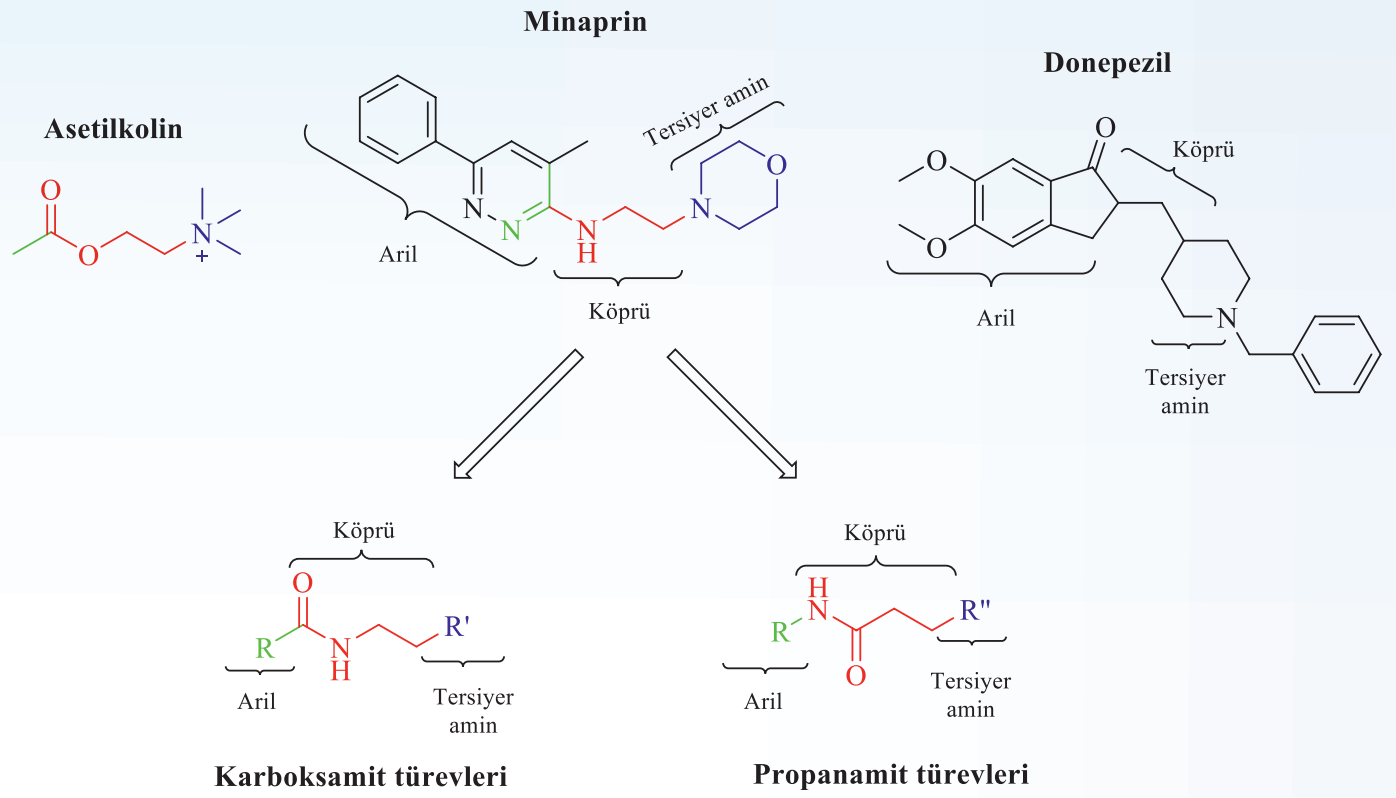
(e-posta: burcukahya@gazi.edu.tr)

GİRİŞ

Modern toplumlarda sosyoekonomik düzeyin artması, ölüm oranının azalmasına ve ortalama yaşam süresinin önemli ölçüde uzamasına neden olmuştur. Buna paralel olarak dünyada ve ülkemizdeki nüfus verileri, toplumların gün geçtikçe artan bir hızla yaşlandığını ve yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan kronik hastalıkların arttığını göstermektedir [1, 2]. Bu hastalıklar arasında genellikle yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan ve demans sendromuna neden olan Alzheimer hastalığı (AH) önemli bir sağlık sorunudur [3, 4]. AH; ilk olarak Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmıştır. Ancak tanımlandığı tarihten günümüze kadar, hastalığın gelişiminde rolü olan etkenler ve patofizyolojisi hakkında çok önemli bilgiler edinilmiş olmasına rağmen kesin nedeni henüz aydınlatılamamıştır. Amiloid beta ($A\beta$) peptitlerden oluşan hücre dışı A plaklar, hiperfosforile tau proteinlerinin oluşturduğu hücre içi nörofibriller yumaklar (NFY), asetilkolin seviyesindeki azalma ve glutamat seviyesindeki artış hastalığın patolojik bulgularıdır. Bu bulgulara dayanarak hastalığın gelişim mekanizmasını açıklayabilecek amiloid, tau, kolinerjik ve glutamat toksisitesi hipotezleri önerilmiş ve bu hipotezler esas alınarak pek çok bileşik geliştirilmiştir [5-7]. Güncelliğini koruyan ve ilaç geliştirme çalışmalarında üzerinde en çok çalışılan hipotez, kolinerjik hipotezdir. Amiloid β ve tau hipotezleri de üzerinde çok çalışılan diğer hipotezlerdir ancak bu yaklaşımlarla geliştirilen bileşikler, ölümcül yan etkileri ya da yeterli olmayan klinik etkinlikleri nedeniyle kullanıma sunulamamıştır [8, 9].

Asetilkolinesteraz (AKE) yapısının bilinmesi, AH tedavisinde kullanılacak yeni AKE inhibitörlerinin (AKEİ) tasarlanması ve geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. AKE aktif bölgesi, katalitik aktif bölge (KAB) ve periferik anyonik bölge (PAB) adı verilen iki ana bölgeden oluşur. KAB, aktif bölge cebinin en alt ucunda bulunan ve enzimin katalitik aktivitesini ortaya çıkaran esas bölgedir. PAB ise aktif bölge cebinin girişinde bulunur asetilkolini ya da farklı ligandları aktif bölge cebine doğru çekerek enzimin katalitik etkinliği artırır [10]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda enzimin PAB ile ilişkilendirilen ve katalitik olmayan ikincil bir işlevi olduğu bildirilmiştir. Bu işlev, hidrofobik özelliği yüksek PAB'in, $A\beta$ peptit ile etkileşerek $A\beta$ agregasyonunu tetiklemesi ve $A\beta$ plak oluşumuna neden olmasıdır. Söz konusu plakların nörotoksositeye yol açarak AH'de gözlenen nöron kaybından sorumlu oldukları bildirilmektedir. Bu nedenle yeni AKEİ'lerin geliştirilmesinde, enzimin KAB ve PAB bölgeleriyle aynı anda etkileşerek hem kolinerjik arttırım sağlayacak hem de $A\beta$ agregasyonunu engelleyecek bileşiklerin tasarlanması önem kazanmıştır [11]. Ayrıca sağlıklı bireylerde MSS'de asetilkolin hidrolizinden sorumlu esas enzim AKE enzimidir ve beyindeki BKE aktivitesi düşük orandadır. Ancak AH durumunda, beyindeki AKE aktivitesi azalırken BKE aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [12, 13]. Bu nedenle AKE enzimi ile birlikte BKE enzimini de inhibe edebilecek bileşiklerin hastalığın tedavisinde ilave katkı sağlayabileceği görüşü yaygınlaşmaktadır. Bu verilerden hareketle biz de tez çalışmamızda AKE enziminin hem KAB ve PAB bölgeleriyle etkileşebilecek hem de BKE inhibisyonu yaparak tedaviye katkı sağlayabilecek yeni bileşikler geliştirmeyi amaçladık.

Piridazin, grubumuz tarafından uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir halka sistemidir ve bu halka sistemini taşıyan farklı biyolojik etkilerle sahip pek çok bileşik literatürde kayıtlıdır. Ayrıca bu bileşikler arasında ilaç olarak kullanılmış veya ilaç olarak kullanılmakta olan piridazin türevleri de vardır. Bunlardan biri antidepressan olarak 1996 yılına kadar kullanılmış olan minaprin ve yapılan in vitro bir çalışmada minaprinin AKE'yi $85 \mu M$ 'lık IC50 değeri ile inhibe ettiği gösterilmiştir [14]. Genel olarak enzim inhibitörlerinin substrat yapısına benzedikleri ancak daha hacimli oldukları bilinmektedir ayrıca literatürde AKE enziminin elektronca zengin aromatik amino asitlerden oluşan PAB bölgesinin; $\pi-\pi$, katyon- π ya da dipol-indüklenmiş dipol etkileşimlerine açık olduğu bildirilmiştir [24,25]. Bu yaklaşım ve literatür bilgisinden hareketle tez çalışmamızda; asetilkolindeki metil grubu yerine hacimli ve PAB ile etkileşim yapabilecek fenilpiridazin grubunun getirildiği ayrıca ester grubu yerine de hidrolize dayanıklı amit farmakoforunun kullanıldığı 6-(sübstitüefenil)piridazin-3-karboksamit ve 6-(sübstitüefenil)piridazin-3-il propanamit türevi 21 yeni bileşik sentez edilmiştir. Söz konusu yapıların türevlendirilmesinde fenil halkasının para konumunda metoksi ve tiyometil sübstitüentleri ve yan zincire ise KAB ile etkileştiği bilinen tersiyer azot yapısı taşıyan sistemler tercih edilmiştir. Bununla birlikte, inhibitör aktivitede piridazin halkasının önemini belirleyebilecek amacıyla, piridazin halkasının fenil halkası ile değiştirildiği 5'i yeni 7 bileşik daha tez kapsamında sentez edilmiştir (Şekil 1).

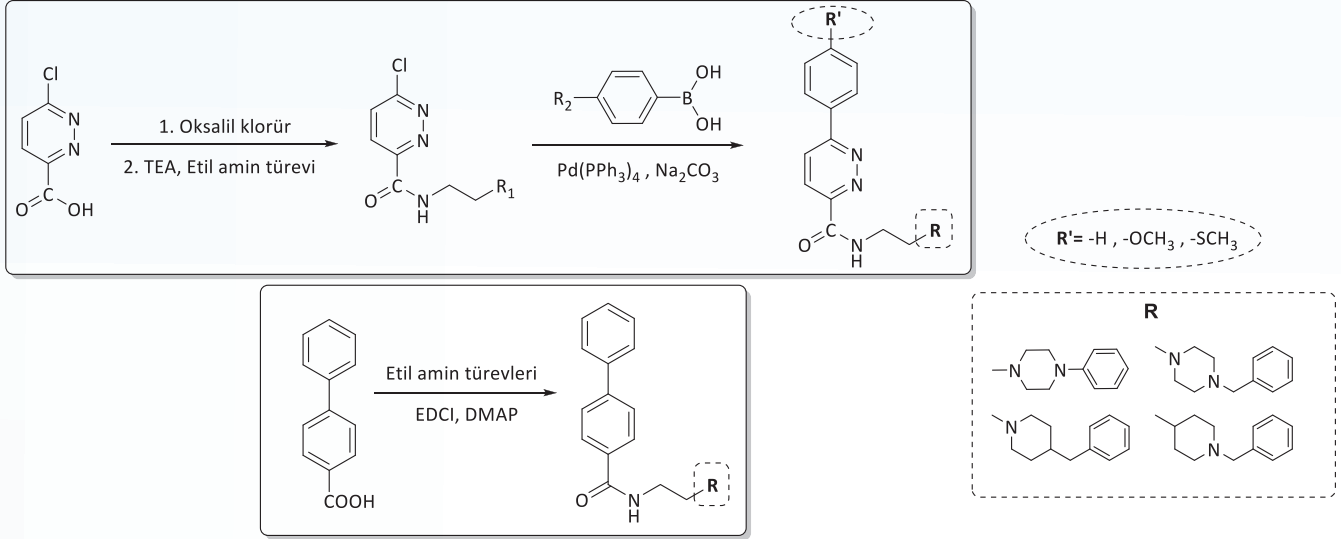


Şekil 1. Bileşiklerin tasarımı ve genel yapıları.

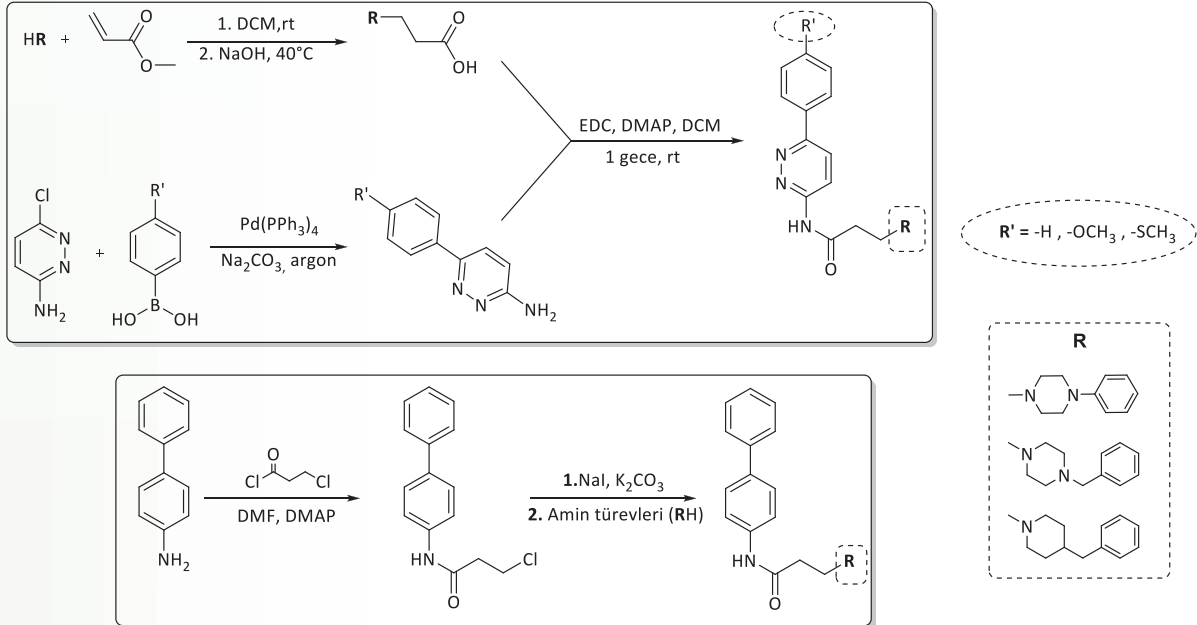
GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez ve analiz çalışmaları

Sentez çalışmalarında kullanılan tüm gereç ve yöntemler ayrıntılı olarak literatürde bildirilmiştir [15]. Karboksamit serisinin genel sentez yöntemi Şekil 2’de verilmiştir. İlgili serinin piridazin türevleri olan 6-fenilpiridazin-3-karboksamit yapısındaki 12 bileşik 6-kloropiridazin-3-karboksilik asitten hareketle elde edildi. Bu serinin bifenil türevleri olan N-[2-(sübstitüe)etil]-[1,1'-bifenil]-4-karboksamit yapısındaki bileşikler ise ticari olarak mevcut [1,1'-bifenil]-4-karboksilik asitten hareketle hazırlandı ve 4 bileşik sentez edildi.



Propanamit serisinin genel sentez yöntemi ise Şekil 3’te verilmiştir. İlgili serinin piridazin türevlerini oluşturan N-(6-fenilpiridazin-3-il) propanamit yapısındaki 9 bileşik ve bifenil türevleri olan N-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(sübstitüe)propanamit yapısında 3 bileşik sentez edildi.



Sentezlenen tüm final bileşiklerin ¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS ve elemental analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kolinesteraz inhibisyon çalışmaları

Sentezlerini β gerçekleştirdiğimiz bileşiklerin kolinesteraz inhibitör aktiviteleri, Electrophorus electricus tip VI-S asetilkolinesterazı ve at serum bütirilkolinesterazı kullanılarak spektrofotometrik bir yöntem olan modifiye Ellman metodu ile belirlenmiştir [15, 16]. Öncelikle bileşiklerin 10 μ M konsantrasyonlarındaki % inhibisyon değerleri belirlenmiş ve %60 üzerinde inhibisyon gösteren bileşiklerin doz cevap eğrileri oluşturularak IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca AKE için en düşük IC_{50} değerlerine sahip bileşik 8 (0,11 μ M) ve BKE için en düşük IC_{50} değerlerine sahip bileşik 16 (1,48 μ M) inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amacıyla seçilmiş ve enzim kinetiği çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Amiloid β agregasyon inhibisyon çalışmaları

Amiloid fibril oluşumunun belirlenmesinde Thioflavin T floresans metodu kullanılmıştır. Katyonik benzotiyazol yapısındaki tiyoflavin T bileşiği amiloid fibrillerle bağlanarak floresans miktarında artışa neden olur. Bu nedenle $A\beta$ agregasyonu arttıkça tutulan tiyoflavin T miktarı ve buna bağlı olarak spektroskopisi ile ölçülen floresans değeri yüksek olmaktadır [17]. Seçilen bileşiklerin % $A\beta$ agregasyon inhibisyonları hem AKE varlığında hem de AKE olmayan koşullarda ölçülmüştür. Ölçüm yönteminin ayrıntıları literatürde bildirilmiştir [15].

Sitotoksikite çalışmaları

En aktif iki bileşiğin 0,1 , 1 ve 10 μ M konsantrasyonları için sitotoksik etki taramaları 3T3 hücre hattı kullanılarak MTT yöntemiyle gerçekleştirilmiş yöntemin ayrıntıları literatürde bildirilmiştir [15].

Moleküler docking çalışmaları

Elde edilen biyolojik etki sonuçları göz önünde bulundurularak seçilen 3 aktif bileşiğin (Bileşik 6, 8 ve 16) ayrıca aktif olmayan 3 bileşiğin (Bileşik 5, 7 ve 21) AKE enzimi ile moleküler docking çalışması gerçekleştirilmiştir. BKE ile etkileşimlerin incelenmesi amacıyla ise BKE inhibitör aktivite gösteren bileşik 4 ve 16 docking çalışması için seçilmiştir. Kullanılan asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin kristal yapıları sırasıyla 1EVE [18] ve 1POI [19] erişim kodlarıyla RCBS protein veri bankasından (<http://www.rcsb.org/pdb>) alınmıştır. Seçilen bileşiklerin docking çalışmaları Molecular Operating Environment (MOE) [20] programı ile gerçekleştirilmiştir.

Fizikokimyasal parametre hesaplama çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin ilaç olabilme potansiyellerinin değerlendirilmesi ve farmakokinetik özelliklerinin öngörülebilmesi amacıyla bazı fizikokimyasal parametreleri hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı (MA), logP, topolojik polar yüzey alanı (tPSA), hidrojen bağı akseptör (HBA) sayısı, hidrojen bağı donör (HBA) sayısı ve moleküler hacim değerleri Molinspiration ve admetSAR online hesaplama programları kullanılarak elde edilmiştir [21, 22].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentez ve analiz çalışmaları

Tez çalışmamızda karboksamit ve propanamit yapısında, 26'sı yeni olmak üzere 28 bileşiğin sentezi gerçekleştirilmiştir. Propanamit serisi sentezinde kullanılan propanoik asit türevi ara ürünler hariç tüm ara bileşikler orijinaldir. Ancak propanoik asit türevi ara ürünler kayıtlı olmalarına rağmen tez çalışmamızdaki sentez yöntemi bu bileşiklerin eldesi için ilk defa kullanılmıştır. Ayrıca propanamit serisinde yan zincirde 1-benzilpiperidin taşıyan türevler, 3-(1-benzilpiperidin-4-il)propanoik asit başlangıç maddesinin temininde sorun yaşanması nedeniyle sentez edilememiştir.

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin analiz sonuçları önerilen kimyasal yapılar ile uyumlu bulunmuştur. Sentezlenen bileşiklerin 1H -NMR spektrumlarında; amit protonu karboksamit türevi bileşiklerde δ 9,20-8,39 ppm aralığında triplet veya broad triplet, propanamit türevi bileşiklerde ise δ 12,33-10,18 ppm aralığında singlet olarak görülmüştür. Karboksamit serisinde piridazin halkasının iki protonu δ 8,42-7,97 ppm aralığında iki ayrı dublet ya da biri dublet diğeri ise aromatik halka protonları ile birlikte multiplet şeklinde gözlenmiştir. Propanamit serisinde ise δ 8,58-7,84 ppm aralığında iki ayrı dublet şeklinde görülmüştür. Her iki seride yan zincirinde benzilpiperidin grubu bulunan türevlerde, piperidin halkasının 2, 3, 5 ve 6. konumundaki protonlar ekvatoryal ve aksiyal olarak ayrı şekilde gözlenmiştir.

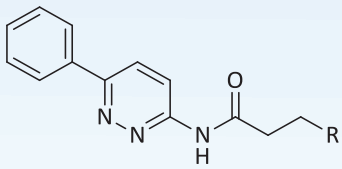
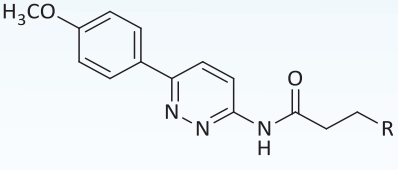
2. ve 6. konumdaki ekvatoryal protonlar δ 3,10-2,75 ppm aralığında dublet, aksiyal protonlar ise δ 2,06-1,87 ppm aralığında triplet olarak görülmüştür. Benzer şekilde 3. ve 5. konumlardaki ekvatoryal protonlar δ 1,80-1,53 ppm aralığında dublet ve aksiyal protonlar δ 1,60-1,12 ppm aralığında kuartetin dubleti veya multipler olarak sinyal vermiştir. Piperidinin 4 numaralı konumunda bulunan proton ise diğer alifatik protonlarla birlikte ya da 1H şiddetinde ayrı bir multipler şeklinde gözlenmiştir.

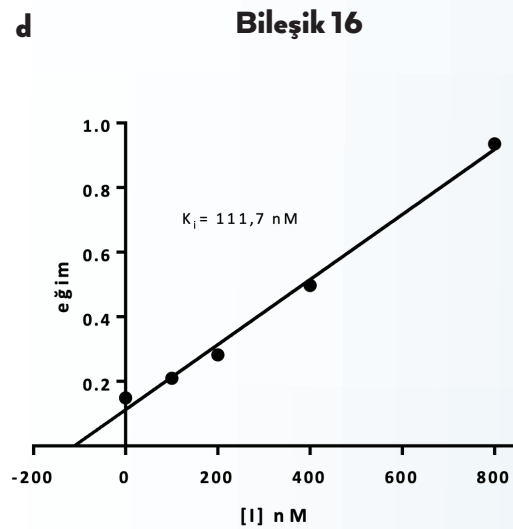
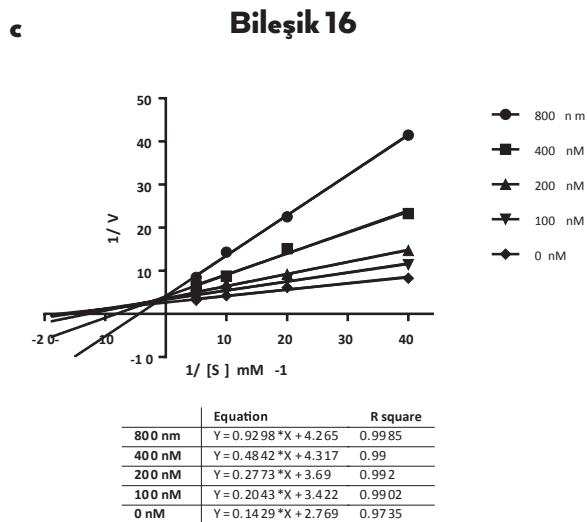
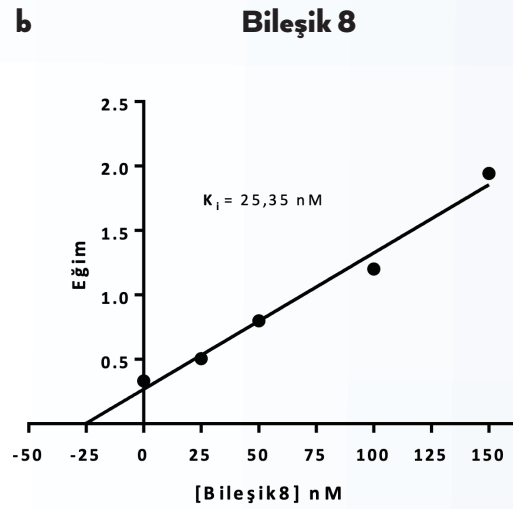
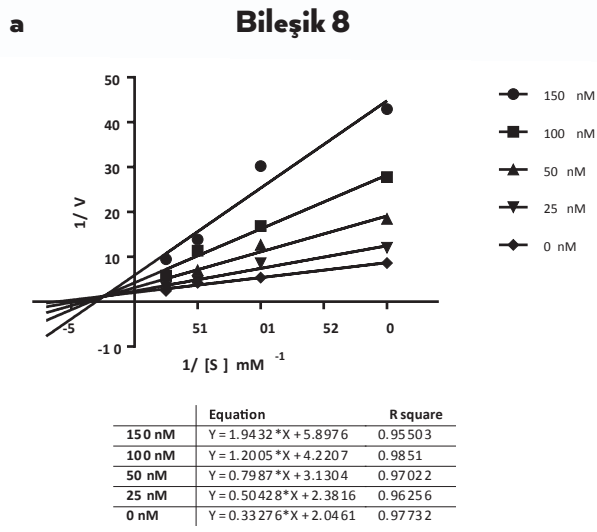
Kolinesteraz inhibityon çalışmaları

Sentez edilen bileşiklerin kolinesteraz inhibitör aktivite sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Bileşiklerin AKE inhibitör aktivitelerinin BKE inhibitör aktivitelerine kıyasla daha iyi olduğu bulunmuştur. En yüksek AKE ve BKE inhibitör aktiviteye sahip bileşikler sırasıyla bileşik 8 ($IC_{50} = 0,11 \mu M$) ve bileşik 16 ($IC_{50} = 1,48 \mu M$) olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu iki bileşiğin kinetik çalışmaları sonucunda K_i değerleri sırasıyla 25,35 ve 111,7 nM olarak hesaplanarak, karışık tipte inhibityon oluşturdıkları bulunmuştur (Şekil 4.).

Tablo 5 Bileşiklerin kolinesteraz inhibitör etki sonuçları

R	Bil. No	AKE		BKE		
		% inh \pm SD (10 μM)	IC ₅₀ (μM) \pm SEM	% inh \pm SD (10 μM)	IC ₅₀ (μM) \pm SEM	
	Fenilpiperazin	1	-	-	-	-
	Benzilpiperazin	2	85 \pm 0,7	2,69 \pm 0,001	-	-
	4-Benzilpiperidin	3	30 \pm 3,4	-	34 \pm 4,6	-
	1-Benzilpiperidin	4	97 \pm 0,2	0,16 \pm 0,001	65 \pm 0,9	9,80 \pm 0,001
	Fenilpiperazin	5	-	-	-	-
	Benzilpiperazin	6	88 \pm 0,7	1,63 \pm 0,001	-	-
	4-Benzilpiperidin	7	-	-	23 \pm 1,3	-
	1-Benzilpiperidin	8	96 \pm 0,4	0,11 \pm 0,001	47 \pm 1,9	-
	Fenilpiperazin	9	-	-	-	-
	Benzilpiperazin	10	79 \pm 1,0	2,66 \pm 0,001	-	-
	4-Benzilpiperidin	11	12 \pm 2,5	-	14 \pm 1,5	-
	1-Benzilpiperidin	12	91 \pm 0,2	0,12 \pm 0,001	29 \pm 2,9	-
	Fenilpiperazin	13	-	-	-	-
	Benzilpiperazin	14	39 \pm 4,7	-	27 \pm 6,2	-
	4-Benzilpiperidin	15	6 \pm 2,5	-	13 \pm 3,0	-
	1-Benzilpiperidin	16	95 \pm 0,2	0,59 \pm 0,001	86 \pm 5,2	1,48 \pm 0,001
	Fenilpiperazin	17	-	-	-	-
	Benzilpiperazin	18	55 \pm 3,9	-	9 \pm 1,9	-
	4-Benzilpiperidin	19	-	-	-	-
	Fenilpiperazin	20	-	-	-	-
	Benzilpiperazin	21	25 \pm 2,9	-	-	-
	4-Benzilpiperidin	22	14 \pm 4,9	-	-	-

	Fenilpiperazin	23	-	-	-	-	
	Benzilpiperazin	24	26 ± 2,6	-	-	-	
	4-Benzilpiperidin	25	-	-	-	-	
	Fenilpiperazin	26	-	-	9 ± 1,6	-	
	Benzilpiperazin	27	19 ± 3,7	-	-	21 ± 3,2	-
	4-Benzilpiperidin	28	7,5 ± 3,9	-	-	19 ± 3,6	-
	Donepezil		98 ± 1,0	0,058 ± 0,001	90 ± 0,5	3,7 ± 0,001	
	Galantamin		89 ± 1,3	-	20 ± 0,5	-	



Şekil 4 Bileşik 8'in AKE için Lineweaver-Burk (a) ve K_i tayininde kullanılan derişim-eğim (b) Bileşik 16'nın BKE için Lineweaver-Burk (c) ve K_i tayininde kullanılan derişim-eğim (d) grafikleri.

Amiloid β agregasyon inhibisyon çalışmaları

Kolinesteraz enzim inhibisyonu çalışmalarında en yüksek etkiyi göstermiş olan altı bileşiğin A β agregasyon inhibisyonları hem AKE varlığında hem de AKE olmayan koşullarda ölçülmüş, sonuçlar Tablo 2'de sunulmuştur. Bileşiklerin aktivite sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde A β 'nin doğal agregasyonuna kıyasla AKE ile uyarılmış agregasyonu daha güçlü inhibe ettikleri gözlenmiştir.

Tablo 2 Seçilen bileşiklerin A β agregasyon inhibisyon sonuçları (*; 50 μ M)

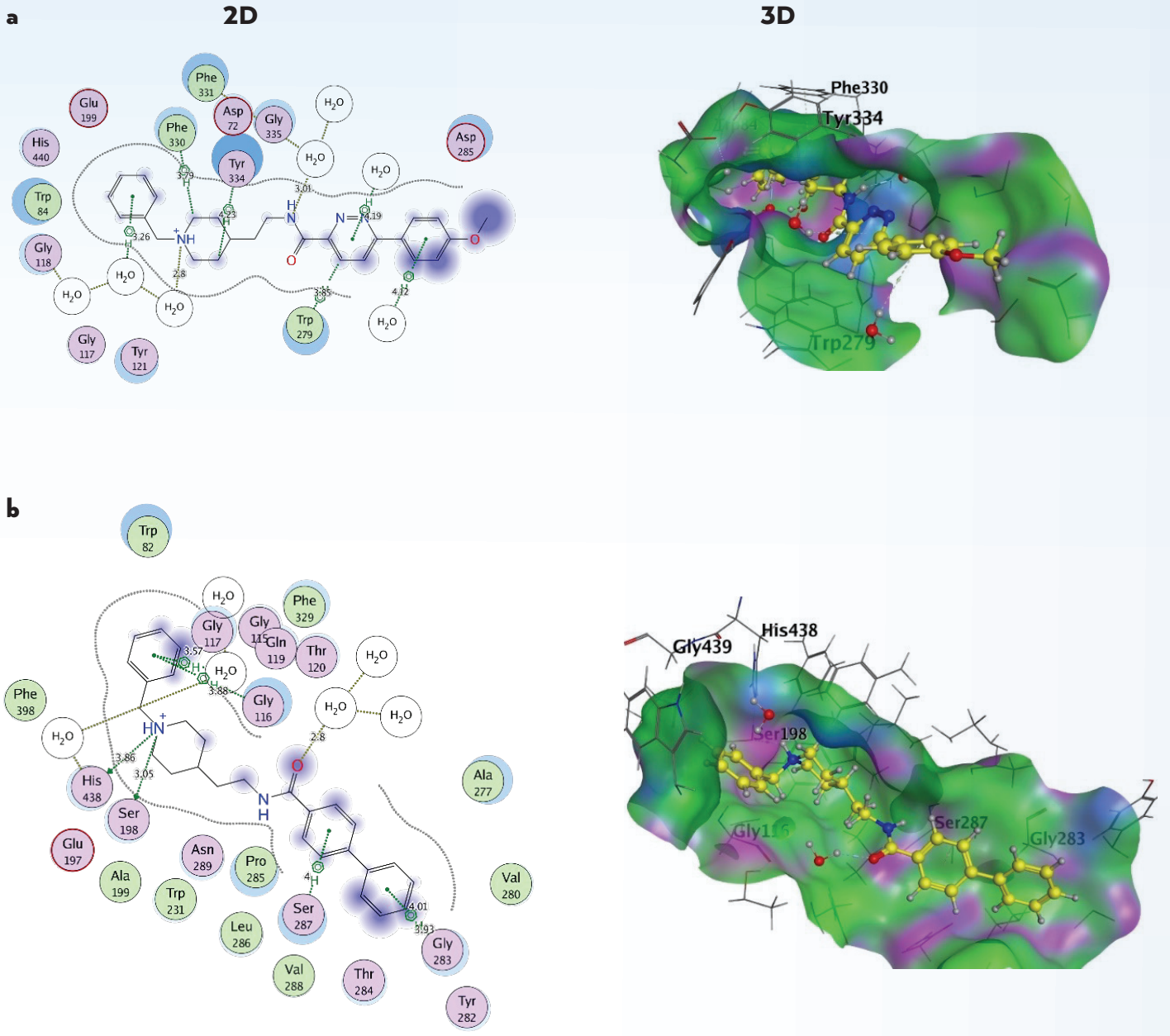
Bileşik (100 μ M)	A β agr % inh \pm SD AKE (-)	A β agr % inh \pm SD AKE (+)
2	8.70 \pm 0.04	22.30 \pm 0.39
4	-	10.49 \pm 0.13
6	-	3.38 \pm 0.058
8	-	-
10*	12.72 \pm 0.17	27.58 \pm 0.10
16	-	-
Fenol Kırmızısı	98.40 \pm 0.12	92.15 \pm 0.05
Donepezil	12,9 \pm 0.03	20,3 \pm 0.08

Sitotoksosite çalışmaları

En aktif iki bileşiğin (8 ve 16) aktivite gösterdikleri konsantrasyon aralığında 3T3 hücreleri için sitotoksik olmadıkları bulunmuştur.

Tablo 2 Bileşik 8 ve 16'nın sitotoksosite sonuçları

Bileşik	3T3 hücrelerinde canlılık (%)		
	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
8	96.7 \pm 6.1	97.9 \pm 4.2	80.6 \pm 6.1
16	81.4 \pm 3.9	89.0 \pm 3.3	102.0 \pm 3.9



Şekil 5 Bileşik 8'in AKE (a) ve Bileşik 16'nın BKE (b) ile elde edilen docking sonuçları

Fizikokimyasal parametre hesaplama çalışmaları

Sentez edilen bileşiklerin ilaç olabilme potansiyellerinin değerlendirilmesi ve farmakokinetik özelliklerinin öngörülmesi amacıyla bazı fizikokimyasal parametreleri (molekül ağırlığı, logP, topolojik polar yüzey alanı, hidrojen bağı akseptör sayısı, hidrojen bağı donör sayısı ve moleküler hacim) hesaplanmış ve Tablo 4 ile sunulmuştur. Tüm bileşikler Lipinski kurallarına göre değerlendirildiğinde 3 bileşik dışında tüm bileşiklerin kurallara uyduğu görülmüştür. LogP değerleri 5'ten büyük olan bu 3 bileşik bifenil türevidir. Bu sonuca göre tez bileşiklerinin tasarımı için seçilen piridazin halkasının bileşiklerin inhibitör aktivitesinin yanında ilaç olabilme özelliklerine de olumlu katkı yaptığı söylenebilir.

Tablo 4 Bileşiklerin Molinpiration^a ve admetSAR^b ile hesaplanmış fizikokimyasal parametreleri

Bileşik	MW ^a	logP ^a	tPSA ^a	Vol ^a	nON ^a	nOHNH ^a	Vio ^a	BBB ^b
1	387.49	2.96	61.36	365.47	6	1	0	0.9736
2	401.51	2.66	61.36	382.27	6	1	0	0.9500
3	400.53	3.95	58.12	386.32	5	1	0	0.9500
4	400.53	4.00	58.12	386.32	5	1	0	0.9500
5	417.51	3.02	70.59	391.02	7	1	0	0.9813
6	431.54	2.72	70.59	407.82	7	1	0	0.9644
7	430.55	4.00	67.35	411.86	6	1	0	0.9644
8	430.55	4.05	67.35	411.86	6	1	0	0.9644
9	433.58	3.39	61.36	400.16	6	1	0	0.9714
10	447.61	3.10	61.36	416.96	6	1	0	0.9457
11	446.62	4.38	58.12	421.01	5	1	0	0.9457
12	446.62	4.43	58.12	421.01	5	1	0	0.9457
13	385.51	4.54	35.57	373.78	4	1	0	0.9906
14	399.54	4.25	35.57	390.58	4	1	0	0.9831
15	398.55	5.53	32.34	394.63	3	1	1	0.9835
16	398.55	5.58	32.34	394.63	3	1	1	0.9900
17	387.49	3.49	61.36	365.47	6	1	0	0.9861
18	401.51	3.19	61.36	382.27	6	1	0	0.9861
19	400.53	4.47	58.12	386.32	5	1	0	0.9861
20	417.51	3.54	70.59	391.02	7	1	0	0.9904
21	431.54	3.25	70.59	407.82	7	1	0	0.9904
22	430.55	4.53	67.35	411.86	6	1	0	0.9904
23	433.58	3.92	61.36	400.16	6	1	0	0.9831
24	447.61	3.62	61.36	416.96	6	1	0	0.9831
25	446.62	4.91	58.12	421.01	5	1	0	0.9831
26	385.51	4.80	35.57	373.78	4	1	0	0.9819
27	399.54	4.50	35.57	390.58	4	1	0	0.9819
28	398.55	5.79	32.34	394.63	3	1	1	0.9895

SONUÇLAR

Yapı etki sonuçları değerlendirildiğinde, genel olarak kolinesteraz inhibitör aktivite için karboksamit yapısının propanamit yapısına kıyasla tercih edildiğini göstermiştir. Ayrıca 6-fenilpiridazin halkasının AKE inhibitör aktivite için, bifenil halkasının ise BKE inhibitör aktivite için daha uygun olduğu bulunmuştur. Sentezlenen bileşiklerin fizikokimyasal parametreleri hesaplandığında bifenil türevi 3 bileşiğin Lipinski kurallarına uymadığı görülmüştür. Bu nedenle tez bileşiklerinin tasarımı için seçilen piridazin halkasının, bileşiklerin AKE inhibitör aktivitesinin yanında ilaç olabilme özelliklerine de olumlu katkı yaptığı söylenebilir. En yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 8'in karışık tipte enzim inhibisyonu oluşturması ve moleküler kenetlenme sonuçları enzimin hem katalitik hem de periferel bölgeleri ile etkileşebildiğini göstermiştir. Donepezil ile kıyaslanabilir AKE inhibisyonuna sahip bileşik 8, A β agregasyonunu inhibe etmemektedir ancak galantamin ve rivastigmin ile kıyaslanabilir AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 2 ve 10'un, AKE varlığında A β agregasyon inhibisyonu gerçekleştirmeleri enzimin periferel bölgesi ile de etkileştiklerini destekleyebilecek diğer bir bulgudur.

KAYNAKÇA

- [1] United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division, World Population Ageing 2015, 2015.
- [2] Türkiye İstatistik Kurumu, İstatistiklerle Yaşlılar, 2014, 2015.
- [3] Ray S., Davidson S, Dementia and cognitive decline A review of the evidence, Age UK Research, 2014.
- [4] Alzheimer's, Association, Alzheimer's disease facts and figures, Alzheimers & Dementia, 11 (2015) 332-384.
- [5] S. Salloway, J. Mintzer, M.F. Weiner, J.L. Cummings, Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease, Alzheimers. Dement. 4 (2008) 65-79.
- [6] Y. Biran, C.L. Masters, K.J. Barnham, A.I. Bush, P.A. Adlard, Pharmacotherapeutic targets in Alzheimer's disease, J. Cell. Mol. Med., 13 (2009) 61-86.
- [7] A. Cavalli, M.L. Bolognesi, A. Minarini, M. Rosini, V. Tumiatti, M. Recanatini, C. Melchiorre, Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases, Journal of Medicinal Chemistry, 51 (2008) 347-372.
- [8] B.D. Greenberg, M.C. Carrillo, J.M. Ryan, M. Gold, K. Gallagher, M. Grundman, R.M. Berman, T. Ashwood, E.R. Siemers, Improving Alzheimer's disease phase II clinical trials, Alzheimers. Dement., 9 (2013) 39-49.
- [9] K. Mullane, M. Williams, Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis-but what lies beyond?, Biochem. Pharmacol., 85 (2013) 289-305.
- [10] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T.L. Rosenberry, J.L. Sussman, Acetylcholinesterase: from 3D structure to function, Chem. Biol. Interact., 187 (2010) 10-22.
- [11] P. Munoz-Ruiz, L. Rubio, E. Garcia-Palomero, I. Dorronsoro, M. del Monte-Millan, R. Valenzuela, P. Usan, C. de Austria, M. Bartolini, V. Andrisano, A. Bidon-Chanal, M. Orozco, F.J. Luque, M. Medina, A. Martinez, Design, synthesis, and biological evaluation of dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: new disease-modifying agents for Alzheimer's disease, J. Med. Chem., 48 (2005) 7223-7233.
- [12] E. Giacobini, Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase A Valid Alternative for Therapy of Alzheimer's Disease?, Drugs and Aging, 18 (2001) 891-898.
- [13] S. Darvesh, D.A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, Nat. Rev. Neurosci., 4 (2003) 131-138.
- [14] J.M. Contreras, Y.M. Rival, S. Chayer, J.J. Bourguignon, C.G. Wermuth, Aminopyridazines as acetylcholinesterase inhibitors, J. Med. Chem., 42 (1999) 730-741.

- [15] B. Kilic, H.O. Gulcan, F. Aksakal, T. Ercetin, N. Oruklu, E. Umit Bagriacik, D.S. Dogruer, Design and synthesis of some new carboxamide and propanamide derivatives bearing phenylpyridazine as a core ring and the investigation of their inhibitory potential on in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Bioorganic Chemistry*, 79 (2018) 235-249.
- [16] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V.J. Andres, R.M. Feather-Stone, A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961) 88-95.
- [17] R. Khurana, C. Coleman, C. Ionescu-Zanetti, S.A. Carter, V. Krishna, R.K. Grover, R. Roy, S. Singh, Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils, *J Struct Biol*, 151 (2005) 229-238.
- [18] G. Kryger, I. Silman, J. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricep): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Structure*, 7 (1999) 297-307.
- [19] Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 41141-41147.
- [20] C.C.G.I. Molecular Operating Environment (MOE), 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015.
- [21] Molinspiration Cheminformatics, Bratislava, Slovak Republic, <http://www.molinspiration.com/services/properties.html> (April 2017).
- [22] F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P.W. Lee, Y. Tang, admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties, in, ACS Publications, 2012.

Pınar POYRAZ YILMAZ^{1,2}, Necla KULABAŞ³, Arif BOZDEVECİ⁴, Vagolu Siva KRISHNA⁵, Şengül ALPAY KARAOĞLU⁴, Dharmarajan SRIRAM⁵, İlkey KÜÇÜKGÜZEL³

1 Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Başbüyük, Maltepe İstanbul

2 Viatris İlaçları Türkiye, Ruhsatlandırma Departmanı, Ortaköy, Beşiktaş, İstanbul

3 Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Başbüyük, Maltepe İstanbul

4 Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji AD, Rize

5 Medicinal Chemistry Research Lab., Pharmacy Group, Birla Institute of Technology & Science, Hyderabad, India

(e-posta: pinarpoyraz@hotmail.com)

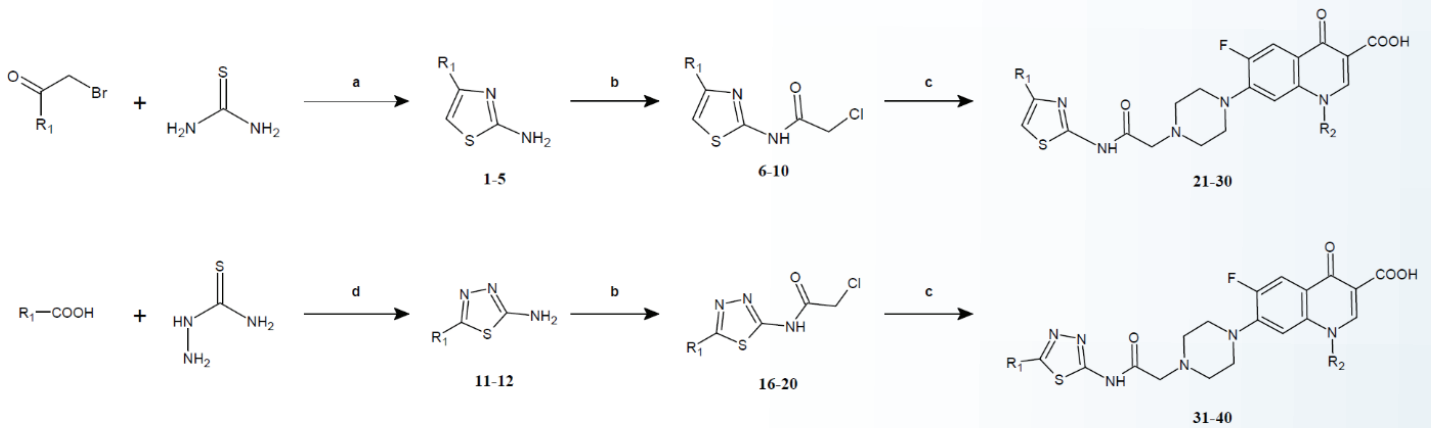
GİRİŞ

Florokinolon türevi bileşiklerin DNA sentezini doğrudan inhibe eden geniş spektrumlu tek antibiyotik grubu olması, Dünya Sağlık Örgütü tarafından çoklu ilaç direnci (MDR) gelişen tüberküloz vakalarında ikinci basamak tedavi ajanı olarak onaylanmaları ve bu bileşiklere karşı hızla gelişen direnç mekanizmalarının klinik kullanımlarını tehdit etmesi, farmakokinetik/farmakodinamik özellikleri iyileştirilmiş ve dirençli suşlara karşı da etkili olan yeni florokinolon türevlerine olan ihtiyacı ortaya koymaktadır [1]. Önceki çalışmalarımızda [1-3] florokinolon türevleri üzerinden sentezlediğimiz türevlerin antibakteriyel ve antitüberküler etkilere sahip olması, yeni türevlerin sentezlenmesi konusunda bizi cesaretlendirmiştir.

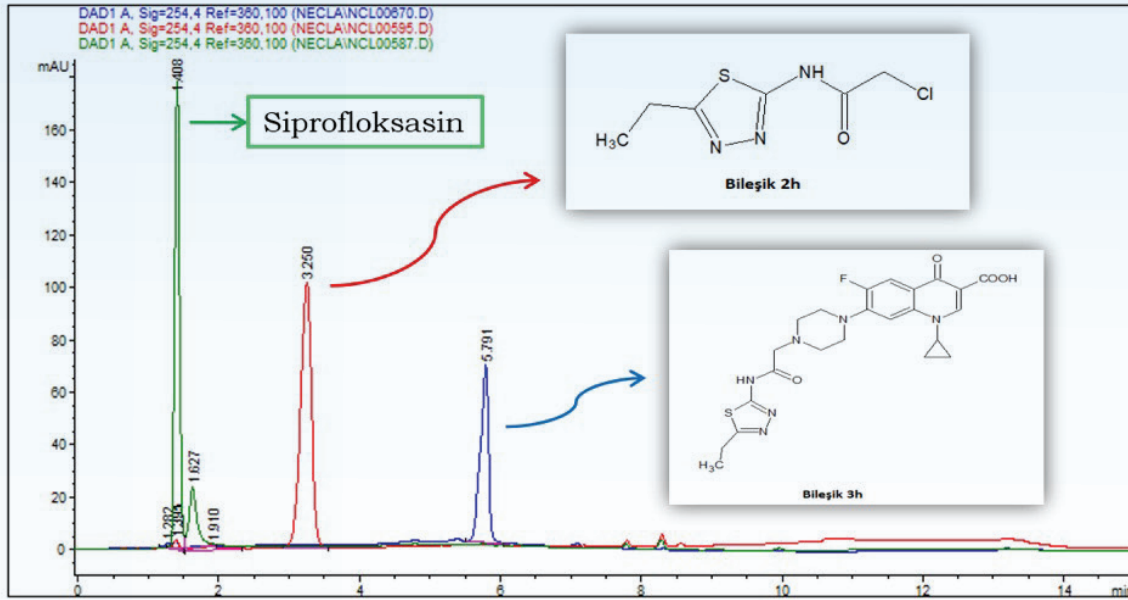
GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

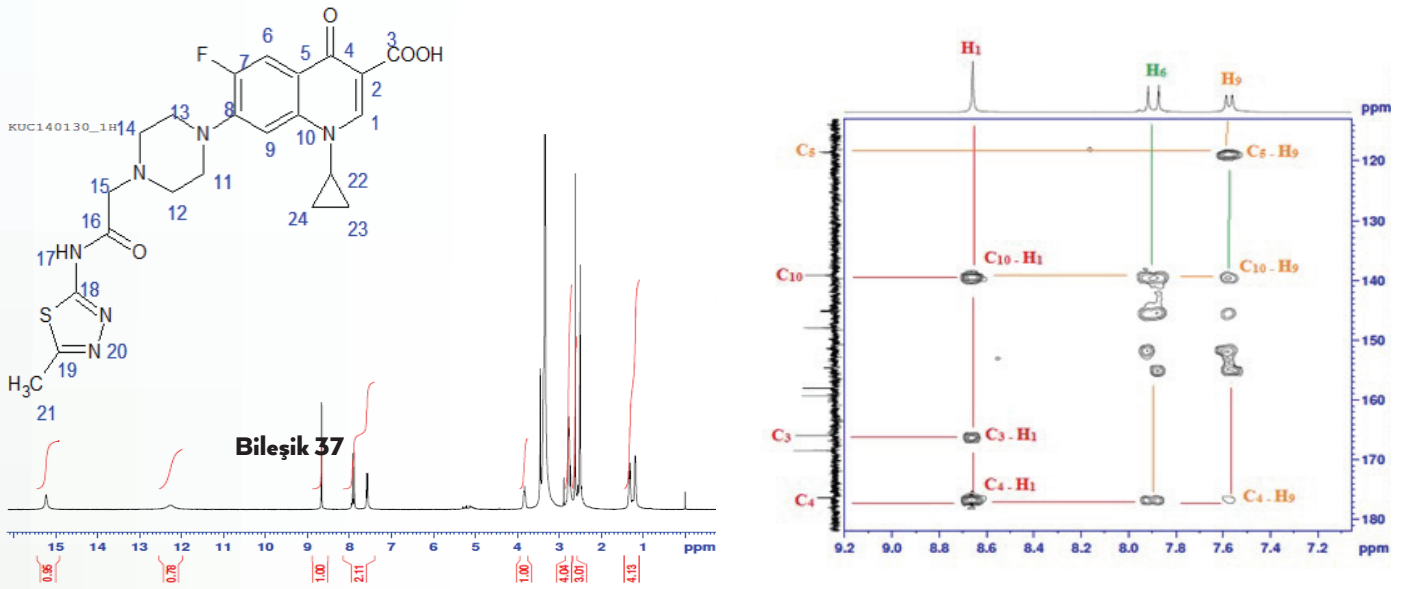
Çalışmamızda kullanılan 2-aminotiyazoller 1-5 ve 2-aminotiyadiazoller 11-15, tiyoüre veya tiyosemikarbazit bileşiklerinden hareketle literatürde bildirilen yöntemlere göre hazırlanmıştır. Amin bileşiklerinin (1-5 ve 11-15) kloroasetilasyonu ile elde edilen N-heteroaril-2-kloroasetamitler (6-10 ve 16-20) son aşamada siprofloksazin ve norfloksazin ile DMF içinde tepkimeye sokularak hedef bileşikler 21-40 sentezlenmiştir (Şekil 1). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve elemental analizlerle saflıkları tespit edilen bileşiklerin yapıları FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC ve kütle spektral teknikleri ile kanıtlanmıştır (Şekil 2 ve Şekil 3).



Şekil 1 Bileşikler 21-40 için uygulanan sentez protokolü. Kullanılan belirteçler ve koşullar: (a) izopropanol, oda sıcaklığı; (b) ClCH₂COCl, TEA, DCM; (c) CFX / NFX, NaHCO₃, DMF; (d) der. HCl, ısıtma.



Şekil 2 Siprofloksazin, bileşik 18 ve bileşik 33'ün HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması.



Şekil 3 Bileşik 37'ye ait ¹H-NMR ve HMBC spektrumları.

Antibakteriyel ve antitüberküler etki çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin antimikrobiyal etki çalışmaları Hıfzıssıhha Refik Saydam Enstitüsü'nden (Ankara, Türkiye) temin edilen *Escherichia coli* (E. coli) ATCC35218, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC911, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC43288, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251, *Bacillus cereus* 709 Roma, *Mycobacterium smegmatis* ATCC607, *Candida albicans* ATCC60193 ve *Saccharomyces cerevisiae* RSKK 251 mikroorganizmaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Etki çalışmaları kuyu difüzyon ve mikrodilüsyon teknikleri kullanılarak literatürde belirtilen yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir [1, 3]. Etkili bulunan bileşiklerin RAW 264.7 makrofajları üzerinde sitotoksisiteleri MTT yöntemi ile incelenmiştir [4].

Antitüberküler etki çalışmaları, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşu kullanılarak MABA tekniği ile gerçekleştirilmiştir [5, 6].

Enzim inhibisyon çalışmaları

Antitüberküler etkisi incelenen bileşik 21-40 içinde M. tuberculosis H37Rv suşuna karşı en iyi MİK değerine sahip olan bileşik 35 için M. tuberculosis DNA süpersarım kitleri (Inspiralis Ltd, Norwich,UK) kullanılarak DNA giraz inhibisyon değeri tayin edildi [7]. Çalışmada siprofloksazin ve norfloksazin pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Moleküler modelleme çalışmaları

Moleküler modelleme çalışmalarında M. tuberculosis kaynaklı DNA giraz proteinine ait kristal yapı (PDB kodu: 5BTA [8]) kullanılmıştır. Kristal yapıda bulunan ko-kristalize inhibitör (moksifloksazin, MOX) silinerek The AutoDock Tools [9] programı ile enzim protonlanmış ve enerji minimizasyonu yapılmıştır. Bileşik 35'in karboksilik asit parçası negatif yüklü fonksiyon olarak çizilirken konformasyonları Spartan4 kuantum kimya programı kullanılarak yarı deneysel PM3 yöntemi ile taranmıştır (SPARTAN 04, Wavefunction, Inc., Irvine, ABD). Bileşik 35'in en kararlı konformeri The AutoDock Tools programı kullanılarak moleküler modelleme çalışmaları için hazırlanmış ve moleküler modelleme çalışmalarında Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş açık lisanslı bir yazılım olan Autodock Vina [10] kullanılmıştır. Açık lisanslı görüntüleme yazılımı olan Discovery Studio Visualizer programı ile enzim-ligand etkileşimleri incelenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Antibakteriyel ve antitüberküler etki

Sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel aktivitesi mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. 7-[4-(2-[[1,3,4-tiyadiazol-2-il]amino]-2-oksoetil)piperazin-1-il]-1-siklopropil-6-fluoro-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilik asit 31, Escherichia coli ATCC 25922, Yersinia pseudotuberculosis ATCC 911, Klebsiella pneumonia ve Pseudomonas aeruginosa ATCC 43288 suşlarına karşı <0.63 µg/ml MİK değeriyle aktif olarak bulunmuştur. Sentezlenen bileşiklerin M. tuberculosis H37Rv suşuna karşı MİK değerlerini belirlemek için MABA assay yöntemi kullanılmış ve 7-[4-(2-[[5-sülfamoyl-1,3,4-tiyadiazol-2-il]amino]-2-oksoetil)piperazin-1-il]-1-siklopropil-6-fluoro-4-okso-1,4-dihidrokinolin-3-karboksilik asit 35 1,56 µg/ml MİK değeri ile en aktif bileşik olarak gözlenirken, bu serinin diğer bileşiklerinin MİK değerlerinin > 25 ve 6,25 µg/ml arasında değiştiği saptanmıştır. Etki sonuçları **Tablo 1** ve **Tablo 2**'de verilmiştir.

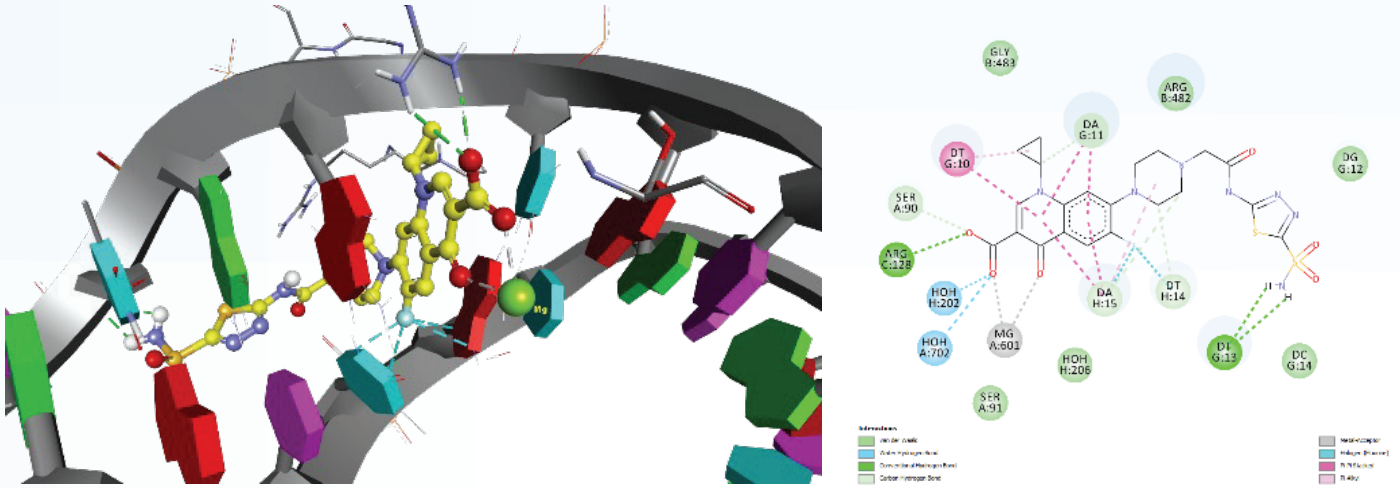
Tablo 1 Hedef bileşikler 21-40 ile elde edilen antibakteriyel etki sonuçları.

Lab kodu	Bileşik no	Minimum İnhibitör Konsantrasyon değerleri (µg/mL)												
		Gram Negatif Bakteriler				Gram Pozitif Bakteriler					Maya mantarları			
		E. coli	Y. pseu	K. pneu	P. aeu	S. aur	MRSA	E. fec	L. mon	L. aci	B. cer	M. smeg.	C. alb	S. cer
KUC140103	21	5,22	20,90	41,80	83,59	83,59	167,19	167,19	167,19	-	167,19	20,90	-	-
KUC140107	22	2,59	20,70	10,35	82,81	10,35	10,35	41,41	10,35	-	10,35	10,35	-	-
KUC140113	23	1,29	20,70	10,35	82,81	10,35	10,35	20,70	20,70	-	10,35	5,18	-	662,50
KUC140117	24	2,49	19,92	19,92	79,69	19,92	19,92	39,84	39,84	-	39,84	19,92	-	318
KUC140121	25	681,25	10,64	5,32	85,16	21,29	10,64	21,29	21,29	-	5,32	5,32	-	-
KUC140104	26	19,92	19,92	39,84	159,38	79,69	79,69	159,38	318,75	318,75	318,75	39,84	318,75	-
KUC140108	27	39,45	78,91	78,91	252,5	315,63	315,63	252,5	252,5	-	252,5	-	-	-
KUC140114	28	39,45	157,81	157,81	631,25	315,63	315,63	-	-	-	631,25	-	-	631,25
KUC140118	29	20,12	80,47	40,23	321,88	80,47	80,47	321,88	321,88	-	160,94	-	-	321,88
KUC140122	30	21,09	168,75	84,38	-	168,75	168,75	337,50	-	-	168,75	-	-	337,50
KUC140132	31	<0,63	<0,63	<0,63	<0,63	5,08	2,54	20,31	20,31	20,31	5,08	162	-	650
KUC140129	32	5,03	20,12	40,23	80,47	10,06	20,12	80,47	80,47	-	40,23	10,06	-	-
KUC140135	33	<0,61	4,88	4,88	39,06	9,77	4,88	4,88	1,22	-	2,44	1,22	-	-
KUC140140	34	<0,64	1,28	1,28	20,51	1,28	5,13	10,25	20,51	-	2,56	1,28	-	328,13
KUC140137	35	<0,63	1,26	1,26	10,06	2,51	2,51	5,03	10,06	161,94	2,51	1,26	-	-
KUC140133	36	4,93	78,91	78,91	78,91	19,73	9,861	78,91	78,91	-	78,91	19,73	-	-
KUC140130	37	1,29	20,7	20,7	41,41	5,18	5,18	5,18	5,18	332,25	5,18	2,59	-	-
KUC140136	38	2,44	19,53	19,53	78,13	9,77	9,77	78,13	78,13	-	78,13	9,77	312,50	-
KUC140141	39	4,88	19,53	19,53	78,13	9,77	4,88	19,53	19,53	-	9,77	4,88	-	312,50
KUC140138	40	5,22	41,80	20,90	83,59	41,80	41,80	83,59	41,80	-	41,80	10,45	334,38	-
Norfloxacın		<0,6	0,6	1,32	5,27	1,32	0,6	2,64	2,64	675	2,64	5,27	-	-
Ciprofloxacın		<0,6	0,6	0,6	1,31	1,31	1,31	2,61	1,31	83,59	1,31	<0,6	-	-

E. coli: Escherichia coli ATCC 25922, Y. pseu: Yersinia pseudotuberculosis ATCC 911, K. pneu: Klebsiella pneumoniae ATCC13883, P. aeu: Pseudomonas aeruginosa ATCC 43288, S. aur: Staphylococcus aureus ATCC 25923, MRSA: Metisiline dirençli S. aureus, E. fae: Enterococcus faecalis ATCC 29212, L. mon: Listeria monocytogenes ATCC43251, L. aci: Lactobacillus acidophilus RSKK O6O29, B. cer: Bacillus cereus Roma 709, M. smeg: Mycobacterium smegmatis ATCC607, C. alb: Candida albicans ATCC 60193, S. cer: Saccharomyces cerevisiae RSKK 251, (-): aktivite yok.

Moleküler modelleme çalışmaları

Antitüberküler etki taramasında en yüksek etkiye ve düşük sitotoksititeye sahip olduğu belirlenen bileşik **35**'in *M. tuberculosis* kaynaklı DNA giraz enzimi ile gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmaları sonucunda enzime $\Delta G = -10.2$ kcal/mol değerinde bir bağlanma enerjisi (ko-kristalize ligand MOX için $\Delta G = -10.9$ kcal/mol) ile yerleştiği tespit edilmiştir. Olası etkileşimleri incelendiğinde bileşik **35**'in karboksilat grubu ile Arg128 amino asidi arasında hidrojen bağı etkileşimleri, Mg²⁺ atomu ile de metal alıcısı olarak yük etkileşimleri tespit edilmiştir. Bileşiğin yapısındaki tiyadiazol halkasının 5.konumunda yer alan sülfamoil grubunun DNA zinciri ile hidrojen bağı etkileşimleri gözlemlenirken korunan su molekülleri ile de hidrojen bağları tespit edilmiştir. Bileşik **35** ile DNA çift zinciri arasındaki hidrofobik pi-pi yığılma etkileşimlerinin de bağlanmaya katkıda bulunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4 Bileşik 35'in (sarı) *M. tuberculosis* DNA giraz enziminin aktif bölgesi ile tespit edilen etkileşimlerin 3D ve 2D gösterimi.

Tablo 2 Bileşik 21-40'in antimikobakteriyel etki bulguları.

Lab Kodu	Bileşik	R ₁	R ₂	MİK (µg/mL)	Sitotoksitite* (% inhibisyon)	DNA süper sarım tayni (IC ₅₀ , µM)
KUC140103	21	adamantil	siklopropil	25	-	-
KUC140107	22	4-metoksifenil	siklopropil	12.5	-	-
KUC140113	23	4-klorofenil	siklopropil	6.25	42.16	-
KUC140117	24	4-bromofenil	siklopropil	>25	-	-
KUC140121	25	4-florofenil	siklopropil	25	-	-
KUC140104	26	adamantil	etil	12.5	-	-
KUC140108	27	4-metoksifenil	etil	>25	-	-
KUC140114	28	4-klorofenil	etil	>25	-	-
KUC140118	29	4-bromofenil	etil	>25	-	-
KUC140122	30	4-florofenil	etil	>25	-	-
KUC140132	31	-H	siklopropil	6.25	21.56	-
KUC140129	32	-CH ₃	siklopropil	>25	-	-

KUC140135	33	-C ₂ H ₅	siklopropil	12.5	-	-
KUC140140	34	-CF ₃	siklopropil	6.25	18.78	-
KUC140137	35	-SO ₂ NH ₂	siklopropil	1.56	9.54	5.6 ± 0.16
KUC140133	36	-H	etil	12.5	-	-
KUC140130	37	-CH ₃	etil	12.5	-	-
KUC140136	38	-C ₂ H ₅	etil	>25	-	-
KUC140141	39	-CF ₃	etil	>25	-	-
KUC140138	40	-SO ₂ NH ₂	etil	12.5	-	-
Siprofloksazin				1.56	31.54	11.2 ± 0.98
Norfloksazin				3.125	22.64	13.56 ± 1.64

*RAW 264.7 hücre dizisinde 25 µg/mL derişimde tayin edilmiştir. (-) : Test edilmedi.

SONUÇLAR

Çalışmamızda 1,3-tiyazol ve 1,3,4-tiyadiazol halka sistemlerine asetamit köprüsü ile bağlanmış 20 adet yeni fluorokinolon türevi **21-40** sentezlenerek yapıları kromatografik ve spektral tekniklerle aydınlatılmıştır. Bileşiklerin antimikrobiyal etkinlikleri Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, *M. smegmatis* ve maya mantarları üzerinde incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin önemli bir kısmı *E. coli* suşuna karşı etkili bulunmuştur. Özellikle 1,3,4-tiyadiazol halkası içeren siprofloksazin türevleri Gram-negatif bakterilere karşı yüksek etkinlik göstermiştir. Yüksek antibakteriyel etkiye sahip bileşiklerin faydalı bir bakteri olan *Lactobacillus acidophilus* ve denenen mantar suşlarına karşı etkili olmaması, antibakteriyel aktivitenin patojen bakterilere karşı seçici olduğunu göstermektedir. Antitüberküler etki taramasında en etkili bulunan bileşikler aynı zamanda *M. smegmatis* suşuna karşı da etki göstermektedir. En yüksek antitüberküler etki, 5-konumunda sülfamoil artığı taşıyan 1,3,4-tiyadiazol halkası içeren siprofloksazin türevi olan **35** no'lu bileşik ile gözlemlendi. Bu bileşiğin *M. tuberculosis* kökenli DNA giraz enzimine karşı IC50 değeri 5,6 µg/mL olarak bulunmuş olup, referans ilaçlar olan siprofloksazin ve norfloksazinden daha etkili oldukları, ayrıca RAW 264.7 hücre dizisinde daha düşük sitotoksisiteye sahip oldukları gözlemlenmiştir. Moleküler modelleme çalışmaları $\Delta G = -10.2$ kcal/mol bağlanma enerjisi ile bileşik **35**'in *M. tuberculosis* DNA giraz enziminin aktif bölgesine bağlanırken Arg128 amino asidinin yanı sıra DNA zinciri bazları ve aktif bölgede korunan su molekülleri ile etkileştiğini ve DNA zinciri ile gerçekleşen hidrofobik etkileşimlerin yanında Mg²⁺ atomu ile karboksilat grubu arasındaki yük etkileşimlerin aktif bölgeye olan afinitiyi arttırdığını ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Türe A, Kulabaş N, Dingiş Sİ, Birgül K, Bozdeveci A, Alpay Karaoğlu Ş, Krishna VS, Sriram D, Küçükgül İ. Design, synthesis and molecular modeling studies on novel moxifloxacin derivatives as potential antibacterial and antituberculosis agents. *Bioorg Chem.* 2019;88:102965.
- [2] Türe A, Karayel KG, Tatar E, Öktem Okullu S, Ünübol N, Taşlı PN, Kocagöz ZT, Şahin F, Küçükgül İ. (2018). Synthesis and evaluation of novel 1,3,4-thiadiazole-fluoroquinolone hybrids as antibacterial, antituberculosis, and anticancer agents. *Turk J Chem;* 42(3): 839-858.
- [3] Kulabaş N, Türe A, Bozdeveci A, Krishna VS, Alpay Karaoğlu Ş, Sriram D, Küçükgül İ. Novel fluoroquinolones containing 2-arylamino-2-oxoethyl fragment: Design, synthesis, evaluation of antibacterial and antituberculosis activities and molecular modeling studies. *J Heterocycl Chem.* 2022;59(5):909-926.
- [4] Alluri KK, Reshma RS, Suraparaju R, Gottapu S, Sriram D. Synthesis and evaluation of 4',5'-dihydrospiro[piperidine-4,7'-thieno[2,3-c]pyran] analogues against both active and dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem.* 2018;26(8):1462-1469.
- [5] Tanwar B, Kumar A, Yogeeswari P, Sriram D, Chakraborti AK. Design, development of new synthetic methodology, and biological evaluation of substituted quinolines as new anti-tubercular leads. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(24):5960-5966.
- [6] Devi PB, Jogula S, Reddy AP, et al. Design of Novel *Mycobacterium tuberculosis* Pantothenate Synthetase Inhibitors: Virtual Screening, Synthesis and In Vitro Biological Activities. *Mol Inform.* 2015;34(2-3):147-159.
- [7] Saxena S, Renuka J, Yogeeswari P, Sriram D. Discovery of Novel *Mycobacterial* DNA Gyrase B Inhibitors: In Silico and In Vitro Biological Evaluation. *Mol Inform.* 2014;33(9):597-609.
- [8] Blower TR, Williamson BH, Kerns RJ, Berger JM. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(7):1706-1713.
- [9] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* 2009;30(16):2785-2791.
- [10] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-461.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: SAG-C-DRP-140115-0002.

3,6-DİSÜBSTİTÜE BENZOKSAZOL-2 (3H)-ON/ BENZOTİYAZOL-2(3H)-ON TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE ALZHEİMER HASTALIĞI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İN VİTRO OLARAK İNCELENMESİ

S14

Merve BARDAKKAYA¹, Deniz S. DOĞRUER²

¹ Biruni Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34010 İstanbul.

² Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

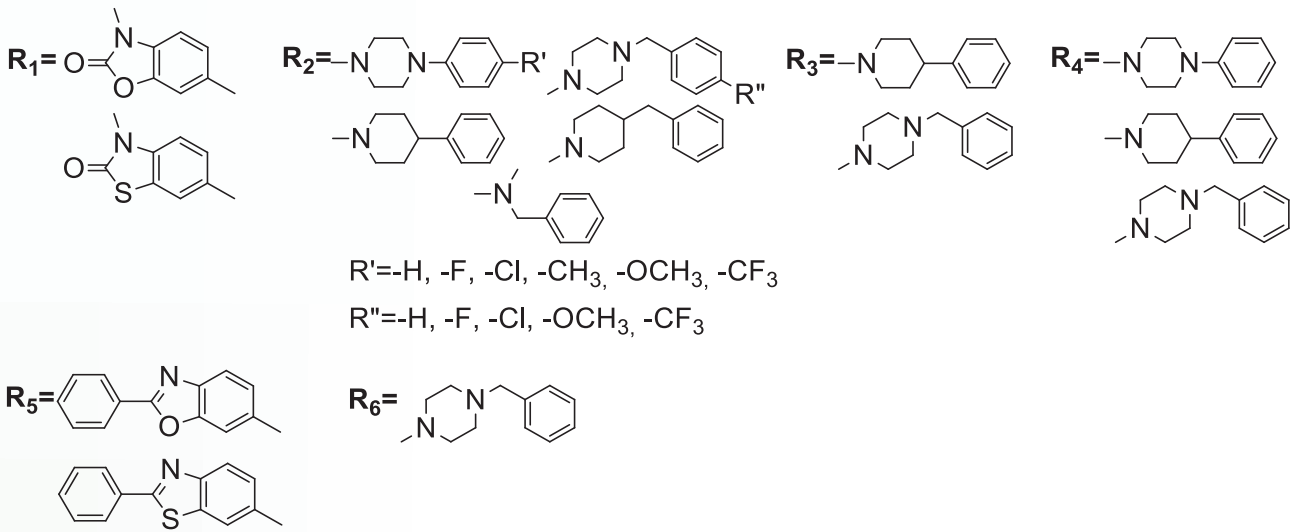
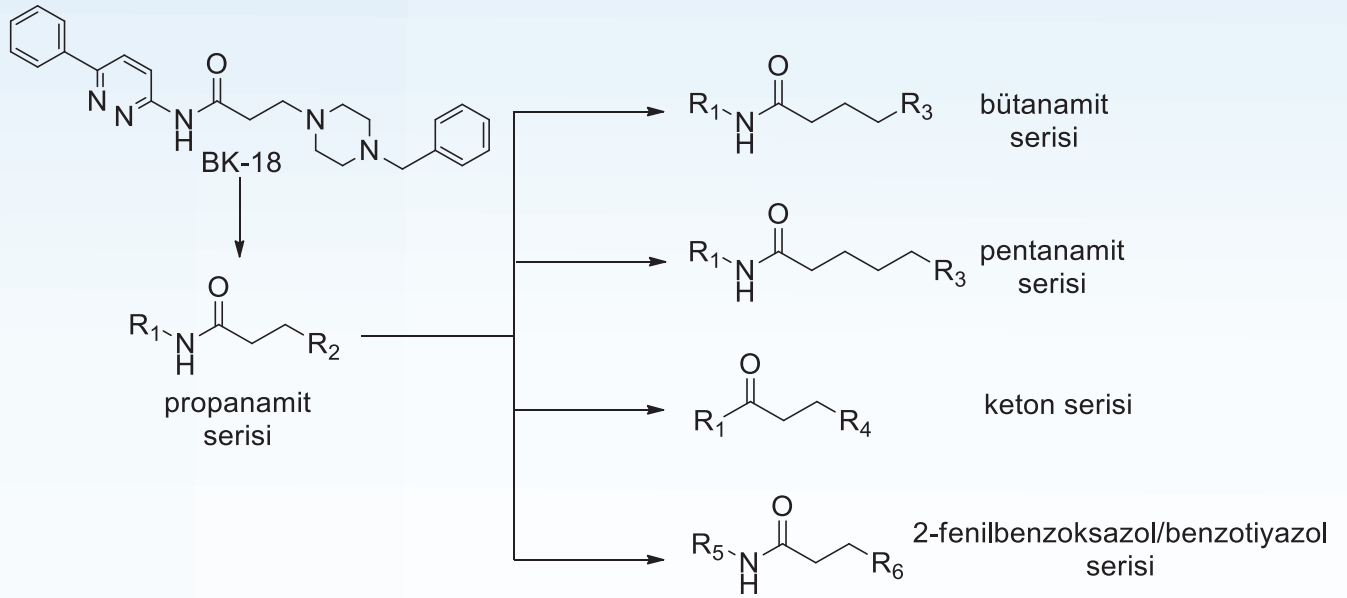
(e-posta: mbardakkaya@biruni.edu.tr)

GİRİŞ

20. yüzyılın başlarından günümüze kadar tıp biliminde yaşanan gelişmeler ve genel olarak toplumların sosyoekonomik düzeyinin iyileşmesi, ortalama yaşam süresinin uzamasına ve Alzheimer hastalığı (AH) gibi yaşa bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların görülme sıklığının artmasına neden olmaktadır. Demansin en yaygın formu olan ve tüm demans vakaların yarısından fazlasını oluşturan AH ise genellikle yaşlılıkla ortaya çıkan, başta unutkanlık olmak üzere çeşitli zihinsel ve davranışsal bozukluklara yol açan, karmaşık ve nedeni tam olarak bilinmeyen ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır [1]. Dünya Alzheimer Raporu 2019 yılı verilerine göre dünya genelinde 50 milyon demans hastası vardır ve bu sayının 2050 yılında üç katına ulaşması beklenmektedir [2]. Bu veriler değerlendirildiğinde vaka sayısı ve bu sayının artış hızı, hastalığın ne kadar kritik ve tedavisinin ne kadar önemli olduğunu vurgulamaktadır. Dolayısıyla dünya genelinde hastalığın tedavisi üzerine yapılan çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir.

2017 yılında grubumuz üyesi Burcu Kılıç tarafından sunulan tez çalışmasında, 3-(4-benzilpiperazin-1-il)-N-(6-fenilpiridazin-3-il) propanamit bileşiğinin (BK-18) 10 µM konsantrasyonda AKE enzimini %55 oranında inhibe ettiği bildirilmiş ve bileşiğin yüksek AKE inhibitör aktivite göstermemesi piridazin halkasının elektronca zengin olmayışı ile ilişkilendirilmiştir [3]. Yapılan literatür incelemelerinde; elektronca zengin halkalara sahip bileşiklerin AKE enziminin PAB ile daha iyi etkileştiği ve bu bölge ile etkileşebilen bileşiklerin Aβ agregasyonunu daha iyi inhibe edebileceği bilgisine ulaşılmıştır.

Bu verilerden hareketle çalışmamızda elektronca zengin olmaları nedeniyle AKE aktif bölgesindeki PAB ile daha iyi etkileşebileceği öngörülen benzoksazolon ve benzotiyazolon halka sistemleri seçilmiştir. Benzoksazolon/benzotiyazolon halka sistemleri ile ilgili olarak grubumuz da dahil olmak üzere günümüze kadar pek çok çalışma yapılmış ve antiinflamatuvar aktivite başta olmak üzere bu halka sistemleri ile ilişkili farklı biyolojik aktiviteye sahip çok sayıda bileşik bildirilmiştir [4-12]. Ayrıca bu halka sistemlerine sahip olan ve günümüzde de kullanılmakta olan ilaçlar da mevcuttur. Tüm bu veriler ışığında sunulan tez çalışmamızda, 3-metil-benzoksazolon ve 3-metil-benzotiyazolon halkalarının 6. konumlarında propanamit yan zinciri taşıyan ve yan zincirin sübstitüe siklik tersiyer amin yapıları ile sonlandığı propanamit türevi 28 bileşik sentez edilmiştir. Sentez edilen propanamit türevi bileşiklerin kolinesteraz inhibitör aktiviteleri Ellman testi ile incelendikten sonra en yüksek AKE ve BKE inhibitör aktiviteye sahip propanamit türevi öncü bileşikler belirlenmiş ve söz konusu bileşikler üzerinde yapılan kimyasal düzenlemeler ile öncü bileşiklerden daha güçlü AKE/BKE inhibitör aktiviteye sahip olabileceğini öngördüğümüz bileşikler sentez edilmiştir. Bu amaca yönelik olarak karbon zincirinin uzatıldığı bütanamit ve pentanamit türevi bileşikler, amit fonksiyonel grubunun keton grubu ile değiştirildiği türevler ve benzoksazolon/benzotiyazolon halkalarındaki karbonil grubunun fenil halkası ile değiştirildiği türevler sentez edilmiştir. Sonuç olarak tez çalışmamızda, benzoksazolon ve benzotiyazolon halkalarına sahip propanamit türevi 28 bileşik ve öncü bileşikler üzerinden yaptığımız yapısal değişiklikler ile elde ettiğimiz 14 bileşik olmak üzere 42 yeni bileşik sentez edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1 Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin yapısı.

GEREÇ VE YÖNTEM

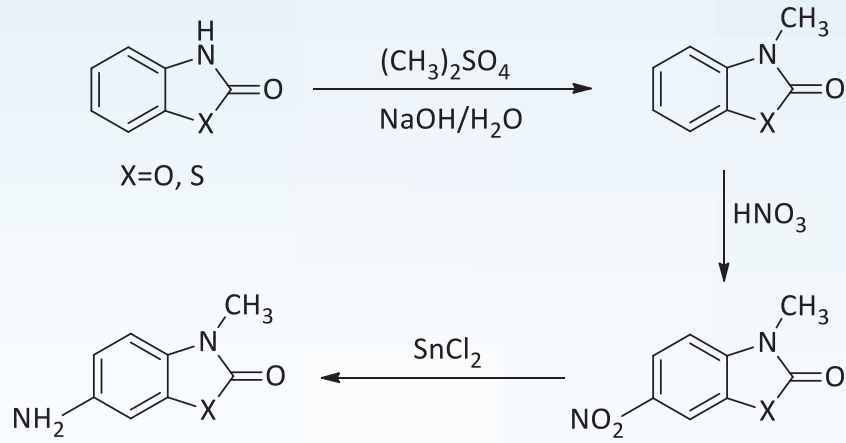
Gereç

Tasarlanan moleküllerin kimyasal sentezleri Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler teknik ve analitik saflıkta olup çeşitli firmalardan temin edilmiştir.

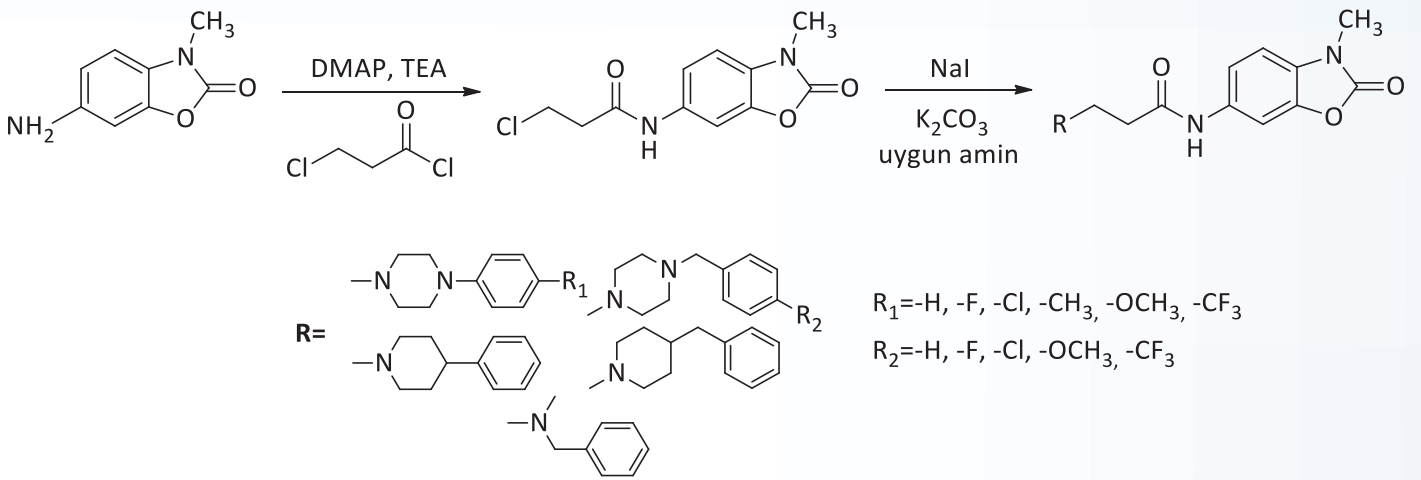
Yöntem

Sentez Yöntemleri

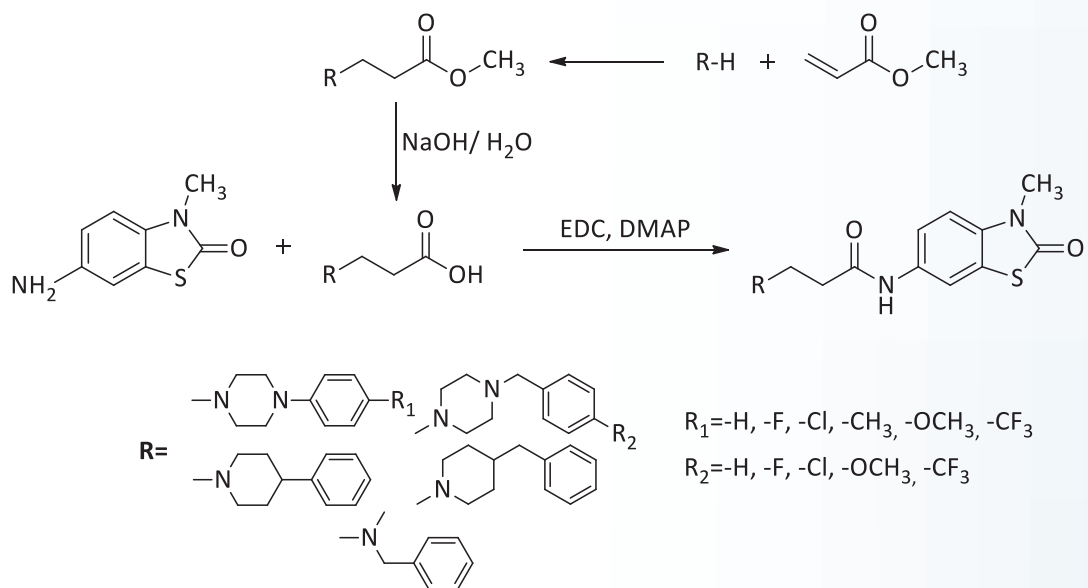
Sentez çalışmalarında kullanılan tüm gereç ve yöntemler ayrıntılı olarak literatürde bildirilmiştir [13].



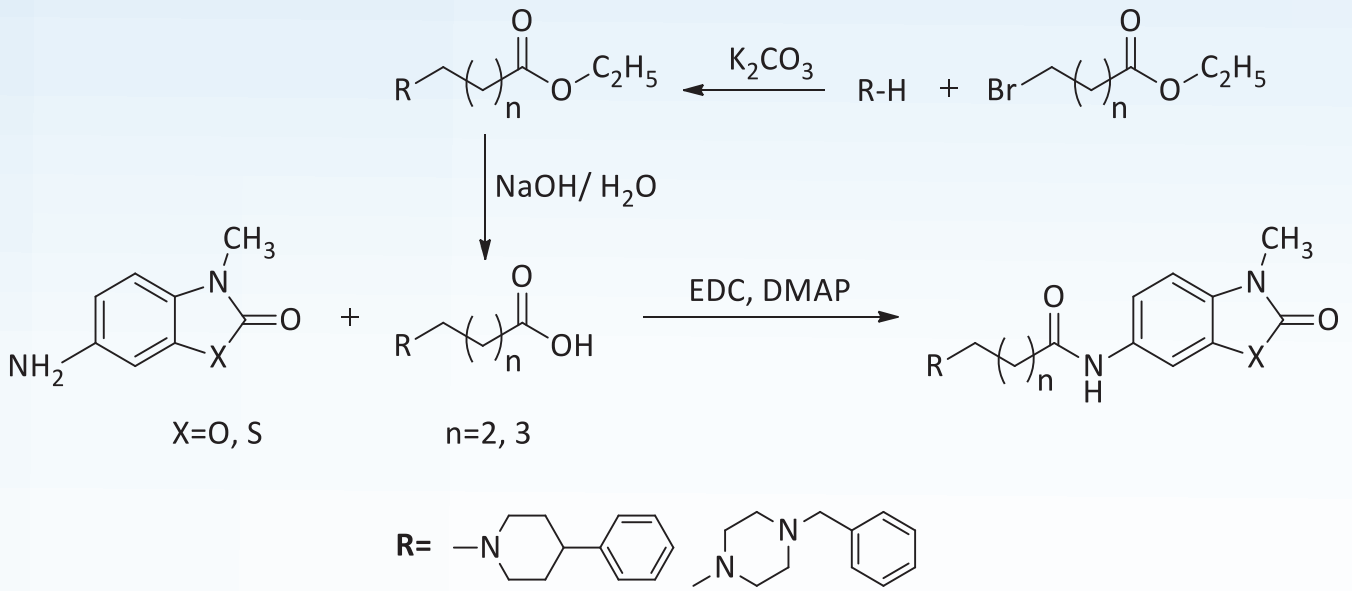
Şekil 2 6-Amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on/6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on sentez şeması.



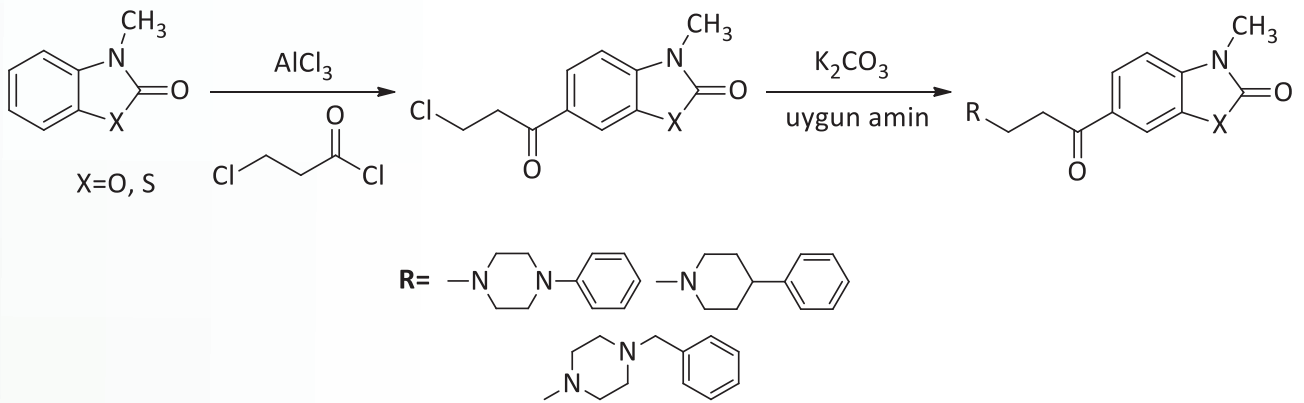
Şekil 3 Benzoksazolone propanamid serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması.



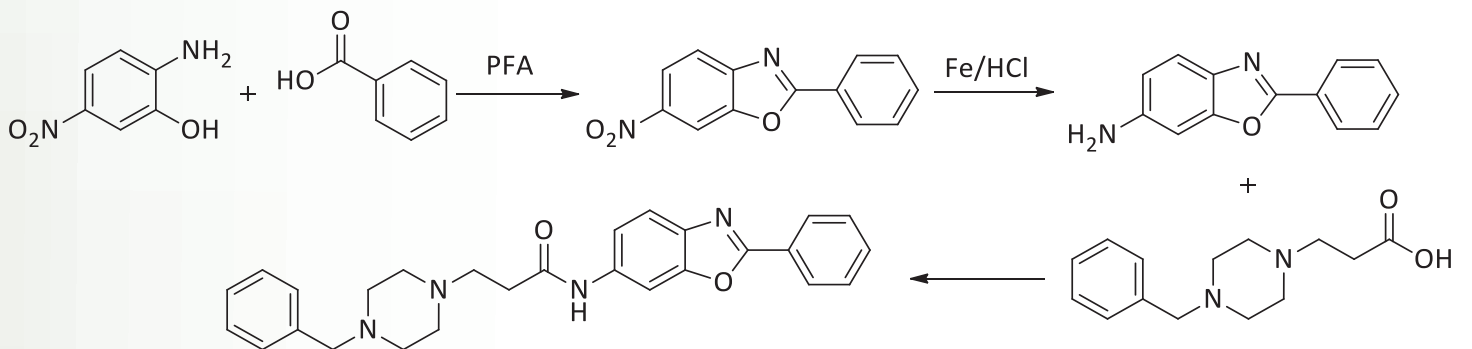
Şekil 4 Benzotiyazolone propanamid serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması.



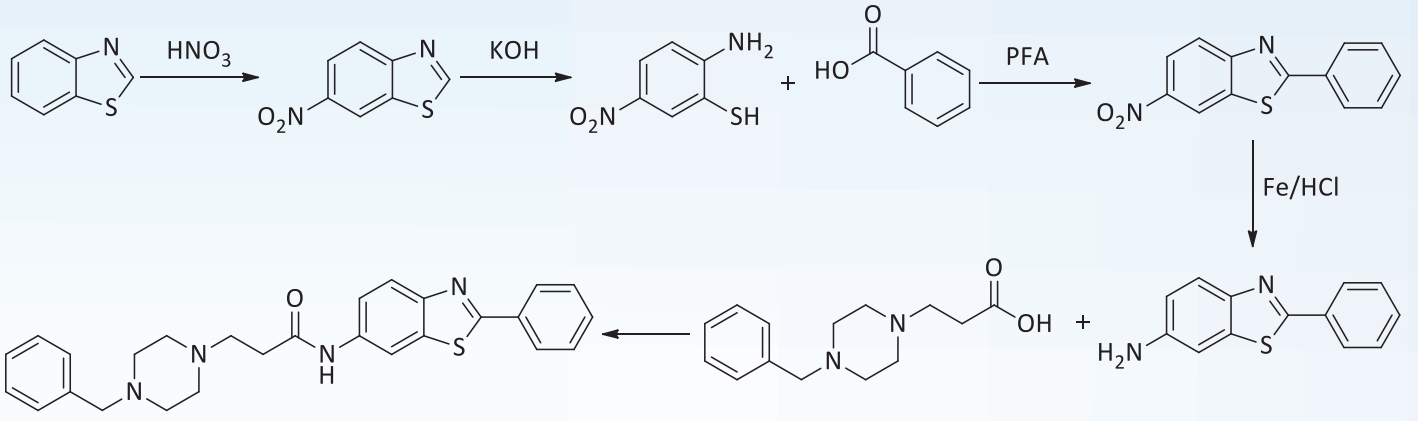
Şekil 5 Bütanamit ve pentanamit serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması.



Şekil 6 Keton serisi sonuç bileşiklerin sentez şeması.



Şekil 7 Bileşik 41'in sentez şeması.



Şekil 8 Bileşik 42'nin sentez şeması.

Enzim inhibisyon çalışmaları

Sentezlerini gerçekleştirdiğimiz bileşiklerin AKE ve BKE inhibitör aktiviteleri, IC50 değerleri ve kinetik çalışmaları spektrofotometrik bir yöntem olan Ellman testi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde asetilkolinesteraz enzimi substrat olarak kullanılan asetiltiyokolini hidroliz eder ve bu hidroliz sonucunda ortaya çıkan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak da bilinen 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asiti (TNB) oluşturur. TNB oluşumu ile açığa çıkan sarı renk 412 nm'de ölçülür, renk şiddeti AKE aktivitesi ile doğru orantılıdır [14].

Sitotoksite çalışmaları

En aktif iki bileşiğin 0.1 , 1 ve 10 µM konsantrasyonları için sitotoksik etki taramaları 3T3 hücre hattı kullanılarak MTT yöntemiyle gerçekleştirilmiş yöntemin ayrıntıları literatürde bildirilmiştir [13].

Antienflamatuvar aktivite çalışması

Sentezlenen bileşikler hücre hattı THP-1 (ATCC® TIB-202™) üzerinde 10 µM son konsantrasyonda, IL-1 beta (Human İnterlökin 1 Beta ELISA Kit, katalog no E0143Hu), IL-6 (Human İnterlökin 6 ELISA Kit, katalog no E0090Hu), TNF-α (Human Tümör Nekrozis Faktör Alpha ELISA Kit, katalog no E0082Hu) ve NO (Human Nitrik Oksit ELISA Kit, katalog no E1510Hu) seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür [13].

Apoptozun flow sitometride Anneksin V bağlanması ile incelenmesi

Bu çalışmada FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen, USA) protokolü uygulandı. Hücreler 72 saat sonunda tripsinize edildikten sonra 800 rpm'de 5 dakika satrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti son konsantrasyon 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde 1X Annexin V Binding Buffer ile çözüldü. Bu süspansiyondan 200µl alındı ve üzerine 1µl AnnexinV-FITC, 5 µl PI ilave edilerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 400µl "Annexin V binding buffer" eklenip vortekslendi ve 30 dakika içinde flow sitometride (BD Accuri Plus) okuma yapıldıktan sonra sonuçlar BD Accuri Software programı kullanılarak analiz edildi [13].

Moleküler docking çalışması

Moleküler kenetlenme (docking) çalışmalarında kullanılan AKE ve BKE enzimlerinin kristal yapıları sırasıyla 1EVE ve 4POI erişim kodlarıyla RCBS protein veri bankasından (<http://www.rcsb.org/pdb>) alınmıştır. Moleküler docking çalışmaları Molecular Operating Environment (MOE) programı ile gerçekleştirilmiştir. Ligand veya enzimden 4.5 Å mesafeden daha uzakta bulunan bağlı bileşikler ve su molekülleri enzimlerin kristal yapısından silinmiştir. Enzim-ligand kompleksi protonlanmış ve AMBER99 kuvvet alanı ile minimize edilmiştir.

Enzim yükleri AMBER99, ligand yükleri ise MMF94X kuvvet alanları kullanılarak saptanmıştır. Enzimlerin aktif bölgesi, MOE yazılımı içerisinde yer alan "site finder" modülü ile tespit edilmiştir. Her bir ligand için enzimin aktif bölgesine en iyi kenetlenen 30 ligand poz, triangle matcher algoritması ile London dG ve GBVI/WSA dG skorlama fonksiyonları kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bütün pozlar incelenmiş ve her bileşiğin en düşük bağlanma enerjisine sahip en iyi skorlanmış pozu ilgili enzimle etkileşimlerinin araştırılması için seçilmiştir [15, 16].

Fizikokimyasal parametre hesaplama çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin ilaç olabilme potansiyellerinin değerlendirilmesi ve farmakokinetik özelliklerinin öngörülebilmesi amacıyla bazı fizikokimyasal parametreleri hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı (MA), logP, topolojik polar yüzey alanı (tPSA), hidrojen bağı akseptör (HBA) sayısı, hidrojen bağı donör (HBA) sayısı ve moleküler hacim değerleri Molinspiration online hesaplama programı kullanılarak elde edilmiştir. Ayrıca bileşiklerin kan beyin bariyeri penetrasyonları admetSAR online programı kullanılarak belirlenmiştir [17].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında, benzoksazol ve benzotiyazol halka sistemlerine sahip 40 bileşik ayrıca benzoksazol ve benzotiyazol yapısında 2 türev olmak üzere 42 yeni bileşik sentez edildi ve yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS ve elementel analiz yöntemleriyle aydınlatıldı.

Sentez çalışmaları

Propanamit, bütanamit ve pentanamit serilerinin sentezinde kullanılan 6-amino-3-metil-1,3-benzoksazol-2(3H)-on/6-amino-3-metil-1,3-benzotiyazol-2(3H)-on türevlerinin sentez yöntemi ortaktır. Öncelikle bazik ortamda ticari olarak mevcut olan 1,3-benzoksazol-2(3H)-on ve 1,3-benzotiyazol-2(3H)-on halkalarının 3. konumu dimetilsülfat yardımıyla metillendi. Sonrasında nitrik asit varlığında optimum sıcaklık belirlenerek 6. konumdan nitrolama tepkimesi yapıldı. Nitrolanmış türevler, kalay klorür ile asit ortamda redüklenerek üç serinin sentezinde kullanılacak olan amin türevleri elde edildi [10, 11].

Benzoksazol halkasının 6. konumunda propanamit yan zinciri taşıyan sonuç ürünlerin sentezinde, öncelikle DMAP ve TEA varlığında kloropropionil klorürle yer değiştirme tepkimesi yapıldı. Elde edilen üründen hareketle sodyum iyodür varlığında bazik ortamda aminlerle yer değiştirme tepkimesinden ise ilk 14 bileşik elde edilmiştir.

Benzotiyazol halkasının 6. konumunda propanamit zinciri taşıyan seri için benzoksazol halkasında kullanılan yöntem denendiğinde sonuç ürünler düşük verimle elde edildi. Bu nedenle bu seri bileşiklerin eldesinde uygun karboksilik asitlerle amitleştirme yapılarak sonuç ürünler elde edildi. Kullanılan karboksilik asitlerin sentezi için öncelikle ester formları hazırlandı. Bunun için metil akrilat ve uygun aminlerin Michael katım tepkimesinden faydalandı. Daha sonra elde edilen esterlerin bazik ortamda hidrolizinden karboksilik asitler hazırlandı. Hazırlanan karboksilik asitlerin, EDC ve DMAP ile diklorometan içinde tepkimesinden de 14 sonuç bileşik sentez edildi. Benzoksazol ve benzotiyazol halkasının 6. konumunda bütanamit ve pentanamit taşıyan türevler, benzotiyazol propanamit serisinde kullanılan amitleştirme yöntemine göre sentezlendi. Bütanamit türevlerinin sentezi için gerekli olan karboksilik asitler, etil 4-bromobütirat ve uygun amin türevinin potasyum karbonat varlığında yer değiştirmesi sonucu oluşan esterin bazik ortamda hidrolizinden elde edildi. Pentanamit türevi bileşiklerin sentezinde kullanılacak karboksilik asitler ise etil 5-bromovalerat yardımıyla aynı yöntemle sentez edilmiştir. Her iki seride de fenilpiperidin yan zincirine sahip bileşikler yalnızca benzotiyazol halka sistemi için sentez edilmiştir.

Keton türevi sonuç bileşiklerin sentez edilebilmesi için öncelikle amit türevlerinin ilk basamağında olduğu gibi 1,3-benzoksazol-2(3H)-on ve 1,3-benzotiyazol-2(3H)-on halkalarının 3. konumu metillendi, ardından alüminyum klorür varlığında kloropropionil klorür ile dimetilformamit içinde açılasyon yapıldı. Elde edilen ürün ile uygun amin türevlerinin yer değiştirme tepkimesinden ise planlanan 6 sonuç bileşik elde edildi.

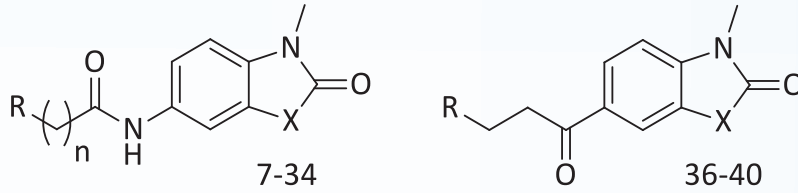
Son olarak, 2-fenilbenzoksazol/benzotiyazol propanamit yapısındaki 2 bileşiğin sentezinde farklı başlangıç maddelerinden yola çıkılmıştır. 2-Fenilbenzoksazol propanamit yapısına sahip bileşik, ticari olarak mevcut 2-amino-5-nitrofenol ve benzoik asitin polifosforik asit içindeki tepkimesinden elde edilmiştir. Elde edilen nitro türevi, demir ve hidroklorik asit varlığında amin türevine indirgenmiştir. Daha sonra amin türevinin, 3-(4-benzilpiperazin-1-il)propanoik asit ile EDC ve DMAP varlığındaki tepkimesinden sonuç ürün elde edilmiştir. 2-Fenilbenzotiyazol eşleniğinin sentezine ise ticari olarak mevcut benzotiyazol halkası nitrolanarak başlandı. Sonrasında

6-nitrobenzotiyazol'ün sulu potasyum hidroksit çözeltisi içinde parçalanmasıyla elde edilen 2-amino-5-nitrotiyofenol'den hareketle 2-fenilbenzoksazol türevinin eldesindeki sentez yolları kullanılarak sonuç bileşik elde edilmiştir.

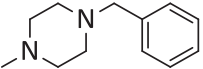
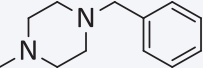
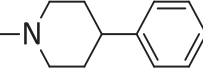
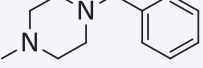
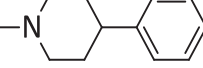
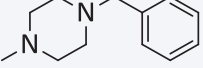
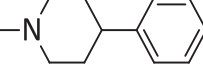
Enzim inhibisyon çalışmaları

Kolinesteraz inhibitör aktivite sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, bileşiklerin AKE inhibitör aktivitelerinin, BKE inhibitör aktivitelerine göre daha iyi olduğu görülmüştür. Tablo 1'de görüldüğü gibi test edilen bileşikler arasında 39, 36, 30 ve 21 sırasıyla en yüksek AKE inhibisyonuna (sırasıyla $IC_{50} = 0.34, 0.89, 1.96, 2.34 \mu M$) sahip bileşiklerdir. Ayrıca bileşik 34, $2.98 \mu M$ 'lık IC_{50} değeri ile en yüksek BKE inhibisyonuna sahip bileşiktir.

Tablo 1 Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları.



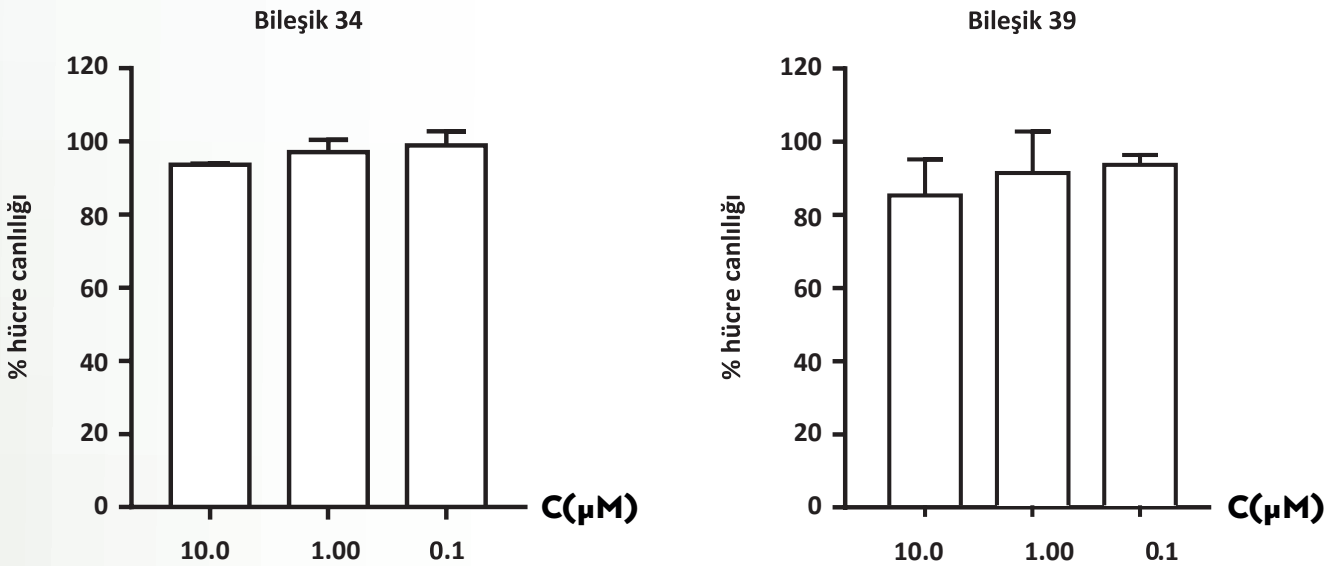
Bileşik	X	n	R	AKE için $IC_{50} \pm SD (\mu M)$	BKE için $IC_{50} \pm SD (\mu M)$
7	O	2		6.94 ± 1.06	-
8	O	2		16.10 ± 0.99	-
13	O	2		24.60 ± 1.15	-
14	O	2		52.40 ± 1.21	-
21	S	2		2.34 ± 0.61	-
22	S	2		7.09 ± 1.09	37.60 ± 1.84
26	S	2		60.30 ± 2.24	11.14 ± 1.07
27	S	2		31.90 ± 1.46	75.38 ± 1.99
28	S	2		49.50 ± 1.54	41.96 ± 1.12
29	O	3		6.00 ± 1.13	-
30	S	3		1.96 ± 0.42	-
31	S	3		-	9.65 ± 1.13

Bileşik	X	n	R	AKE için IC ₅₀ ± SD (µM)	BKE için IC ₅₀ ± SD (µM)
32	O	4		30.86 ± 1.08	-
33	S	4		13.96 ± 1.02	-
34	S	4		-	2.98 ± 1.02
36	O	-		0.89 ± 0.14	-
37	O	-		6.65 ± 1.07	-
39	S	-		0.34 ± 0.16	-
40	S	-		4.32 ± 1.18	13.97 ± 1.15
Donepezil	-	-	-	0.058 ± 0.01	3.70 ± 0.10

(-): inhibitör aktivite yok anlamına gelmektedir.

Sitotoksosite çalışmaları

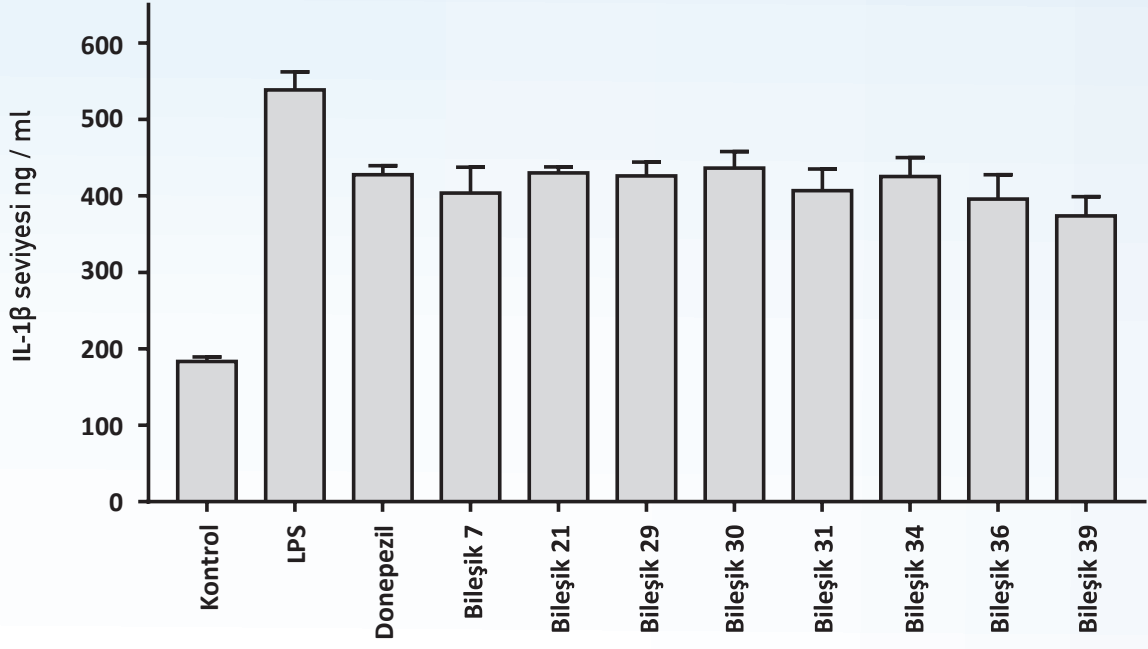
En aktif iki bileşiğin (34 ve 39) aktivite gösterdikleri konsantrasyon aralığında 3T3 hücreleri için sitotoksik olmadıkları bulunmuştur ve Şekil 9 ile sunulmuştur.



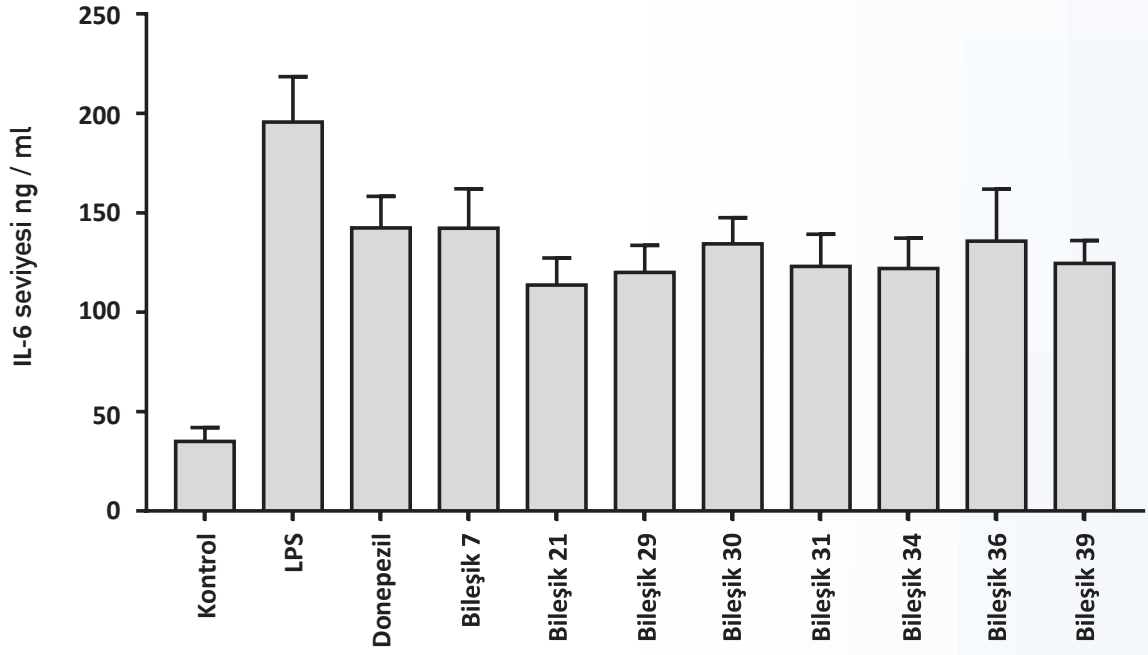
Şekil 9 Bileşik 34 ve 39'nin sitotoksosite sonuçları.

Antienflamatuvar aktivite çalışması

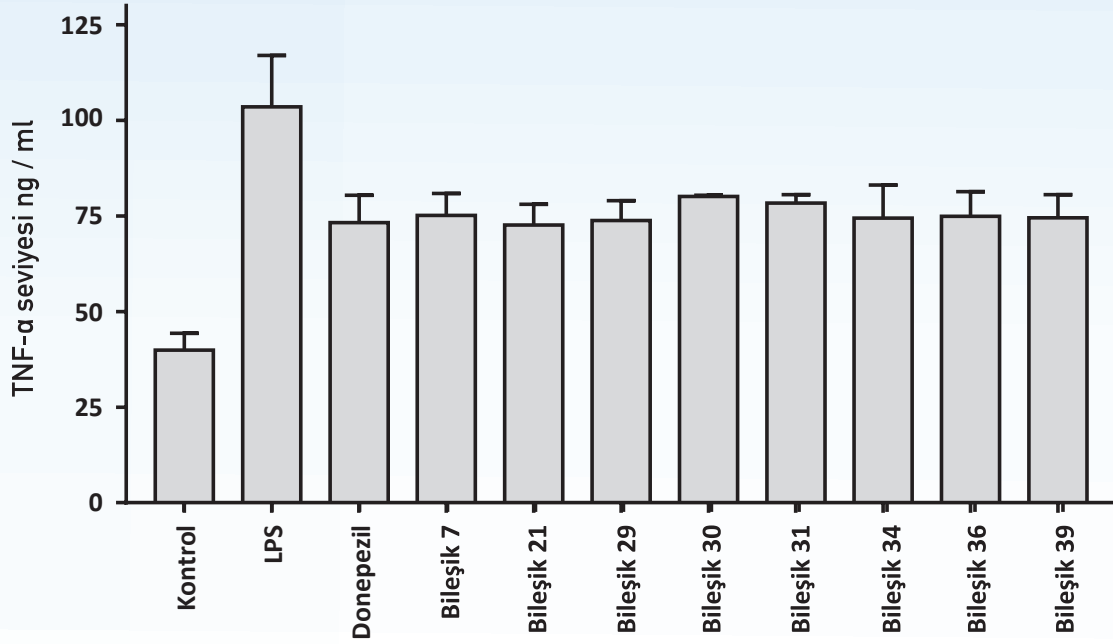
Antienflamatuvar aktivite çalışmasından elde edilen sonuçlara göre bileşik 39'un IL-1β, IL-6 ve TNF-α belirteçlerinin seviyelerini donepezil kadar ve NO belirteci seviyesini donepezilden daha iyi düşürdüğü dolayısıyla daha iyi antienflamatuvar katkı yaptığı in vitro olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 10, 11, 12 ve 13'de sunulmuştur.



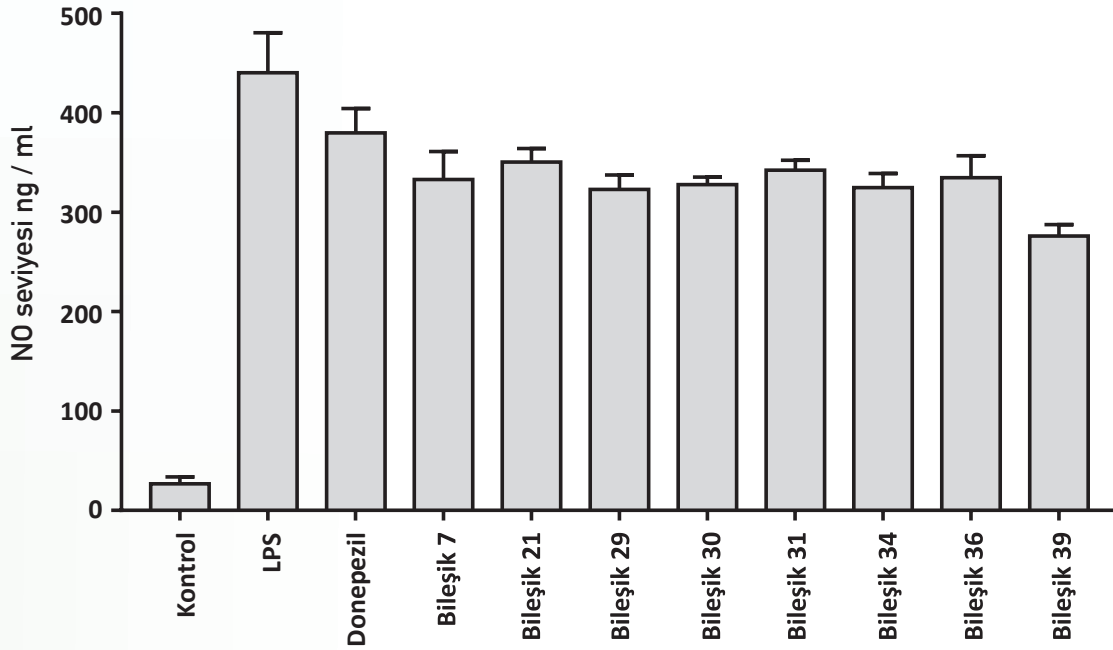
Şekil 10 LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-1 β seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi.



Şekil 11 LPS ile indüklenmiş enflamasyonda İL-6 seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi.



Şekil 12 LPS ile indüklenmiş enflamasyonda TNF- α seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi.



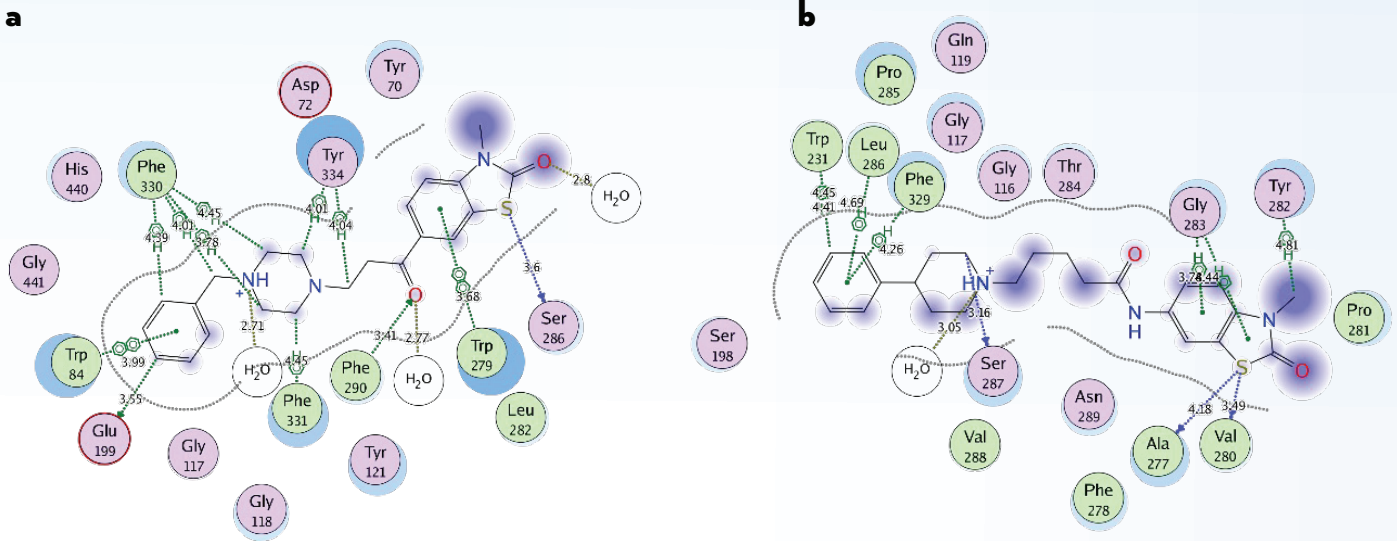
Şekil 13 LPS ile indüklenmiş enflamasyonda NO seviyesine donepezil ve seçilen bileşiklerin etkisi.

Apoptosis bulgularının değerlendirilmesi

İleri aktivite çalışmaları kapsamında seçilen sekiz bileşik (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) annexin V apoptozis deneyi ile 10 μ M konsantrasyonda test edilmiş ve bileşiklerden hiçbirinin apoptozisi indüklemediği ve neredeyse hepsinde (bileşik 7 hariç %89) hücrelerin %90'ın üzerinde canlılık gösterdiği belirlenmiştir.

Moleküler docking çalışmaları

En yüksek AKE (Bileşik 39) ve en yüksek BKE (Bileşik 34) inhibitör aktiviteye sahip iki bileşiğin docking çalışması ile elde edilen aktif bölge etkileşimleri ve bağlanma modları Şekil 14 ile sunulmuştur. Bileşik 39'un docking sonuçları enzimin katalitik bölgesinin yanında periferel anyonik bölgesi ile de etkileşebileceğini (Trp279 ve Tyr334) göstermiştir.



Şekil 14 Bileşik 39'un AKE (a) ve Bileşik 34'ün BKE (b) ile elde edilen docking sonuçları.

Fizikokimyasal parametre hesaplama çalışmaları

Sentez edilen bileşiklerden en aktif olan sekizi (Bileşik 7, 21, 29, 30, 31, 34, 36, 39) seçilerek molekül ağırlığı, logP, topolojik polar yüzey alanı, hidrojen bağı donör sayısı, hidrojen bağı akseptör sayısı ve molekül hacim gibi bazı fizikokimyasal parametreleri hesaplanmıştır. Hesaplanan fizikokimyasal parametreler moleküllerin ilaç olabirliklerini değerlendirmek açısından önem taşımaktadır. Bulgular değerlendirildiğinde sekiz bileşiğin de Lipinski kurallarına tamamen uyduğu ve kan beyin bariyerini geçebilecekleri görülmektedir. Bu sonuca göre tez kapsamında elde edilen aktif moleküllerin farmakokinetik açıdan da ilaç olmaya uygun moleküller olabilecekleri düşünülmektedir.

Tablo 2 Seçilen bileşiklerin hesaplanmış fizikokimyasal parametre bulguları

Bileşik	MA	logP	tPSA	HBA	HBD	Moleküler Hacim	KBB	Kural İhlali
7	394,48	1,99	70,72	7	1	365,65	0,9878	0
21	410,54	2,63	57,58	6	1	374,79	0,9919	0
29	408,50	2,26	70,72	7	1	382,45	0,9807	0
30	424,57	2,90	57,58	6	1	391,59	0,9903	0
31	409,56	4,08	54,34	5	1	378,83	0,9908	0
34	438,60	3,41	57,58	6	1	408,39	0,9908	0
36	379,46	2,33	58,69	6	0	353,25	0,9933	0
39	395,53	2,98	45,55	5	0	362,39	0,9939	0

SONUÇLAR

Kolinesteraz inhibitör aktivite bulguları değerlendirildiğinde, benzotiyazolon halkası taşıyan türevlerin benzoksazolone halkası taşıyan türevlere göre daha aktif olduğu bulunmuştur. Fonksiyonel grup açısından incelendiğinde ise AKE inhibitör aktivite için keton grubunun, BKE inhibitör aktivite açısından ise amit grubunun daha uygun olduğu görülmüştür. Ayrıca amit fonksiyonel grubu taşıyan bileşiklerde optimum zincir uzunluğunun, AKE inhibitör aktivite için dört karbon ve BKE inhibitör aktivite için beş karbon olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgilere ek olarak benzoksazolone ve benzotiyazolon halkalarının 2. konumunda yer alan karbonil grubunun aktivite için gerekli olduğu da belirlenmiştir.

Elde edilen yapı-etki ilişkisi bulguları ışığında, sonraki çalışmalarımızda hastalığın çoklu hedeflerine yönelik yeni bileşiklerin geliştirilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] A. Alzheimer's, 2016 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & Dementia*, 12 (2016) 459-509. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.001>.
- [2] World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia., *Alzheimer's Disease International*, (2019) 1-13.
- [3] B. Kılıç, H.O. Gülcan, F. Aksakal, T. Erçetin, N. Oruklu, E. Ümit Bagriacik, D.S. Doğruer, Design and synthesis of some new carboxamide and propanamide derivatives bearing phenylpyridazine as a core ring and the investigation of their inhibitory potential on in-vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, *Bioorganic Chemistry*, 79 (2018) 235-249. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.05.006>.
- [4] L. Tang, J.-r. Luo, D.-t. Li, R. Ge, Y.-l. Ma, F. Xu, T.-g. Liang, S.-r. Ban, Q.-s. Li, Anti-inflammatory effects of 4-o-methyl-benzenesulfonyl benzoxazolone (MBB) in vivo and in vitro as a novel NSAIDs lead compound, *Pharmacological Reports*, 70 (2018) 558-564. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.12.002>.
- [5] S. Tariq, P. Kamboj, M. Amir, Therapeutic advancement of benzothiazole derivatives in the last decennial period, *Archiv der Pharmazie*, 352 (2019) 1800170. [10.1002/ardp.201800170](https://doi.org/10.1002/ardp.201800170).
- [6] P. Jacques, C. Pascal, C. Evelina, 2(3H)-Benzoxazolone and Bioisosters as "Privileged Scaffold" in the Design of Pharmacological Probes, *Current Medicinal Chemistry*, 12 (2005) 877-885. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867053507388>.
- [7] D.S. Doğruer, S. Ünlü, E. Yeşilada, M.F. Şahin, N-(2-pyridinyl)-2-[2(3H)-benzazolone-3-yl]acetamides: synthesis, antinociceptive and anti-inflammatory activity, *Farmaco*, 52 (1997) 745-750.
- [8] D.S. Doğruer, S. Ünlü, M.F. Şahin, E. Yeşilada, Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of some (2-benzoxazolone-3-yl and 2-benzothiazolone-3-yl) acetic acid derivatives, *Il Farmaco*, 53 (1998) 80-84. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(97\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(97)00017-7).
- [9] T. Önkol, D.S. Doğruer, S. Ito, M.F. Şahin, Synthesis and Antinociceptive Activity of (5-Chloro-2-benzothiazolinon-3-yl)acetamide Derivatives, *Archiv der Pharmazie*, 333 (2000) 337-340. [10.1002/1521-4184\(200010\)333:10<337::AID-ARDP337>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-4184(200010)333:10<337::AID-ARDP337>3.0.CO;2-A).
- [10] Y. Güllök, T. Biçer, F.K. Onurdağ, S. Özgen, M.F. Şahin, D.S. Doğruer, Synthesis of some new urea and thiourea derivatives and evaluation of their antimicrobial activities, *Turkish Journal of Chemistry*, 36 (2012) 279-291. <https://doi.org/10.3906/kim-1106-54>.
- [11] A.S. Ünal, F.K. Onurdağ, S. Özgen, D. Doğruer, T. Önkol, Studies on the synthesis of 3-methyl-6-(substituted-urea/-thiourea)-2(3H)-benzothiazolone derivatives and antimicrobial activities, *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 54 (2015) 253-259.

- [12] B. Çakir, A. Ulucay, D.S. Dogruer, A. Isimer, M.F. Sahin, Synthesis and antinociceptive activity of some 3-substituted benzothiazolone derivatives, *Il Farmaco*, 54 (1999) 846-851. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(99\)00111-1](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(99)00111-1).
- [13] M. Erdogan, B. Kilic, R.I. Sagkan, F. Aksakal, T. Ercetin, H.O. Gulcan, D.S. Dogruer, Design, synthesis and biological evaluation of new benzoxazolone/benzothiazolone derivatives as multi-target agents against Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 212 (2021) 113124. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113124>.
- [14] B. Kılıç, M. Erdoğan, H.O. Gülcan, F. Aksakal, N. Oruklu, E.U. Bağrıaçık, D.S. Doğruer, Design, Synthesis and Investigation of New Diphenyl Substituted Pyridazinone Derivatives as Both Cholinesterase and A β -Aggregation Inhibitors, *Medicinal Chemistry*, 15 (2019) 59-76. <http://dx.doi.org/10.2174/1573406414666180524073241>.
- [15] G. Kryger, I. Silman, J.L. Sussman, Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs, *Structure*, 7 (1999) 297-307. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80040-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80040-9).
- [16] Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products, *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (2003) 41141-41147.
- [17] F. Cheng, W. Li, Y. Zhou, J. Shen, Z. Wu, G. Liu, P.W. Lee, Y. Tang, admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52 (2012) 3099-3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı 115S192 numaralı proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

POTANSİYEL α -GLUKOZİDAZ İNHİBİTÖRÜ BİR GRUP 2-SÜBSTİTÜE-KİNAZOLİNON TÜREVİ BİLEŞİĞİN SENTEZ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

S15

Emre Kadir AYAN¹, Zeynep SOYER²,

¹ İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35620 İZMİR

² Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35100 İZMİR

(emrekadir.ayan@ikcu.edu.tr)

GİRİŞ

Diyabet, yüksek kan glukoz düzeyleri (hiperglisemi) ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki majör alt tipi bulunan diyabet hastalığının etiolojisinde insülin hormonunun pankreastaki beta hücrelerinden salgılanmasındaki bir eksiklik ve/veya dokuların insüline yeterince yanıt verememesi ile sonuçlanan insülin direnci durumu yer almaktadır. Pankreastan yeterli insülin üretilmediğinde ya da üretilen insüline yeterince yanıt oluşturulmadığında, vücut için önemli bir enerji kaynağı olan glukozun kan dolaşımından hücre içine geçişi bozulmakta ve bunun sonucunda hiperglisemi tablosu ortaya çıkmaktadır [1, 2].

Diyabet hastalığı, Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından 2019 yılında yayımlanan 9. ve 2021 yılında yayımlanan 10. Diyabet Atlaslarında “21. Yüzyılın en hızlı büyüyen küresel acil sağlık problemlerinden biri” olarak gösterilmektedir [3, 4]. 2021 yılı itibarıyla dünya genelinde 20-79 yaş aralığında, %45’ini henüz tanı almamış kişilerin oluşturduğu yaklaşık 537 milyon diyabet hastasının bulunduğu tahmin edilmekte ve bu sayı, aynı yaş aralığındaki toplam dünya nüfusunun %9.8’ine karşılık gelmektedir. Ayrıca geleceğe yönelik yapılan tahminlerde, diyabetli insan sayısının 2030’a kadar 643 milyona, 2045’e kadar ise 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Diyabet, dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de en alarm verici hastalıklardan biridir. Ülkemiz 2021 yılı itibarıyla, 20-79 yaş aralığındaki 9 milyon diyabet hastası ve %14.5’lik diyabet prevalans düzeyi ile Avrupa’nın en yüksek istatistiksel rakamlarına sahip ülkesi konumundadır [4].

Diyabet, çok hızlı büyüyen bir sağlık problemi olmasının yanı sıra; uzun süreli hiperglisemi durumlarında kardiyovasküler hastalıklar, nefropati, retinopati ve nöropati gibi ciddi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara aracılık etmesi nedeniyle de önemlidir [5, 6]. Bu komplikasyonlar yaşam kalitesini büyük oranda düşürmekte ve ilerlemiş durumlarda ölümcül olabilmektedir. Diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ölüme sebep olan üçüncü hastalık konumundadır [7]. 2021 yılında dünya genelinde 6.7 milyon insanın diyabet ve diyabetle ilişkili komplikasyonlar nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Bu sayı, aynı yıl tüm nedenlere bağlı olarak meydana gelen ölümlerin %12.2’sine ve her beş saniyede bir insanın ölümüne karşılık gelmektedir [4].

Her geçen gün hızla artan prevalans düzeyi ve aracılık ettiği ölümcül komplikasyonlar nedeniyle diyabetin etkin bir şekilde tedavi edilmesi önemli bir zorunluluk haline gelmiştir. Diyabet tedavisinde hedef, yüksek kan glukoz düzeylerini düşürmek ve bu sayede komplikasyon gelişmesini önlemektir. Yakın bir geçmişe kadar diyabet hastalarında yüksek açlık kan şekeri ana terapötik hedef olarak kabul edilmekte iken son yıllarda bu trend değişmiş ve yemek sonrası oluşan kan glukoz düzeyi yüksekliği anlamına gelen postprandial hipergliseminin kontrol altında tutulması, yüksek açlık kan şekerinin düşürülmesinden daha önemli hale gelmiştir [8]. Bunun nedeni, postprandial hipergliseminin diyabetik komplikasyonlara yüksek açlık kan şekerinden daha fazla aracılık etmesi ve önemli bir kardiyovasküler hastalık riski olarak kabul edilmesidir [9, 10]. Postprandial hipergliseminin kontrolü, diyabetin erken tedavisi ve kronik komplikasyonlarının önlenmesinde kritik bir öneme sahiptir [11]. Bu amaçla tip 2 diyabet tedavisinde kullanılacak en etkili insülin dışı antidiyabetik ilaç sınıfının α -glukozidaz enzim inhibitörleri olduğu bildirilmektedir [12, 13].

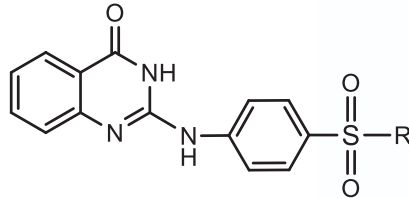
Diyabet hastalığında terapötik bir hedef olan α -glukozidaz enzim ailesi, insanda ince bağırsağın fırça kenarlı membranı üzerinde yerleşmiş olup besinlerle alınan karbohidratların monosakkaritlere parçalanması işleminin son basamağını katalizlemektedir [13-17]. Polimerik yapıları nedeniyle bağırsaktan doğrudan absorblanamayan karbohidratlar bu enzimin aktivitesi sonucunda glukoz monomerlerine parçalanmakta, açığa çıkan glukoz monomerleri bağırsaktan absorbe edilerek postprandial hiperglisemiye neden olmaktadır. α -Glukozidaz enzimi inhibe edildiğinde, karbohidratların glukozla parçalanması yavaşlamakta ve bu sayede glukozun ince bağırsaktan absorpsiyonu geciktirilerek postprandial hiperglisemide etkin bir kontrol sağlanabilmektedir [13, 18].

Günümüzde akarboz, vogliboz ve miglitol olmak üzere yalnızca üç adet α -glukozidaz inhibitörü ilaç tedavide kullanılmaktadır. Her üç ilacın keşfi de 90'lı yıllara uzanmakta olup o yıllardan günümüze kadar herhangi bir bileşik α -glukozidaz inhibitörü klinik aday olarak onaylanmamıştır [19-21]. Çok aşamalı ve yüksek maliyetli proseslerle elde edilerek tedavide kullanılan şeker benzeri bu ilaçların α -glukozidaz inhibitör etkinlikleri düşüktür. Ayrıca bu ilaçlardan bazılarının kullanımında hepatotoksisite ve renal tümör riskinde artış gibi ciddi yan etkiler rapor edilmiştir [22-24]. Sözü edilen tüm bu nedenlerden dolayı güvenlik profili yüksek, daha etkili ve daha az maliyetle elde edilebilecek yeni α -glukozidaz inhibitörü ilaçlara ihtiyaç duyulmakta, dünyanın farklı ülkelerinden araştırmacıların konuya yoğun ilgisi bulunmaktadır [23-25].

Potansiyel α -glukozidaz inhibitörü bileşiklerin geliştirilmesine yönelik olarak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, farklı çekirdek yapılarına sahip bileşiklerin yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite sergiledikleri rapor edilmiştir [21, 26, 27]. Bu bileşikler arasında kinazolinon ve benzensülfonamit yapılarını içeren bileşikler de bulunmaktadır [15, 28-31]. 2015 Yılında Javaid ve arkadaşları ile 2017 yılında Wei ve arkadaşları tarafından yapılan iki farklı çalışmada, bir grup 2-arilkinazolin-4(3H)-on türevi bileşiğin yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [28, 31]. Seo ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise, benzensülfonamit-şalkon türevi bazı bileşiklerin güçlü α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları incelendiğinde; benzensülfonamit yapısı içermeyen türevlerin, karşılık gelen benzensülfonamit türevlerine göre ya çok düşük aktivite gösterdikleri ya da hiç aktivite göstermedikleri tespit edilmiş ve benzensülfonamit yapısının biyolojik aktivitede kritik bir öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır [30].

Kinazolinon ya da benzensülfonamit yapılarını taşıyan bileşiklerin yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği literatürde kayıtlı olmasına karşın, her iki yapıyı birlikte içeren bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktivitelerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışma şimdiye kadar bildirilmemiştir. Bu noktadan hareketle tez çalışmamızın kapsamını, potansiyel aktif kinazolinon ve benzensülfonamit yapılarını tek bir molekülde içeren bir grup kinazolinon-benzensülfonamit türevi bileşiğin tasarımı, sentezi ve α -glukozidaz inhibitör aktivitelerinin araştırılması oluşturmaktadır.

Hedef bileşiklerin tasarımında, iki ya da daha fazla farmakoforum birleştirilerek yeni aktif bileşiklerin elde edildiği moleküler hibridizasyon yöntemi kullanılmıştır. Buna göre, sülfonamit azotunda alifatik/aromatik/heteroaromatik gruplar taşıyan ya da sülfonamit azotunun heterosiklik bir halkanın üyesi olduğu benzensülfonamit yapılarının, kinazolin-4(3H)-on çekirdeğine amin köprüsü vasıtasıyla bağlanmasıyla oluşturulan ve α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri yönünden test edilen final bileşiklerinin kimyasal yapıları **Şekil 1**'de gösterilmiştir.



- | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| (1) R= amino | (12) R= (2-nitrofenil)amino | (23) R= (4-metilfenil)amino |
| (2) R= metilamino | (13) R= (2-klorofenil)amino | (24) R= (4-nitrofenil)amino |
| (3) R= etilamino | (14) R= (2-karboksifenil)amino | (25) R= (4-klorofenil)amino |
| (4) R= fenetilamino | (15) R= (3-hidroksifenil)amino | (26) R= (4-bromofenil)amino |
| (5) R= 1-pirolidinil | (16) R= (3-metoksifenil)amino | (27) R= (4-karboksifenil)amino |
| (6) R= 1-piperidinil | (17) R= (3-metilfenil)amino | (28) R= (3,5-dimetoksifenil)amino |
| (7) R= 4-morfolinil | (18) R= (3-nitrofenil)amino | (29) R= (3,4,5-trimetoksifenil)amino |
| (8) R= fenilamino | (19) R= (3-klorofenil)amino | (30) R= (2-piridil)amino |
| (9) R= (2-hidroksifenil)amino | (20) R= (3-karboksifenil)amino | (31) R= (4-metil-2-piridil)amino |
| (10) R= (2-metoksifenil)amino | (21) R= (4-hidroksifenil)amino | (32) R= (5-kloro-2-piridil)amino |
| (11) R= (2-metilfenil)amino | (22) R= (4-metoksifenil)amino | (33) R= (2-tiyazolil)amino |

Şekil 1. Sentezlenen ve α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri yönünden test edilen final bileşiklerinin (1-33) kimyasal yapıları.

Tasarımı ve sentezi gerçekleştirilen 33 adet kinazolinon-benzensülfonamit türevi hibrit bileşiğin yapıları IR, ¹H ve ¹³C-NMR, kütle spektroskopik yöntemleriyle teyit edilmiştir. Bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak in vitro olarak tayin edilmiştir. Bunlara ek olarak, biyolojik aktif bileşiklerin enzim inhibisyon mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, farklı özellikteki sübstitüente sahip en yüksek aktivite sergileyen iki bileşiğin enzim inhibisyon kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Sentez çalışmaları çeşitli firmalardan temin edilen yüksek saflıktaki kimyasal ve çözücüler ile gerçekleştirildi. Biyolojik çalışmalarda Sigma Aldrich firmasından temin edilen *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı α -glukozidaz enzimi, substrat olarak TCI firmasından satın alınan p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid bileşiği ve referans olarak Acros firmasından temin edilen akarboz bileşiği kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümler 96 kuyucuklu mikropilaya içerisinde, mikropilaya okuyucu cihaz yardımı ile alındı. İstatistiksel hesaplamalarda Microsoft Excell, GraphPad Prism 6 ve SigmaPlot 13.0 programlarından yararlanıldı.

Yöntem

Sentez Çalışmaları

Final bileşikleri (1-33), her biri üçer basamaklı sentez yöntemi ile hazırlanan 2-klorokinazolin-4(3H)-on ara ürünü ile uygun 4-aminobenzensülfonamid türevi ara ürünlerin reaksiyona sokulması ile elde edildi. Final bileşiklerinin yapıları spektroskopik (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve Kütle) yöntemler yardımıyla teyit edildi.

2-Klorokinazolin-4(3H)-on ara ürününün sentezi

Antranilik asit (7.3 mmol) ve ürenin (73 mmol) 160 °C'de 5 saat boyunca kuru kuruya karıştırılmasıyla kinazolin-2,4(1H,3H)-dion bileşiği elde edildi [32]. Ardından bu bileşik (2 mmol), fosfor oksiklorür (POCl₃, 16 mmol) ile 105-110 °C'de 5 saat süre ile dimetilanilin (0.15 ml) varlığında kaynatılarak 2,4-diklorokinazolin bileşiği sentezlendi [33]. Son basamakta 2,4-diklorokinazolin (2 mmol), 1M NaOH çözeltisi (3 ml) ile 3 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı ve 2-klorokinazolin-4(3H)-on ara ürünü elde edildi [34].

4-Aminobenzensülfonamid türevi ara ürünlerin sentezi

Asetanilit bileşiği (14.8 mmol) klorosülfonik asit (78.27 mmol) ile 60 °C'de 30 dakika boyunca karıştırılarak 4-asetamidobenzensülfonil klorür bileşiği elde edildi [35]. İkinci basamakta farklı bileşikler için iki ayrı yöntem kullanıldı. Yöntemlerden ilkinde uygun amin bileşiği (20 mmol), 4-asetamidobenzensülfonil klorür (16 mmol) ile piridin (129 mmol) içerisinde reaksiyona giren maddelerden biri tükenene kadar oda sıcaklığında karıştırıldı [36]. İkinci yöntemde ise uygun amin (20 mmol), 4-asetamidobenzensülfonil klorür (22 mmol) ile diklorometan (50 ml) - piridin (2 ml) karışımı içerisinde, başlangıç maddelerinden biri tükenene kadar oda sıcaklığında karıştırıldı [37]. Her iki yöntem sonucunda elde edilen 4-asetamidobenzensülfonamid bileşiklerinin 5M NaOH (20 ml) - metanol (12 ml) karışımı içerisinde 70°C'de 3 saatlik hidroliz reaksiyonu sonucunda 4-aminobenzensülfonamid türevi ara ürünler elde edildi [36].

Final Bileşiklerinin (1-33) Sentezi

2-klorokinazolin-4(3H)-on bileşiği (1 mmol) ile uygun 4-aminobenzensülfonamid türevi ara ürün (1 mmol), 105-110 °C'de 2-propanol, etanol-su ya da aseton-su karışımları içerisinde, reaksiyona giren maddelerden biri tükenene kadar karıştırıldı ve çeşitli çözücü karışımlarından kristallendirilerek final bileşikleri (1-33) elde edildi [38].

Biyolojik Çalışmalar

α -Glukozidaz İnhibitör Aktivite Tayini

Test bileşiklerinin DMSO içerisinde çözülmesi ve ultra saf su ile yarı-yarıya seyreltilmesiyle hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerinden kuyucuklara 30 μ L eklendi. Ardından enzimin tampondaki (pH:6.8 fosfat tamponu) 71.4 mU/ml'lik çözeltisinden 70 μ L eklenerek 37 °C'de 5 dk. inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklara substratın tampondaki 2.5 mM'lık çözeltisinden 50 μ L eklendi ve 405 nm dalga boyunda 10 dk.boyunca eşit aralıklarla ölçümler alındı. Standart olarak DMSO (Total hacmin %10'u), referans olarak akarboz kullanıldı ve ölçümler üç kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerinin, standart ve her bir test bileşiği konsantrasyonu için zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen lineer doğruların eğimleri belirlendi. % İnhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Standart doğrusunun eğimi} - \text{Test bileşiği doğrusunun eğimi}}{\text{Standart doğrusunun eğimi}} \times 100$$

IC50 değerlerinin belirlenmesinde yukarıdaki formülden elde edilen % inhibisyon değerleri, test bileşiği konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi. $r^2 > 0.95$ olmak şartıyla, lineer regresyon analiziyle doğru denklemi belirlendi ve IC50 değerleri hesaplandı [39].

Enzim İnhibisyon Kinetik Çalışmaları

Enzim inhibisyon kinetik çalışmasına dahil edilen test bileşiklerinin ve substratın farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Mikroplaka kuyucuklarına ekim işlemi ve spektrofotometrik ölçümlerde biyolojik aktivite tayini ile aynı yöntem kullanıldı. Standart ve farklı konsantrasyonlardaki test bileşikleri için, farklı substrat konsantrasyonlarının her birinde ölçülen absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek ayrı ayrı hız değerleri hesaplandı ($r^2 > 0.99$). Hesaplanan bu hız değerleri substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi ve Michaelis-Menten eğrisi oluşturuldu. Michaelis-Menten Sabiti (K_m) ve Maksimal hız ($V_{maks.}$) değerleri bu eğriden hesaplandıktan sonra hız değerlerinin tersi ($1/V$), substrat konsantrasyonlarının tersi ($1/S$) ile yeniden grafiğe geçirilerek Lineveaver-Burk doğrusu elde edildi ve test bileşiklerinin enzim inhibisyon modelleri belirlendi. Hangi enzim inhibisyon modelinin istatistiksel olarak daha anlamlı olduğunun belirlenmesinde, modellerin her biri için SigmaPlot 13.0 programından elde edilen r^2 ve Akaike İndeksi (AICc) değerlerinin karşılaştırılmalarından yararlandı [40].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmamız kapsamında daha güvenli ve daha etkili yeni α -glukozidaz inhibitörü ilaçlara duyulan gereksinim dikkate alınarak 33 adet kinazolinon-benzensülfonamid türevi hibrit bileşiğin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde tasarlanan bileşiklerin türevlendirilmesinde sülfonamid azot atomu üzerindeki süstitüsyon özelliğinin aktivite üzerindeki olası etkilerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla sülfonamid azotu üzerinde farklı zincir uzunluğuna sahip alkil gruplarını içeren türevler, azot atomunu bir heterosiklik halkanın üyesi olarak taşıyan türevler ve azot atomuna bağlı aromatik/heteroaromatik halka üzerinde farklı elektronik ve sterik özelliklere sahip süstitüentleri içeren türevler sentezlenmiştir.

Final bileşikleri (1-33), her biri üç basamaklı sentez yöntemleriyle hazırlanan 2-klorokinazolin-4(3H)-on ara ürünü ile 4-aminobenzensülfonamid türevi ara ürünlerin reaksiyona sokulması ile elde edilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin yapıları spektral (IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Kütle) analiz yöntemleriyle teyit edilmiştir.

Çalışmamızda sentezlenen 1 ve 30 No.lu bileşikler dışında kalan 31 adet bileşik yeni olup; sentezleri, spektral bulguları ve biyolojik aktiviteleri ilk kez bu tez çalışması kapsamında rapor edilmektedir. 1 ve 30 No.lu bileşikler ise Chemical Abstract Service (CAS)'a sırasıyla 1011942-99-6 ve 1011691-35-2 numaralarıyla kayıtlı olmakla birlikte herhangi bir bilimsel referansta yer almamaktadır. Bu bileşiklerin sentezleri, spektral bulguları ve biyolojik aktiviteleri de yine ilk kez tarafımızca bildirilmektedir.

Spektral bulgular ve tartışma

2-Klorokinazolin-4(3H)-on bileşiği ile 4-aminobenzensülfonamid türevi ara ürünlerin tepkimesi sonucunda hazırlanan 1-33 No.lu final bileşiklerinin oluştuğunu gösteren en önemli IR bulguları, bileşiklerin yapısında yer alan kinazolinon halkası, sekonder amin yapısı ve sülfonamid fonksiyonuna ait bantların varlığıdır. Bileşiklerin IR spektrumları incelendiğinde C=O gerilme, N-H gerilme-eğilme ve S=O asimetrik-simetrik gerilme bantları literatür ile uyumlu olarak tespit edilmiştir [41, 42].

Sentezi gerçekleştirilen final bileşiklerinin oluştuğuna dair destekleyici en önemli bulgular bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarından elde edilmiştir. Final bileşiklerinin DMSO- d_6 içerisinde alınan $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde, bileşiklerin yapısında yer alan protonlara ait rezonans sinyalleri beklenen bölünmelerde ve entegrasyon değerlerinde, literatürde belirtilen kimyasal kayma değerleri ile uyumlu olarak gözlenmiştir.

Final bileşiklerinin yapı teyidinde yararlanılan diğer bir NMR yöntemi de ^{13}C -NMR analizleridir. DMSO- d_6 içerisinde alınan ^{13}C -NMR spektrumları incelendiğinde, hedef bileşiklerimizin kimyasal kaymaları beklenen değerlerde izlenmiştir [41, 43, 44].

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin kütle spektrumları, moleküler iyon pikinin daha belirgin izlendiği tespit edilen ESI (Elektrosprey iyonizasyon) metodu kullanılarak negatif/pozitif modda alınmıştır. Kütle spektrumları incelendiğinde, bileşiklerimizin tamamı için $[\text{M}+\text{H}]^+$ veya $[\text{M}-\text{H}]^-$ moleküler iyon piklerinin farklı bağl bolluklarda, hesaplanan ve beklenen molekül ağırlıklarıyla tam bir uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

α -Glukozidaz inhibitör aktivite bulguları ve tartışma

Sentezlenen bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak in vitro olarak tayin edilmiştir. Sonuçlar, bu grup bileşiklerin belirgin bir α -glukozidaz inhibitör aktivite taşıdığını göstermektedir. Buna göre, bileşiklerin 13'ü 129.2-558.7 μM arasında değişen IC_{50} değerleri ile referans bileşik akarbozdan ($\text{IC}_{50} = 814.3 \pm 13.5 \mu\text{M}$) daha yüksek aktivite göstermiştir. Bileşiklerin 9'unda ise α -glukozidaz inhibitör aktiviteye rastlanmamıştır.

Biyolojik aktivite çalışmalarının en önemli sınırlılığını, bileşiklerin tampon çözelti içerisindeki çözünürlüğünün kısıtlı olması ve buna bağlı olarak gelişen çökme sorunu oluşturmuştur. Bileşiklerin 11'inde çözünürlük sorunu nedeniyle yeterince yüksek % inhibisyon gösteren konsantrasyonlara çıkılamadığından, aktivite sonuçları IC_{50} değeri olarak değil, bu bileşikler için çalışılabilen en yüksek konsantrasyonlar olan 50 ve 100 μM 'daki % inhibisyon değerleri olarak verilmiştir. Bu konsantrasyonlarda tespit edilen % inhibisyon değerleri, aynı konsantrasyondaki akarboz referans bileşiğinin % inhibisyon değerlerine yakın ya da ondan daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, çözünürlük problemi nedeniyle IC_{50} değerleri saptanamayan bu bileşiklerin de α -glukozidaz inhibitör aktivite potansiyeline sahip olabileceğini göstermesi açısından dikkat çekicidir.

IC_{50} değeri tespit edilen bileşiklerin biyolojik aktivite sonuçları incelendiğinde, sülfonamid azotu üzerindeki sübtitüentin alifatik ya da aromatik karakterde olmasına bağlı olarak aktivitede önemli değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir. Sülfonamid azotuna sübtitüe fenil halkası bağlı olan türevlerde ise fenil halkasındaki sübtitüentin elektron çekici ya da elektron verici özelliğine bağlı olarak, meta veya para konumlanmalar arasında biyolojik aktivite değişimleri açısından belirgin bir korelasyon bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Enzim inhibisyon kinetik bulguları ve tartışma

α -Glukozidaz enzimine karşı inhibitör aktivite gösteren bileşiklerin enzim inhibisyon tipinin belirlenmesi amacıyla, farklı elektronik özellikte sübtitüent taşıyan en aktif iki bileşik ile enzim inhibisyon kinetiği çalışması gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin her ikisinin de, enzim-substrat kompleksine olan afinitelerinin serbest enzime olan afinitelerinden daha yüksek olduğu karışık tipte inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. Allosterik yöre üzerinden gerçekleşen bu inhibisyon modeli, molekül yapısı enzimin doğal substratlarına benzemeyen inhibitör bileşiklerden beklenen inhibisyon mekanizması ile uyumludur [45].

SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında 33 adet kinazolinon-benzensülfonamid türevi hibrit bileşik sentezlenmiş ve α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri yönünden test edilmiştir. Test edilen bileşikler içerisinde yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite gösteren bileşiklerin bulunması, ileride planladığımız çalışmalar için umut verici sonuçlar olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları, sülfonamid azotundaki sübtitüsyonun bu genel yapıdaki bileşiklerde aktivite açısından kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir. Tez çalışmamızdan elde edilen verilerin, potansiyel α -glukozidaz inhibitörü yeni bileşiklerin tasarımında araştırmacılara yol gösterici olacağı ve bileşiklerin ilk kez bu çalışma ile rapor edilmesine bağlı özgün değeri ile de literatüre önemli katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızın devamında, yüksek α -glukozidaz inhibisyonu gösteren bileşiklerin enzim ile etkileşim biçimlerinin yapılacak moleküler modelleme çalışmaları ile ortaya çıkarılması ve diyabette farklı hedeflere yönelik mekanizmalardaki etkilerinin araştırılmasını da içeren yeni çalışmaların gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Elde edilen veriler ışığında, sülfonamid azotunda farklı özellikte sübtitüent içeren daha fazla sayıda kinazolinon-benzensülfonamid hibrit bileşiğinin tasarımı, sentezi ve α -glukozidaz inhibitör aktivitelerinin değerlendirilmesi de ilerideki hedeflerimiz arasında yer almaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Maqbool M, Munir A, Puri DBI. Managing Diabetes Mellitus: A Way Forward. *Indo Am J Pharm Sci.* 2019;06(02):4365–4372.
- [2] American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020;43(1):14–31.
- [3] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 9th Edition.* 2019.
- [4] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 10th Edition.* 2021.
- [5] Naureen S, Chaudhary F, Munawar MA, Ashraf M, Hamid S, Khan M. Biological evaluation of New imidazole derivatives tethered with indole moiety as Potent α -Glucosidase Inhibitors. *Bioorg Chem.* 2017;76:365–369.
- [6] Chaudhary F, Naureen S, Ashraf M, al Rashida M, Jahan B, Munawar MA, Khan MA. Imidazole-Pyrazole Hybrids: Synthesis, characterization and in-vitro bioevaluation against α -glucosidase enzyme with molecular docking studies. *Bioorg Chem.* 2018;82:267–273.
- [7] Hameed S, Kanwal, Seraj F, Rafique R, Chigurupati S, Wadood A, Ur Rehman A, Venugopal V, Salar U, Taha M, Khan KM. Synthesis of benzotriazoles derivatives and their dual potential as α -amylase and α -glucosidase inhibitors in vitro : Structure-activity relationship, molecular docking , and kinetic studies. *Eur J Med Chem.* 2019;183:1–24.
- [8] Park J, Park J, Seo Y-W, Han J. 5,7-Dimethoxy-3-(2'-hydroxybenzyl)-4-chromanone inhibits α -glucosidase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur J Pharmacol [Internet].* 2019;863:1–7.
- [9] Joshi SR, Standl E, Tong N, Shah P, Kalra S, Rathod R. Therapeutic potential of α -glucosidase inhibitors in type 2 diabetes mellitus : an evidence-based review. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(13):1959–81.
- [10] Raju BC, Tiwari AK, Kumar JA, Ali AZ, Agawane SB, Saidachary G, Madhusudana K. α -Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(1):358–365.
- [11] Chen X, Hussain S, Parveen S, Zhang S, Yang Y, Zhu C. Sulfonyl Group-Containing Compounds in the Design of Potential Drugs for the Treatment of Diabetes and Its Complications. *Curr Med Chem.* 2012;19:3578–3604.
- [12] Cai CY, Rao L, Rao Y, Guo JX, Xiao ZZ, Cao JY, Huang ZS, Wang B. Analogues of xanthenes-chalcones and bis-chalcones as α -glucosidase inhibitors and anti-diabetes candidates. *Eur J Med Chem.* 2017; 130:51–59.
- [13] Islam SM, Barakat A, Al-majid AM, Ali M, Yousuf S, Choudhary MI, Khalil R, Ul-Haq Z. Catalytic asymmetric synthesis of indole derivatives as novel α -glucosidase inhibitors in vitro. *Bioorg Chem.* 2018;79:350–354.
- [14] Nazir M, Abbasi MA, Rehman A, Siddiqui ZS, Khan KM, Kanwal, Salar U, Shahid M, Ashraf M, Lodhi MA, Khan FA. New indole based hybrid oxadiazole scaffolds with N -substituted acetamides : As potent anti-diabetic agents. *Bioorg Chem.* 2018;81:253–263.
- [15] Wang S, Yan J, Wang X, Yang Z, Lin F, Zhang T. Synthesis and evaluation of the α -glucosidase inhibitory activity of 3-[4-(phenylsulfonamido)benzoyl]-2H-1-benzopyran-2-one derivatives. *Eur J Med Chem.* 2010;45(3):1250–1255.
- [16] Wan JX, Lim G, Lee J, Sun XB, Gao DY, Si YX, Shi XL, Qian GY, Wang Q, Park YD. Inhibitory effect of phloroglucinol on α -glucosidase : Kinetics and molecular dynamics simulation integration study. *Int J Biol Macromol.* 2019;124:771–779.
- [17] William-Olsson T. *Alpha-Glucosidase Inhibition in Obesity.* 1985.
- [18] Jiang J, Ghosh S, Burley SK. *Alpha Glucosidase.* 2019. Available from: <http://pdb101.rcsb.org/global-health/diabetes-mellitus/drugs/alpha-glucosidase-inhibitors/alpha-glucosidase>

- [19] Kazmi M, Zaib S, Ibrar A, Amjad ST, Shafique Z, Mehsud S, Saeed A, Iqbal J, Khan I. A new entry into the portfolio of α -glucosidase inhibitors as potent therapeutics for type 2 diabetes: design, bioevaluation and one-pot multi-component synthesis of diamine-bridged coumarinyl oxadiazole conjugates. *Bioorg Chem.* 2018;77:190-202.
- [20] Moelands SVL, Lucassen PLBJ, Akkermans RP, De Grauw WJC, Van De Laar FA. Alpha-glucosidase inhibitors for prevention or delay of type 2 diabetes mellitus and its associated complications in people at increased risk of developing type 2 diabetes mellitus (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2018.
- [21] Liu Z, Ma S. Recent Advances in Synthetic α -Glucosidase Inhibitors. *ChemMedChem.* 2017;12:819-29.
- [22] Iqbal S, Khan MA, Javaid K, Sadiq R, Fazal-ur-rehman S, Choudhary MI, Basha FZ. New carbazole linked 1, 2, 3-triazoles as highly potent non-sugar α -glucosidase inhibitors. *Bioorg Chem.* 2017;74:72-81.
- [23] Kasturi S, Surarapu S, Uppalanchi S, Anireddy JS, Dwivedi S, Anantaraju HS, Perumal Y, Sigalapalli DK, Babu BN, Ethiraj KS. Synthesis and α -glucosidase inhibition activity of dihydroxy pyrrolidines. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(12):2818-2823.
- [24] Nakamura S, Takahira K, Tanabe G, Muraoka O, Nakanishi I. Homology Modeling of Human Alpha-Glucosidase Catalytic Domains and SAR Study of Salacinol Derivatives. *Open J Med Chem.* 2012;2:50-60.
- [25] Ali F, Khan KM, Salar U, Taha M, Ismail NH, Wadood A, Riaz M, Perveen S. Hydrazinyl arylthiazole based pyridine scaffolds: Synthesis, structural characterization, in vitro α -glucosidase inhibitory activity, and in silico studies. *Eur J Med Chem.* 2017;138:255-272.
- [26] Dhameja M, Gupta P. Synthetic heterocyclic candidates as promising α -glucosidase inhibitors: An overview. *Eur J Med Chem.* 2019;176:343-377.
- [27] Dowarah J, Singh VP. Anti-diabetic drugs recent approaches and advancements. *Bioorg Med Chem.* 2020;28(5):1-78.
- [28] Javaid K, Saad SM, Rasheed S, Moin ST, Syed N, Fatima I, Salar U, Khan KM, Perveen S, Choudhary MI. 2-Arylquinazolin-4(3H)-ones: A new class of α -glucosidase inhibitors. *BioorgMedChem.* 2015;23(23):7417-7421.
- [29] Saeedi M, Mohammadi-khanaposhtani M, Pourrabia P, Razzaghi N. Design and synthesis of novel quinazolinone-1, 2, 3-triazole hybrids as new anti-diabetic agents : In vitro α -glucosidase inhibition , kinetic and docking study. *Bioorg Chem.* 2019;83:161-169.
- [30] Seo WD, Kim JH, Kang JE, Ryu HW, Curtis-Long MJ, Lee HS, Yang MS, Park KH. Sulfonamide chalcone as a new class of α -glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15:5514-5516.
- [31] Wei M, Chai WM, Wang R, Yang Q, Deng Z, Peng Y. Quinazolinone derivatives: Synthesis and comparison of inhibitory mechanisms on α -glucosidase. *Bioorganic Med Chem.* 2017;25(4):1303-1308.
- [32] Bozdag M, Alafeefy AM, Altamimi AM, Vullo D, Carta F, Supuran CT. Coumarins and other fused bicyclic heterocycles with selective tumor-associated carbonic anhydrase isoforms inhibitory activity. *Bioorganic Med Chem.* 2017;25(2):677-683.
- [33] Samrin F, Sharma A, Ali KI, Puri S. Synthesis and Antibacterial Activity of New Diaryldiamines. *Asian J Chem.* 2012;49(3):1391-7.
- [34] DeRuiter J, Brubaker AN, Riley TN. Design and Synthesis of 2-(Arylamino)-4(3H)-quinazolinones as Novel Inhibitors of Rat Lens Aldose Reductase. *J Med Chem.* 1986;29(5):627-629.
- [35] Barbosa MLDC, Lima LM, Tesch R, Sant'Anna CMR, Totzke F, Kubbutat MHG, Schachtele C, Laufer SA, Barreiro EJ. Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2014;71:1-14.

- [36] Yu S, Zhang L, Yan S, Wang P, Sanchez T, Christ F, et al. Nitrogen-containing polyhydroxylated aromatics as HIV-1 integrase inhibitors: Synthesis, structure-activity relationship analysis, and biological activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012;27(5):628-40.
- [37] Masevicius V, Petraityte G, Tumkevicius S. 4-Amino-5-(arylaminoethyl)-2-(methylthio)furo[2,3-d]pyrimidines via Mitsunobu reaction of 4-amino-5-(hydroxymethyl)-2-(methylthio)furo[2,3-d] pyrimidine with N-mesyl- and N-nosylarylamines. *Synthesis (Stuttg)*. 2012;44(9):1329-38.
- [38] Abouzid K, Shouman S. Design, synthesis and in vitro antitumor activity of 4-aminoquinoline and 4-aminoquinazoline derivatives targeting EGFR tyrosine kinase. *Bioorganic Med Chem*. 2008;16(16):7543-7551.
- [39] Ranilla LG, Kwon Y, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds , antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs ... *Bioresour Technol*. 2010;101(12):4676-4689.
- [40] Han L, Fang C, Zhu R, Peng Q, Li D, Wang M. Inhibitory effect of phloretin on glucosidase : Kinetics, interaction mechanism and molecular docking. *Int J Biol Macromol*. 2017;95:520-527.
- [41] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc. New York: 2005. 72-214 p.
- [42] Nakanishi K, Solomon PH. *Infrared Absorption Spectroscopy*. San Francisco: Holden Day Inc; 1977.
- [43] Balcı M. *Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi*. Ankara: ODTÜ Yayıncılık; 1999.
- [44] Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. George Thi. New York: George Thieme Verlag; 1997.
- [45] Copeland RA. Reversible Modes of Inhibitor Interactions with Enzymes. In: *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. p. 48-70.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı ile maddi olarak beni destekleyen TÜBİTAK'a, IR ve kütle spektroskopik analizlerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı-FABAL'a** ve Bilgi, birikim ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyerek akademik hayatıma ışık tutan ve bilime olan yolculuğumda bana yol gösteren çok değerli danışman hocam **Sayın Prof. Dr. Zeynep SOYER'e** Sonsuz minnet, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

YENİ BİR GRUP POTANSİYEL ANTI-ALZHEİMER ETKİLİ TAKRİN-DONEPEZİL HİBRİTLERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

S16

Gülşah BAYRAKTAR¹, Sülünay PARLAR COŞKUN¹, Güliz ARMAĞAN², M. Alper ERDOĞAN³, Ece BAYIR⁴,
Aylin ŞENDEMİR⁵, Vildan ALPTÜZÜN¹

1 Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

2 Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

3 İKÜ Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 35620 İzmir.

4 Ege Üniversitesi MATEL, 35100 İzmir.

5 Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

(gulsah.bayraktar@ege.edu.tr)

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, yaşlılarda görülen demansın en yaygın türüdür. Artan ortalama yaşam süresiyle Alzheimer hastalığının insidansı buna paralel olarak artış göstermektedir. Günümüzde yaklaşık 33 milyon kişinin Alzheimer hastası olduğu tahmin edilmektedir ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır [1].

Alzheimer hastalığı çok faktörlü bir patoloji gösterir. Azalmış kolinerjik iletim, amiloid β plaklar, tau proteinlerinin hiperfosforilasyonu ve nörofibriler yumaklar hastalığın tanımlanmış patolojik bulgularıdır. Beyindeki metal iyon dengesinin bozulması, mitokondriyel bozukluk, oksidatif stres ve nöroinflamasyon da bu bulgulara eşlik etmektedir. Alzheimer hastalığının moleküler mekanizması ile ilgili yoğun çalışmalar devam etmesine karşın, hastalığın çok faktörlü patolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır [2].

Günümüzde hastalığın tedavisinde FDA tarafından onaylanmış 3 tane AChE enzim inhibitörü, 1 tane N-metil-D-aspartat reseptör antagonist kullanılmaktadır. AChE inhibitörleri kolinerjik transmisyonu artırarak hafıza bozukluklarını iyileştirmektedir [2].

AChE'nin amiloid β agregasyonuna neden olan nonklasik fonksiyonlarını enzimin girişinde yer alan periferik anyonik yöre aracılığıyla gösterdiğinin anlaşılmasıyla, enzimin katalitik aktif yöresinin yanı sıra, periferik anyonik yöresiyle de etkileşebilen ikili yöre etkileşimli inhibitörlerin geliştirilmesi, anti-Alzheimer ilaç keşfinde yeni bir strateji olarak karşımıza çıkmıştır [3, 4 inestreso, decker]. Ayrıca butirilkolinesteraz (BChE) enziminin hastalığın patolojisindeki ve asetilkolin yıkımındaki rolünün anlaşılmasıyla her iki enzimi selektif veya non-selektif inhibe eden ligandlar tasarlanmıştır. Günümüzde, Alzheimer hastalığının karmaşık patolojisi göz önüne alındığından çoklu hedefe yönlendirilmiş ligandlar (MTDL) anti-Alzheimer ligand geliştirmede önem kazanmıştır [4,5].

FDA tarafından onaylanan ilk AChE inhibitörü takrin, AChE enziminin ayrı ayrı CAS ve PAS bölgeleriyle etkileşebilen bir molekül olması ve enzime olan yüksek afinitesi nedeniyle, hepatotoksik yan etkilerinden dolayı günümüzde tedavide kullanılmamasına rağmen MTDL tasarımında sıklıkla kullanılan bir çekirdek yapı olarak karşımıza çıkmaktadır [6].

Donepezil ise Alzheimer tedavisinde aktif olarak kullanılan selektif bir AChE enzim inhibitörüdür. AChE enzimini düşük nM konsantrasyonlarda inhibe etmesinin yanı sıra enzimin hem CAS hem de PAS yöreleri ile etkileştiği bilinmektedir [7].

Hidrazon işlevsel grubu analjezik, antikonvülzan, antidepresan gibi farklı etkilere sahip pek çok molekül dışında AChE inhibitör özelliği sahip moleküllerde de yer aldığı görülmektedir [8,9,10]. Daha önce yapılan çalışmalarda da hidrazon yapısı taşıyan 1,4-dihidropiridin ve katerner piridinyum türevlerinin iyi AChE inhibitör özelliklerine ek olarak $A\beta$ agregasyonunu inhibe edici özellikleri de raporlanmıştır [8,9].

Farmakoforik grupların birleştirilmesiyle oluşturulan hibrit moleküller ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılan yöntemlerden birisidir [4,5]. MTDL'lerin de anti-Alzheimer ilaç tasarımındaki avantajı düşünüldüğünde, bu çalışmamızda donepezilin N-benzilpiperidin artığı ve takrin, ChE enzim inhibisyonu için farmakofor gruplar olarak seçilmiş ve hidrazon grubu ile birleştirilerek takrin-donepezil türevi hibrit bileşikler tasarlanmıştır.

Tasarlanan moleküllerin AChE ve BChE enzim inhibisyonları değerlendirilmiş, seçilen bileşiklerin amiloid β agregasyon inhibisyonları, biyometal kompleks oluşturabilme yetenekleri, sitotoksosite ve nöroprotektif etkileri incelenmiştir. Bileşiklerin AChE ve BChE enzimleriyle doking çalışmaları ve teorik ADME öngörülleri yapılmıştır. Bunlara ek olarak, söz konusu bileşiklerin KBB geçişleri etki göstermeleri açısından kritik önem taşıdığından bileşiklerin KBB geçişleri insan endotelial hücre hattı kullanılarak test edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntem

Sentez

Tasarlanan takrin-donepezil türevi hibrit bileşiklerin sentezi 5 basamakta gerçekleştirilmiştir. Sentezin ilk basamağında antranilik asidin, sikloheksanon ve POCl₃ ile reaksiyonuyla 9-kloro-1,2,3,4-tetrahidroakridin elde edilmiştir [11]. 9-kloro-1,2,3,4-tetrahidroakridin halkasının hidrazin hidrat ile nükleofilik süstitüsü 9-hidrazino-1,2,3,4-tetrahidroakridin hidroklorür yapısını oluşturmuştur [12]. Diğer taraftan süstitüe 1-benzilpiperidin-4-on türevleri ise piperidin-4-on monohidrat hidroklorür ile süstitüe benzil bromür/klorürlerin tepkimesi ile elde edilmiştir [13]. Hidrazon yapısındaki final ürünleri, 9-hidrazino-1,2,3,4-tetrahidroakridin hidroklorür, süstitüe 1-benzilpiperidin-4-on arasında gerçekleşen kondensasyon tepkimesiyle elde edilmiştir [14]. Son basamakta karşılaştığımız izolasyon ve stabilite problemleri bileşiklerimizin HCl tuz formunda izolasyonları ile aşılmıştır.

Enzim inhibisyon çalışmaları

Bileşiklerin AChE ve BChE enzim inhibisyonlarının ölçümü modifiye edilmiş Ellman yöntemine göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir [15].

A β agregasyon inhibisyon çalışmaları

Seçilen bileşiklerin A β agregasyonu üzerindeki inhibitör aktivite tayini Tiyoflavin T Floresans Testi ile florometrik olarak ölçüldü [16].

Biyometal kompleks oluşturma çalışmaları

Non bileşiğinin biyometallerle kompleks oluşturma yeteneği üzerine çalışma spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır [17].

Hücre kültürü çalışmaları

Seçilen bileşiklerin sitotoksik ve nöroprotektif etki taramaları, insan nöroblastoma (SH-SY5Y, ATCC CRL-2266) hücre hattı kullanılarak WST-1 yöntemiyle gerçekleştirildi [18].

KBB geçiş çalışmaları

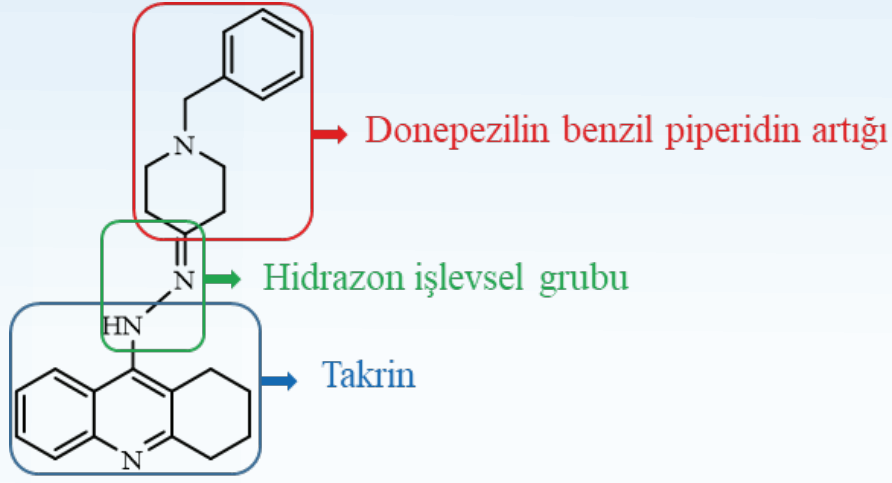
Seçilen bileşiklerin KBB geçişleri, insan endotelial (HBEC-5i) hücre hattı kullanılarak spektrofotometrik ölçümlerle gerçekleştirildi [19].

Moleküler modelleme çalışmaları

Tüm moleküler modelleme çalışmaları için The Schrödinger Suite 2018-1 ve OPLS_2005 force field kullanıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda hidrazon işlevsel grubuna sahip takrin-donepezil hibriti bileşikler tasarlanıp sentezlenmiştir (Şekil 1). Bileşiklerin tasarımında Alzheimer tedavisinde semptomatik etkinin yanısıra hastalığın diğer patolojilerini de hedefleyen MTDL stratejisine uygun bir yol izlenmiştir.



Şekil 1 Tasarlanan Takrin-Donepezil Hibritleri

Sentezlenen tüm bileşiklerin yapıları kütle, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR ve iki boyutlu NMR spektroskopik yöntemleri ile aydınlatılmış, saflıkları ise elementel analiz yöntemi ile teyit edilmiştir. Sentezlenen tüm bileşiklerin değerlendirilen spektral bulguları, literatürde öngörülleri ile uyum içerisindedir.

Tüm bileşikler AChE enzimini düşük μM IC_{50} değerlerinde (0.105 - 0.718 μM) inhibe etmişlerdir. Sentezlenen bileşikler arasında AChE enzimine karşı en aktif türev $\text{IC}_{50}=0.105 \mu\text{M}$ değeriyle 3F olarak raporlanmıştır. Dahası öngörülen ikili yöre etkileşimli inhibitör özelliği en aktif bileşik üzerinde yapılan doking çalışmaları ile de desteklenmiştir.

AChE inhibisyonlarının yanı sıra, tüm final bileşiklerinin BChE enzimini de çok düşük μM IC_{50} değerlerinde (0.028 - 0.445 μM) inhibe ettikleri, en aktif türev ise $\text{IC}_{50}=0.028 \mu\text{M}$ değeriyle 3D olarak bulunmuştur. Alzheimer hastalığının ilerleyen aşamalarında AChE enzim seviyelerinin azalmasını kompanse etmek amacıyla BChE enzim seviyelerinin arttığı göz önüne alındığında sentezlenen takrin-donepezil hibritlerinin her iki enzimi de inhibe etmesi avantajlı bir durumdur.

Öte yandan, test edilen bileşikler 100 μM ve 10 μM konsantrasyonlarda amiloid β agregasyonunu farklı yüzdelerde inhibe etmiştir. Yapılan spektrofotometrik çalışmayla, Non bileşiğinin Cu^{+2} ve Fe^{+2} metalleri ile kompleks oluşturabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Seçilen bileşiklerin sitotoksiteleri SH-SY5Y hücre hattında değerlendirilmiş ve 10 μM konsantrasyonda dahi sitotoksik etkileri gözlenmemiştir. Aynı hücre hattı kullanılarak bileşiklerin H_2O_2 ile indüklenmiş nörotoksositeye karşı nöroprotektif etki potansiyeli değerlendirilmiştir. Referans olarak kurkumin ve resteratrol kullanılmıştır. Bileşiklerin, düşük konsantrasyonlarda referans bileşikler kadar nöroprotektivite sergiledikleri görülmüştür.

3D ve 3F bileşiklerinin AChE ve BChE enzimleri üzerinde doking çalışmaları yapılmıştır ve sonuçlar bileşiklerin AChE enziminin ikili yöre etkileşimli inhibitörleri olabileceğini göstermiştir.

İlaç tasarımında hedefe yönelik yüksek aktivitenin yanısıra, bileşiklerin farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanımları da önemlidir. İleri biyoaktivite testlerine tabi tutulacak moleküllerin iyi aktivite ile birlikte iyi biyoyararlanıma sahip olmaları da avantaj oluşturmaktadır. Bu kapsamda bileşiklerin teorik olarak ADME özellikleri öngörülmüştür ve bu ön veriler bileşiklerin iyi bir biyoyararlanım gösterebileceğine işaret etmektedir.

Bileşiklerin tasarlandıkları gibi anti-Alzheimer etki gösterebilmeleri için KBB geçişleri kritik önem taşımaktadır. Bu kapsamda, teorik ADME öngörülerine ek olarak seçilen bileşiklerin KBB geçişleri, insan endotelial (HBEC-5i) hücre hattı kullanılarak in vitro test edilmiştir. Bileşikler yüksek/orta seviyede KBB'yi geçebilmektedirler.

SONUÇLAR

Bu çalışmamızda 26 adet takrin-donepezil türevi hibrit bileşik tasarlanıp sentezlenmiş, biyoaktivite sonuçları değerlendirilmiştir. Sentezlenen hibritler AChE ve BChE enzimlerini düşük μM IC50 değerlerinde (0.105 - 0.718 μM ve 0.028 - 0.445 μM) inhibe etmişlerdir. Dahası öngörülen bu etkileşimler en aktif bileşik üzerinde yapılan doking çalışmaları ile de desteklenmiştir. Bazı bileşiklerin A β plak oluşumu inhibisyonları değerlendirilmiş ve bileşiklerin A β plak oluşumunu çeşitli oranlarda önledikleri görülmüştür.

Final bileşikleri arasından seçilen Non bileşiğinin metallerle kompleks oluşturma potansiyeli spektrofotometrik incelenmiş ve UV spektrumunda izlenen absorpsiyon şiddetindeki değişiklikler, bileşiğin Cu+2 ve Fe+2 iyonları ile kompleks oluşturmabilme yeteneğine ilişkin bir ön veri olarak değerlendirilmiştir.

Test edilen bileşiklerin SH-SY5Y hücre hattında düşük μM konsantrasyonlarda nöroprotektif özellikler sergiledikleri görülmüştür. Bileşiklerin sitotoksisiteleri aynı hücre hattı kullanılarak değerlendirildiğinde ise 10 μM konsantrasyonda dahi belirgin bir sitotoksosite göstermedikleri raporlanmıştır.

Doking çalışmaları ve teorik ADME öngörülerine ek olarak seçilen bileşiklerin KBB geçişleri HBEC-5i hücre hattı kullanılarak test edilmiş ve yüksek/orta geçiş olarak skorlanmıştır.

Tasarım aşamasında, AChE enzimine karşı ikili yöre etkileşimli inhibitör olarak kurgulanmasının yanında MTDL konseptine uygun bir strateji de izlenmiştir. Bu açıdan bileşiklerin, potent ChE inhibitörü olmalarının yanısıra, hidrazon işlevsel grubunun da katkısıyla, multifaktöriyel bir doğaya sahip Alzheimer hastalığının diğer patolojik süreçlerini de hedefledikleri görülmüştür. Alzheimer hastalığının kompleks patolojisi göz önüne alındığında, sentezlenen moleküllerin birden fazla yolağı hedef alması semptomatik etkinin yanında hastalığın tedavisi açısından da avantajlıdır. Bu açıdan bileşiklerimizin son yıllarda anti-Alzheimer ilaç keşfinde oldukça önem kazanan MTDL konseptine uygun olduğu görülmektedir.

Bu aşamada, çalışmamızda raporladığımız ön biyolojik aktivite sonuçları, iskelet yapının gerek 1,2,3,4-tetrahidroakridin yapısı üzerinden gerekse de 1-benzilpiperidin grubu üzerinde yapılacak türevlendirmelerle daha geniş kapsamlı yapı-etki ilişkilerinin elde edilmesi, AChE inhibisyon türünün kinetik çalışmalarla belirlenmesi, sentezlenen bileşikler üzerinde ileri metal şelasyon çalışmaları, in vivo KBB geçiş, toksisite (nörotoksisite/hepatotoksisite) vb. testlerinden sonra bu olası sonuçlara göre bileşiklerin hayvan modellerinde denenmesi için umut vadetmektedir.

Sonuç olarak sentezlenen hidrazon işlevsel grubuna sahip takrin-donepezil hibritleri anti-Alzheimer tedavide umut verici bir iskelet yapı olabileceği düşünülmektedir. İleride planladığımız çalışmalarda bu yapılar üzerinde daha ileri biyoaktivite testlerinin yapılması ve benzer iskelete sahip olası türevlerin sentezlenmesiyle daha geniş yapı-etki ilişkilerinin elde edilmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKÇA

[1] Patterson, C. (2018). World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. Alzheimer's Disease International (ADI). Erişim adresi: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>

[2] Scarpini, E., Schelterns, P., ve Feldman, H. (2003). Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. The Lancet Neurology, 2003; 2(9), 539-547.

[3] Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Pérez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., ... Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- β -peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. Neuron. 1996; 16(4), 881-891.

[4] Decker, M. (Ed.). (2017). Design of Hybrid Molecules for Drug Development. Elsevier.

[5] Cavalli, A., Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Recanatini, M., ve Melchiorre, C. Multi-target-Directed Ligands to Combat Neurodegenerative Diseases. Journal of Medicinal Chemistry. 2008; 51(3), 347-372.

- [6] Lin, H., Li, Q., Gu, K., Zhu, J., Jiang, X., Chen, Y., ve Sun, H. Therapeutic Agents in Alzheimer's Disease Through a Multi-target-directed Ligands Strategy: Recent Progress Based on Tacrine Core. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2017; 17(27), 3000–3016.
- [7] Kawakami, Y., Inoue, A., Kawai, T., Wakita, M., Sugimoto, H., ve Hopfinger, A. J. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996; 4(9), 1429–1446.
- [8] Parlar, S., Bayraktar, G., Tarikogullari, A. H., Alptüzün, V., ve Erciyas, E. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Study of Hydrazone-Containing Pyridinium Salts as Cholinesterase Inhibitors. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2016; 64(9), 1281–1287.
- [9] Prinz, M., Parlar, S., Bayraktar, G., Alptüzün, V., Erciyas, E., Fallarero, A., ... Holzgrave, U. 1,4-Substituted 4-(1H)-pyridylene-hydrazone-type inhibitors of AChE, BuChE, and amyloid- β aggregation crossing the blood-brain barrier. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 49(4), 603–613.
- [10] Rollas, S., ve Küçükgül, S. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules*. 2007; 12(8), 1910–1939.
- [11] Teponnou, G. A. K., Joubert, J., ve Malan, S. F. Tacrine, Trolox and Tryptoline as Lead Compounds for the Design and Synthesis of Multi-target Agents for Alzheimer's Disease Therapy. *The Open Medicinal Chemistry Journal*. 2017; 11(1), 24–37.
- [12] Bielavsky, J. Analogues of 9-Amino-1,2,3,4-Tetrahydroacridine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1977; 42, 2802–2808.
- [13] Große Maestrup, E., Wiese, C., Schepmann, D., Hiller, A., Fischer, S., Scheunemann, M., ... Wunsch, B. Synthesis of spirocyclic σ_1 receptor ligands as potential PET radiotracers, structure-affinity relationships and in vitro metabolic stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009; 17(10), 3630–3641.
- [14] Douglas, A. W., Fisher, M. H., Fishinger, J. J., Gund, P., Harris, E. E., Olson, G., ... Ruyle, W. V. Anticoccidial 1-Substituted 4(1H)-pyridinone Hydrazones. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1977; 20(7), 939–943.
- [15] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., ve Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961; 7, 88–95.
- [16] LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*. 1993; 2, 404–410.
- [17] Huang, L., Lu, C., Sun, Y., Mao, F., Luo, Z., Su, T., ... Li, X. Multitarget-directed benzylideneindanone derivatives: Anti- β -amyloid (A β) aggregation, antioxidant, metal chelation, and monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition properties against Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012; 55(19), 8483–8492.
- [18] Ravishankar, D., Corona, G., Hogan, S. M., Spencer, J. P. E., Greco, F., & Osborn, H. M. I. Thioflavones as novel neuroprotective agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016; 24(21), 5513–5520.
- [19] Bayir, E., Celtikoglu, M. M., & Sendemir, A. The use of bacterial cellulose as a basement membrane improves the plausibility of the static in vitro blood-brain barrier model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019; 126, 1002–1013.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 16/ECZ/026 kodlu proje ile desteklenmiştir.

YENİ PİRAZOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, SPEKTRAL KARAKTERİZASYONU, FLORESANS ÖZELLİKLERİNİN VE ANTİPROLİFERATİF AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

S17

Zefine UĞRAŞ¹, Fatih TOK¹, Emine ŞALVA², Gözde ULTAV², Bedia KAYMAKÇIOĞLU¹

¹Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34865 İstanbul.

²İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 44280 Malatya.

(e-posta:zefineugras@outlook.com)

GİRİŞ

Kanser, inme ve koroner kalp hastalığı ile dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olmuştur [1]. Mevcut ilaçların yan etkilerinden dolayı daha az yan etkiye sahip ve etkinliği daha yüksek bileşiklere olan ihtiyaç artmıştır. Günümüzde kansere karşı çeşitli bileşikler sentezlenmeye devam etmekte olup özellikle piperidin ve pirazol gibi bazı heterosiklik yapıların biyolojik aktivitede önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [2,3]. Bu çalışmada, şalkon ve hidrazin türevlerinin siklokondenzasyonu sonucu piperidin halkası taşıyan pirazolin yapısına sahip özgün bileşikler sentezlenmiştir [4]. Yapılarının değerlendirilmesi için IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC ve MS spektrumları kullanılmıştır. Bileşiklerin farmakokinetik özelliklerini ve biyoyararlanımını belirlemek için SwissADME programından yararlanılmıştır. Bileşiklerin in vitro antiproliferatif aktiviteleri L-929 (fare fibroblast), A-549 (akciğer adenokarsinomu) ve MCF-7 (meme adenokarsinomu) hücre hatlarında MTS testi ile incelenmiştir [5]. Ayrıca bileşiklerin floresans mikroskopunda floresans özellikleri görüntülenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntem

Bu çalışmada, birinci adımda piperidin halkası taşıyan başlangıç maddesi ile 4-florobenzaldehit bileşiğinin reaksiyona sokulması sonucu 4-(4-metilpiperidin-1-il)benzaldehit bileşiği sentezlenmiştir. İkinci adımda, sentezlenen benzaldehit bileşiği ile çeşitli keton türevlerinin bazik ortamda Claisen-Schmidt reaksiyonu sonucu orijinal şalkon türevleri; üçüncü adımda ise şalkon türevlerinin asidik ortamda fenil/4-klorofenil/4-metoksifenil hidrazin türevleri ile siklokondenzasyonu sonucu pirazolin halkasına sahip bileşikler sentezlenmiştir.

Sentez

4-(4-metilpiperidin-1-il)benzaldehit sentezi (I)

4-(4-metilpiperidin-1-il)benzaldehit bileşiği Osmaniye ve ark. tarafından literatürde bildirildiği şekilde sentezlenmiştir [6].

3-[4-(4-metilpiperidin-1-il)fenil]-1-substitüe-prop-2-en-1-on sentezi (II)

Şalkon bileşikleri Elkhalfa ve ark. tarafından literatürde bildirildiği yöntemle sentezlenmiştir [7].

1-[4-(1,3-substitüe-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-il)fenil]-4-metilpiperidin sentezi (III)

Pirazolin yapısı taşıyan bileşikler Tala ve ark. tarafından literatürde bildirildiği şekilde elde edilmiştir [4].

Antiproliferatif Aktivite Çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin antiproliferatif etkinliklerini incelemek amacı ile MCF-7, A-549 ve L929 hücre hatlarında sitotoksik etkileri MTT testi kullanılarak incelenmiştir. MTT testinden elde edilen sonuçlara göre kanser hücre hatlarında sitotoksik etki gösteren bileşiklerin apoptoz/nekroz indüksiyon yollarını belirlemek amacıyla apoptoz çalışmaları flow sitometri testi ile gerçekleştirilmiştir [5,8].

Floresans Özelliğinin İncelenmesi

Bileşiklerin floresans özelliklerini tespit etmek amacı ile Zeiss Axio vert.A1 mikroskobu (495-519 nm) kullanılmıştır. Floresans özellik gösteren bileşiklerin mikroskop altındaki görüntüleri biyolojik bulgular kısmında verilmiştir [9].

In silico ADME ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

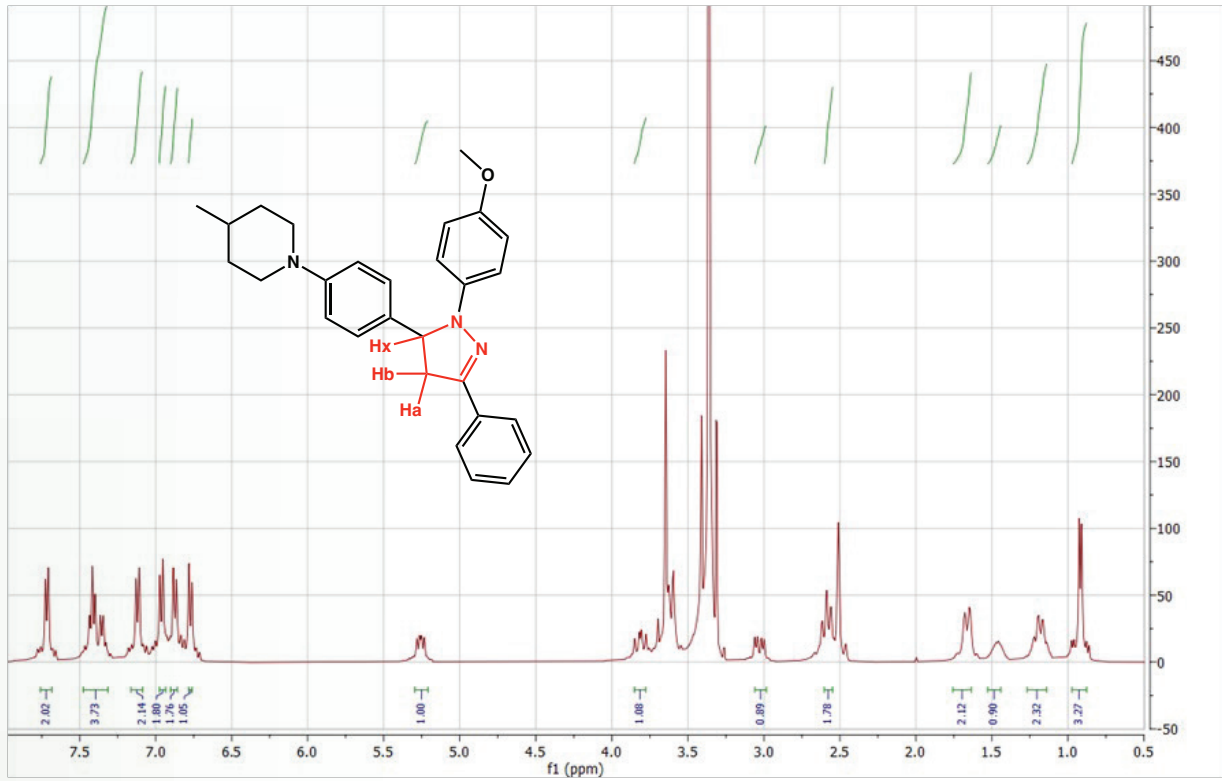
Sentezlenen bileşiklerin ADME ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlemek amacıyla SwissADME ücretsiz websitesi kullanılmıştır [10].

BULGULAR VE TARTIŞMA

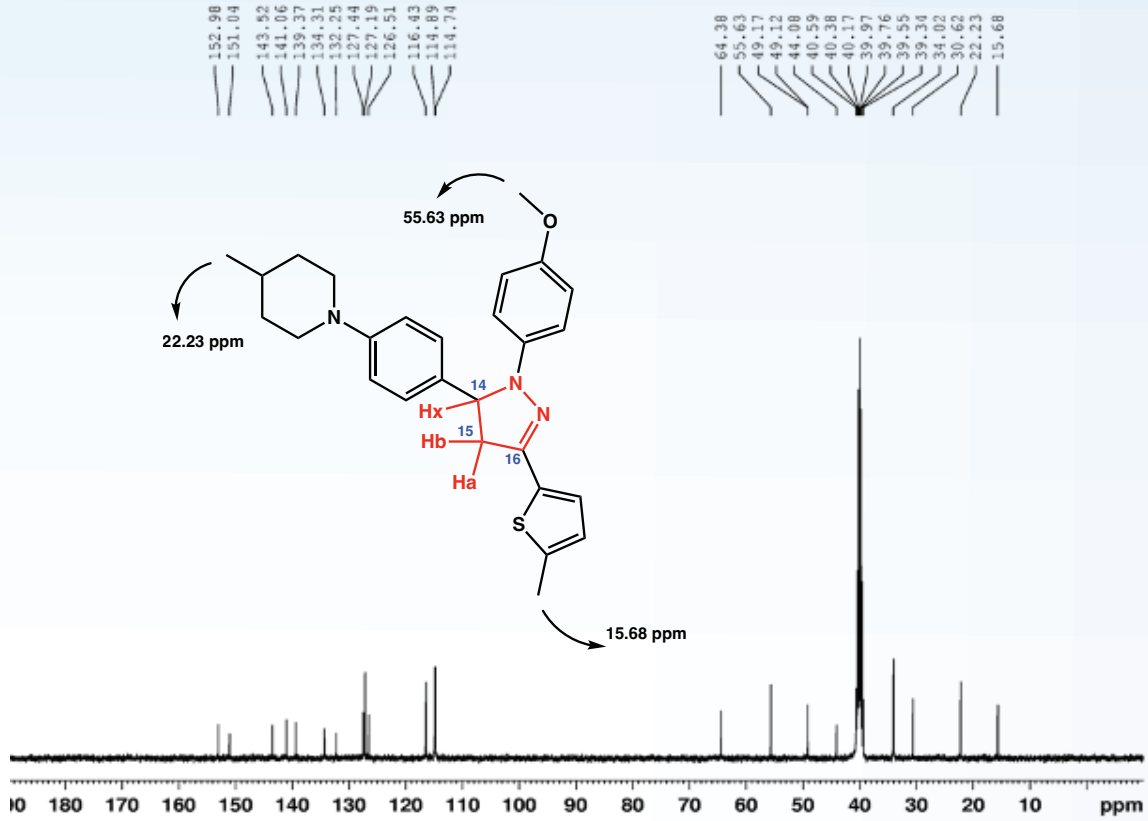
Spektral bulgular

Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve MS spektrumu ile aydınlatılmış, ayrıca HMBC spektrumu kullanarak iki bileşiğin yapısı onaylanmıştır.

Şalkon türevlerinin IR spektrumu incelendiğinde $1633\text{-}1651\text{ cm}^{-1}$ aralığında C=O gerilme bandı görülmüştür. Pirazolin halkası taşıyan bileşiklerin IR spektrumu incelendiğinde C=O gerilme bandının görülmediği, C=N gerilme bandının ise $1612\text{-}1595\text{ cm}^{-1}$ de görüldüğü sonucuna ulaşılmıştır [11]. $^1\text{H-NMR}$ spektrumları değerlendirildiğinde; bütün bileşikler 2-pirazolin halkasının sahip olduğu ABX özel bölünme sistemine sahip olmuştur. Halkaya ait H_a , H_b ve H_x protonları sırası ile $2.93\text{-}3.10$, $3.10\text{-}3.84$ ve $5.21\text{-}5.41$ ppm'de double dublet olacak şekilde bölünmeler göstermiştir [12]. 4a bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 1'de verilmiştir. Bileşiklerin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu değerlendirildiğinde; pirazolin halkasının C_3 , C_4 ve C_5 karbonları $144.68\text{-}253.24$, $43.35\text{-}44.29$ ve $62.57\text{-}64.46$ ppm'de pik göstermiştir. 4^f bileşiğine ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu Şekil 2'de verilmiştir. İki bileşiğin HMBC spektrumu incelendiğinde ise spektrumda elde edilen korelasyonlar bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumları ile uyumlu bulunmuştur.



Şekil 1 4a bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 2 4f bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Antiproliferatif aktivite bulguları

Sentezlenen bileşiklerin antiproliferatif özelliklerini saptamak amacıyla MCF-7 ve A-549 hücre hatlarına karşı etkinliklerine bakılmıştır. Ayrıca sağlıklı hücre hattı L929'daki sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir. MCF-7 hücre hatlarındaki en aktif bileşikler **2a**, **2b** ve **4a** ve A-549 hücre hatlarındaki en aktif bileşikler **2a**, **2b**, **3c**, **4b**, **4c** ve **4d**'dir. IC_{50} (yüzde inhibisyon konsantrasyon) değerleri Tablo 1'te verilmiştir.

Tablo 1 Kanser hücre hatlarında en fazla aktivite gösteren bileşiklerin IC_{50} değerleri

Bileşikler	IC_{50} (μM)	
	MCF-7	A-549
2a	146,3008 \pm 38,9325	172,8129 \pm 2,7717
2b	187,3040 \pm 18,8102	145,6906 \pm 6,7265
3c	-	173,6038 \pm 3,4106
4a	166,1912 \pm 7,7035	-
4b	-	180,4091 \pm 2,5329
4c	-	81,1707 \pm 4,0219
4d	-	171,1494 \pm 17,9832
DMSO	26,3242 \pm 0,8511	26,1455 \pm 0,7945

Apoptoz Çalışmaları

MTT test sonucuna göre kanser hücrelerinde etkili olduğu düşünülen bileşiklerin apoptoz ve nekroz üzerindeki etkileri flow sitometri testi ile tespit edilmiştir. Bileşiklerin MCF-7 ve A-549 hücrelerindeki apoptoz/nekroz yüzdeleri değerlendirilmiştir (Tablo 2).

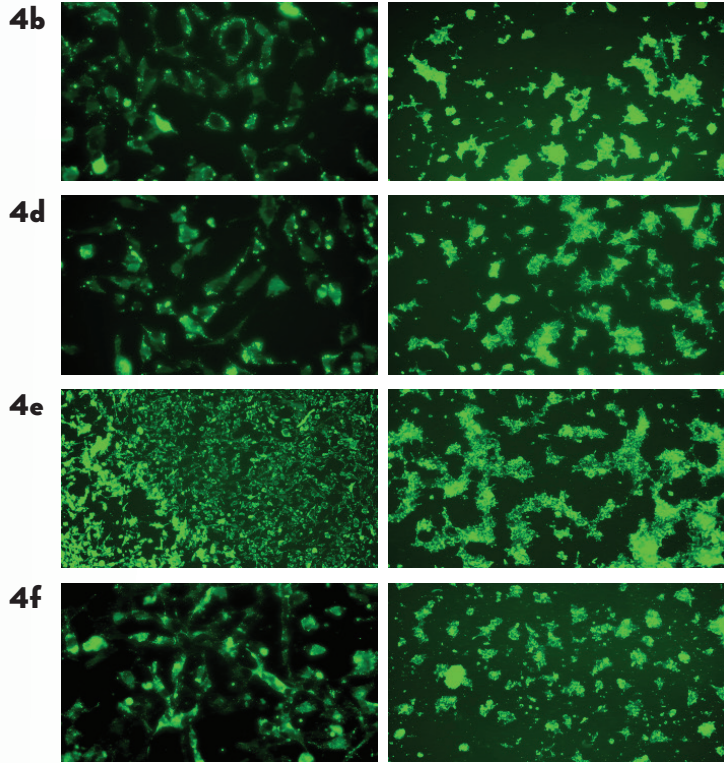
Tablo 2 MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik bileşiklerin apoptoz/nekroz etkinlik yüzdeleri

Bileşik	MCF-7 hücre hattı			
	Geç apoptoz	Erken apoptoz	Nekroz	Canlı hücre
2b	%45,8	%22,1	%1,2	%30,8
4d	%40,9	%25,2	%1,0	%32,9
4a	%48,3	%42,1	%0,0	%9,6
3c	%49,5	%37,4	%0,0	%13,1

Tablo 2 A-549 hücre hattındaki sitotoksik bileşiklerin apoptoz/nekroz etkinlik yüzdeleri

Bileşik	A-549 hücre hattı			
	Geç apoptoz	Erken apoptoz	Nekroz	Canlı hücre
2b	%46,4	%27,2	%0,5	%27,2
4a	%72,0	%20,4	%0,4	%7,2
3c	%85,5	%13,9	%0,1	%0,4
2a	%95,7	%4,0	%0,0	%0,3

Floresans özelliklerinin incelenmesi



A-549 hücre hattında floresans özelliklerinin görüntülenmesi

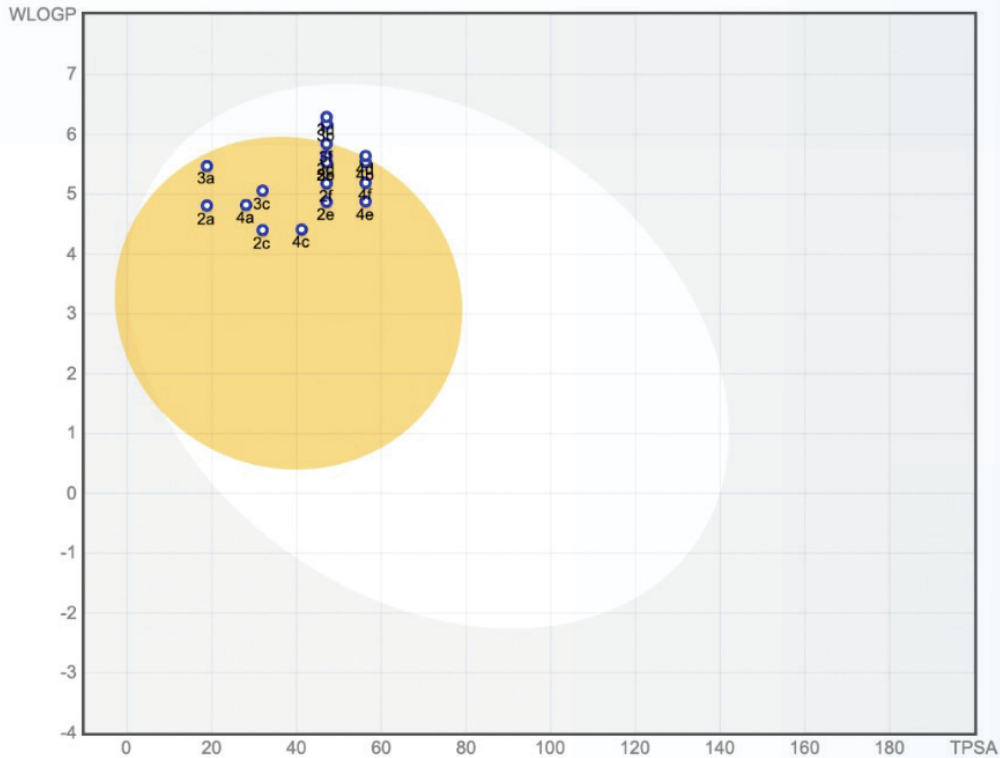
MCF-7 hücre hattında floresans özelliklerinin görüntülenmesi

Şekil 3 Bileşiklerin floresans mikroskobu altında görüntülenmesi

Pirazolinler, güçlü floresans özellik, iyi membran permeabilitesi, düşük toksisite ve basit sentez metotlarına sahip olması sebebi ile büyük dikkat çekmektedir. Bu tez kapsamında sentezlenen özgün pirazolin yapısına sahip bileşikler 4b, 4d, 4c, 4d ve 4f floresans mikroskopunda incelendiğinde, yeşil renkte floresans özellik gösterdiği ve tamamen hücre içine penetre olduğu görülmüştür (Şekil 3). Floresant özelliğin tıpta kullanımı ve avantajları göz önünde bulundurulduğunda bu bileşiklerin gerek non-toksik olması gerekse bir floforun sahip olması gereken farmakokinetik ve uygun dalga boyunda ışık emisyonu yapması gibi optimal özelliklere sahip olması nedeni ile tıpta kullanılabilir yeni floforların sentezi veya geliştirilmesi açısından, veya bu bileşiklerin bu alanda kullanılabilir olup olmamasına dair ileriye yönelik çalışmalar için umut vadeden sonuçlar göstermesi bu çalışmayı değerli kılmaktadır.

ADME ve Fizikokimyasal Parametre Bulguları

Sentezlenen bileşiklerin ADME ve fizikokimyasal hesaplamaları SwissADME websitesi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin “boiled egg” görüntüsü ve parametrelere ait değerler sırası ile Şekil 4 ve Tablo 4’te verilmiştir.



Şekil 4 Sentezlenen bileşiklerin “boiled egg” grafiği.

Tablo 4 Sentezlenen bileşiklerin SwissADME programı ile hesaplanan ADME ve fizikokimyasal parametre değerleri.

MA: Molekül ağırlığı, **TPSA:** Topolojik yüzey alanı, **MLOGP:** Partisyon katsayısı, **LogS:** Çözünürlük katsayısı, **KBB:** Kan-beyin bariyer sistemi geçirgenliği, **Pgp:** P-glikoprotein.

Molekül	M _A	Dönebilir bağlar	H bağı alıcısı	H bağı vericisi	TPSA	MLOGP	Log S	GI abs.	KBB geçirgenliği	P-gp substrat
2a	395.54	4	1	0	18.84	5.11	-6.52	Yüksek	Evet	Evet
2b	436.01	4	1	0	47.08	5.21	-7.36	Yüksek	Evet	Evet
2c	385.50	4	2	0	31.98	3.89	-6.07	Yüksek	Evet	Evet
2d	480.46	4	1	0	47.08	5.31	-7.68	Yüksek	Evet	Evet
2e	401.57	4	1	0	47.08	4.74	-6.56	Yüksek	Evet	Evet
2f	415.59	4	1	0	47.08	4.94	-6.88	Yüksek	Evet	Evet
3a	429.98	4	1	0	18.84	5.58	-7.12	Yüksek	Evet	Evet
3b	470.46	4	1	0	47.08	5.68	-7.96	Yüksek	Hayır	Evet
3c	419.95	4	2	0	31.98	4.36	-6.66	Yüksek	Evet	Evet
3d	514.91	4	1	0	47.08	5.78	-8.27	Yüksek	Hayır	Evet
3e	436.01	4	1	0	47.08	5.21	-7.15	Yüksek	Evet	Evet
3f	450.04	4	1	0	47.08	5.41	-7.48	Yüksek	Evet	Evet
4a	425.57	5	2	0	28.07	4.72	-6.60	Yüksek	Evet	Evet
4b	466.04	5	2	0	56.31	4.83	-7.44	Yüksek	Evet	Evet
4d	510.49	5	2	0	56.31	4.93	-7.76	Yüksek	Hayır	Evet
4e	431.59	5	2	0	56.31	4.36	-6.63	Yüksek	Evet	Evet
4f	445.62	5	2	0	56.31	4.56	-6.96	Yüksek	Evet	Evet

SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında, şalkon ve hidrazin türevleri arasında gerçekleşen siklokondenzasyon reaksiyonu sonucu yeni pirazolin türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin spektral karakterizasyonu IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and kütle spektrumu ile gerçekleştirilmiştir. Ek olarak **2a** ve **2b** bileşiklerinin yapısı HMBC spektrumu ile onaylanmıştır. Sentezlenen bütün bileşiklerin antiproliferaif etkinliklerini incelemek amacı ile MCF-7, A-549 ve L-929 hücre hatlarındaki sitotoksik etkileri MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösteren bileşiklerin ayrıca apoptoz/nekroz indüksiyon yüzdeleri flow sitometri testi ile incelenmiştir. MTT testi ve apoptoz çalışmasından elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda bileşiklerin kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkilerinde apoptoz indüksiyonun gerçekleştiği görülmüştür. Ayrıca bütün bileşikler sağlıklı hücrelerde sub-toksik özellik göstermiştir.

Bileşiklerin floresans özellikleri floresans mikroskopunda incelenmiştir. Bileşik **4b**, **4d**, **4c** ve **4d** yeşil renkte güçlü floresans özelliğe sahip olup sağlıklı hücrelerde sitotoksik etki göstermemiştir. Tez çalışmasında elde edilen bu veriler, hücre içi floresans görüntüleme için yeni bileşiklerin sentezi ve geliştirilmesinde umut verici sonuçlar sunmuştur.

KAYNAKÇA

- [1] Hassan R, Emmam S, Hwang D, Kim G, Hassanin S, Khalil M, Abdou A, Sonousi A. Design, synthesis and evaluation of anticancer activity of new pyrazoline derivatives by down-regulation of VEGF: Molecular docking and apoptosis inducing activity. *Bioorg. Chem.* 2022;118:105487.
- [2] Goel P, Alam O, Naim M, Nawaz F, Iqbal M, Alam M. Recent advancement of piperidine moiety in treatment of cancer- A review *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 157, 480-502.
- [3] Ahmad A, Husain A, Khan S, Mujeeb M, Bhandari A. J. Synthesis, antimicrobial and antitubercular activities of some novel pyrazoline derivatives. *Saudi Chem. Soc.* 2016;20(5):577-584.
- [4] Tala S., Joshi H., Dodiya B. Synthesis and biological study of some new chalcone and pyrazole derivatives, *Indian J. Chem.*, 2013;52;807-809.
- [5] El-Naggar M, Almahli H, Ibrahim H, Eldehna W, Abdel-Aziz H. Pyridine-Ureas as Potential Anticancer Agents: Synthesis and In Vitro Biological Evaluation. *Molecules*, 2018;23(6):1459.
- [6] Osmaniye D, Levent S, Karaduman A, Ilgın S, Özkay Y, Kaplancıklı Z. Synthesis of New Benzothiazole Acylhydrazones as Anticancer Agents. *Molecules*. 2018;23:1054.
- [7] Elkhaliifa D, Siddique A, Qusa M, Cyprian F, Sayed K, Alali F, Moustafa A, Khalil A. Design, synthesis, and validation of novel nitrogen-based chalcone analogs against triple negative breast cancer. *Eur. J. Med. Chem.* 2020;187:111954.
- [8] Alagöz M.A, Karakurt A, Hepokur C, Şalva E, Önkol T, Ghoneim M, Abdelgawad M, Khames A, Kim H, Mathew B. Synthesis of New 1-Aryl-2-(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)ethanone Oxime Ether Derivatives and Investigation of Their Cytotoxic Effects. *Processes*. 2021;9(11):2019.
- [9] Yadav R, Odera K, Rai A, Takahashi R, Mishra L. Synthesis, characterization, and supramolecular architectures of two distinct classes of probes for the visualization of endogenously generated hypochlorite ions in response to cellular activity. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2019;198:111594.
- [10] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* 2017;7:42717.
- [11] Asiri A, Al-Amari M, Khan S. Multistep Synthesis and Photophysical Investigation of Novel Pyrazoline, a Heterocyclic D-π-a Chromophore (PTPB) as a Fluorescent Chemosensor for the Detection of Fe³⁺ Metal Ion. *Polycycl Aromat Compd.* 2022;42.
- [12] Sever B, Altıntop M. D, Radwan M, Özdemir A, Otsuka M, Fujita M, Çiftçi H. İ. Design, synthesis and biological evaluation of a new series of thiazolyl-pyrazolines as dual EGFR and HER2 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2019;182:111648.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmektedir. Proje No: 221S850.

Özgür YILMAZ

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, 41470 Gebze-Kocaeli
(e-posta: yilmaz.ozgur@tubitak.gov.tr)

GİRİŞ

İmmün kontrol noktası moleküllerinin etkileşimini hedef alan inhibitörlerin keşfi günümüzde immünoterapi yönteminin antikanser tedaviler içinde önemli bir yere sahip olmasını sağlamıştır. İmmün kontrol noktası proteini olan Programlı Hücre Ölümü-1 (PD-1), aktif T ve B hücrelerinin yüzeyindeki negatif immün yanıt düzenleyici özellikte bir reseptördür. PD-1 reseptörü; ligandları olan Programlı Hücre Ölümü Ligandı-1 (PD-L1) ve Programlı Hücre Ölümü Ligandı-2 (PD-L2)'ye bağlandığında T-hücrelerinin immün yanıtını inhibe eder. PD-L1 dendritik hücrelerde, T hücrelerinde, B hücrelerinde, makrofajlarda ve kanser hücrelerinde ekspres edilir. Tümör mikroortamında artan PDL-1 sentezinin anti-tümöral T hücre yanıtına engel olduğu görülmüştür [1]. Bu nedenle günümüzde antitümör etki sağlayabilmek için PD-1 ve PD-L1 yolağını antikolar ile bloke etmek kullanılabilir seçeneklerden biridir [2]. FDA tarafından, PD-1'e karşı (Nivolumab, Pembrolizumab) ve PD-L1'e karşı (Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) beş adet monoklonal antikoru onaylanmıştır [3,4]. Fakat terapötik antikolara karşı gelişen yaygın komplikasyonlar ve dirençler bunların kullanımlarını sınırlandırmaktadır [5]. Bu olumsuzlukların üstesinden gelebilmek için seçilebilecek bir yol yeni peptit temelli inhibitörler geliştirmektir. PD-1/PDL-1'in kısmen düz ve hidrofobik bir etkileşme yüzeyine sahip olması yeni inhibitör sentezinde major bir kısıtlayıcı rol oynamaktadır [6]. Antikoların proteinler ile etkileştikleri bölgenin genellikle peptit zincirleri üzerinden sağlanması nedeniyle PD-1/PDL-1 etkileşimini antagonize eden peptit temelli bileşikler üzerinden hedefe yönelik immünoterapi ajanlarının geliştirilmesinin alternatif bir yol olacağı değerlendirilmiştir.

Mevcut çalışmada; PD-1/PDL-1 yolağını hedefleyen peptit temelli yeni immunoterapotik moleküllerin dizaynı ve sentezi hedeflenmiştir. Bu amaçla komputasyonel metodlar aracılığıyla dördü amino asit kombinasyonları taranmış ve toplam 160.000 adet dördü peptitin PD-L1 reseptörüne bağlanma hesapları gerçekleştirilmiştir. MD simülasyonları ile stabil olan peptitler seçilerek katı hal peptit sentez yöntemiyle sentezlenmiş ve HPLC ile saflaştırılarak HRMS ile karakterize edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; PD-L1 proteinin kristal yapısı protein veri bankasından 5J80 kodlu yapıdan elde edilmiştir. Bu yapıda PD-L1 ile kompleks halinde bir inhibitör molekülünün de yapısı bulunmaktadır. Docking hesaplarında bu inhibitör molekülünün bağlandığı bölge bağlanma bölgesi olarak kullanılmıştır. Docking hesapları AutoDock Vina programı ile gerçekleştirilmiştir. Docking hesapları için bütün dördü amino asit kombinasyonları denenmiştir. Toplam 160.000 dördü peptitin PD-L1 reseptörüne bağlanma hesapları gerçekleştirilmiştir. Docking programı ile tahmin edilen yüksek skora sahip peptitlerin MD simülasyonları ile stabil olup olmadıkları incelenmiştir. Bağlanma skoru en iyi olan 100 peptitin PD-L1 ile MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Komputasyonel çalışmalar sonucunda seçilen peptitlerin sentez basamağında ise, Fmoc koruma gruplu reçine, peptit sentez kolonunda DMF içinde şişirildikten sonra, fazla çözücü süzülerek birleştirme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reçine üzerindeki Fmoc koruma grubu hazırlanan piperidin çözeltilisi ile kesildikten sonra, ilgili amino asit, DMF içerisinde çözülüp, HBTU ve DIEA ilave edilerek amino asit kokteyli hazırlanmıştır. Katı hal peptit sentezi C ucundan N ucuna doğru ilerlediği için sentez sırasında ilk olarak C ucundaki amino asit için hazırlanan kokteyl eklenmiştir. Reaksiyon gerçekleştikten sonra vakum yardımıyla amino asit karışımı filtrelenip, DMF ile yıkanmıştır. Fmoc grubunun kesilmesi, DMF ile yıkama işlemi, yeni amino asite ait kokteylin hazırlanıp eklenmesi işlemi tüm amino asitler için sırasıyla uygulanmıştır. İstenilen peptit dizisi sentezlendikten sonra peptidil reçine DCM ile yıkanarak kurutulmuştur. Reçineden kesme işlemi için kesme kokteyli (%98 TFA, %1 DCM, %1 TIPS) reçineye eklenerek 60 dakika bekletilmiş, vakum ile süzme işlemi yapılarak döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak peptit elde edilmiştir.

Rodamin B takılı peptitlerin sentezleri de yine katı hal peptit sentezi yöntemiyle yapılmıştır. Her peptite “mtt” koruma grubuna sahip Lizin (K^{*}) amino asidi takılmıştır. Reçine üzerinde sekansı tamamlanan peptitten ilk olarak bu lizin grubuna sahip lizin (K) amino asidine ait “mtt” grubu DCM içinde %1’lik TFA çözeltisi ile kırılır. DCM içinde %1’lik TFA çözeltisi ile mtt grubu kırılması renk dönüşüne kadar devam ettirilir. Rodamin B molekülü, HBTU, DIPEA ile DMF çözeltisi reaksiyon kolonuna konularak lizin amino asidine ait amin grubuna bağlanması sağlanır. Daha sonra peptitin kalan koruma gruplarını kırmak ve peptidi reçineden kesmek için kesme kokteyli (%98 TFA, %1 dH₂O, %1 TIPS) ile peptit reçineden kesilir. Son kez vakumlama yapılarak elde edilen peptit -20°C dondurucuda saklanır. Peptitlerin saflaştırılması Thermo Scientific Hypersil GOLD C18 kolonu (250mm x 10.0 mm, 12µm) kullanılarak SHIMADZU marka ters faz semipreparatif-HPLC cihazı ile yapılmıştır. Akışkan fazda %0,1 TFA içeren H₂O ve %0,08 TFA içeren asetonitril kullanılmıştır ve peptitler 40 °C’de 214 nm’deki absorpsiyon değeri takip edilerek ölçülmüştür. Asetonitril konsantrasyonu 55 dk’da %5’ten %100’e çıkacak şekilde, 5 mL/dk akış hızında ayarlanmıştır. Peptitler, 2.5 mL asetonitril ve 2.5 mL suda çözülerek 0,45 µm por boyutuna sahip filtreden süzülerek cihaza 5 mL olarak enjekte edilmiştir. Saflaştırılması tamamlanan peptitler dondurularak kurutma yöntemiyle liyofilizatörde kurutulmuştur.

Peptitlerin karakterizasyonu ters faz HPLC ve LC-MS cihazları ile yapılmıştır. Peptitlerin saflık yüzdeleri GL Science Inertsil ODS-3 C18 kolonu (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) ile SHIMADZU Semi-Preparatif Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi kullanılarak ölçülmüştür. Peptitlerin saflaştırılmasında kullanılan akışkan faz ve sıcaklık analitik metotta da kullanılmıştır. Burada peptitler, 500 µL asetonitril ve 500 µL suda çözülerek 1 mg/mL gibi düşük bir konsantrasyonda hazırlanmıştır. Asetonitril konsantrasyonu 30 dk’da %1’den %100’e çıkacak şekilde, 1 mL/dk akış hızında ayarlanmış ve 214 nm’deki absorpsiyon değeri takip edilerek peptitlerin saflığı ölçülmüştür. Kütle ölçümleri ile de peptitlerin kimlikleri tanımlanmıştır. LC/MS-High Resolution Quadrupole Mass Time-of-Flight (Q-TOF) (HRMS) cihazı ile kütle ölçümleri alınmıştır.

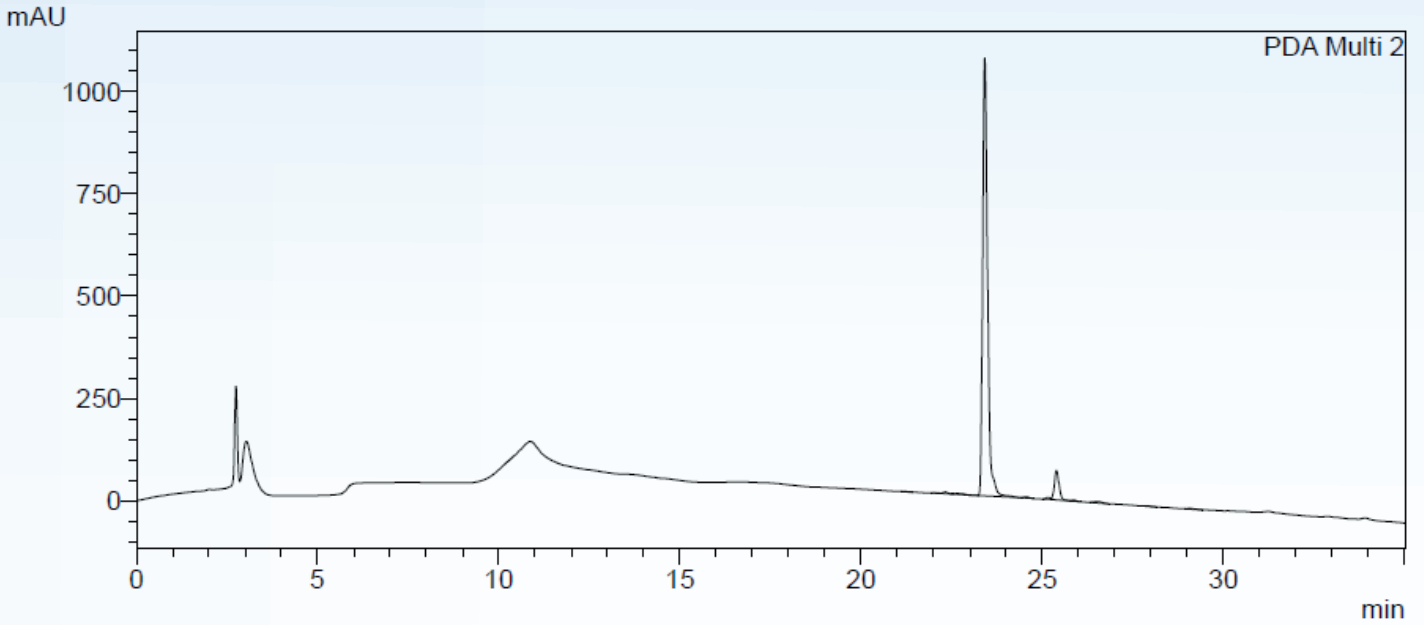
BULGULAR VE TARTIŞMA

PD-L1 peptit komplekslerinin simülasyonları sonucunda, proteinden ayrılmayan ve RMSD grafiklerinde dengeye geldiği görülen YFAW, YWAY, WQWW, WAIW amino asit dizilimindeki peptitler sentez için seçilmiştir. Peptitler katı hal peptit sentez yöntemi ile sentezlenerek RP-HPLC ile saflaştırılmıştır. HR-MS ile karakterize edilerek analitik HPLC ile saflıkları tespit edilmiştir. Analitik HPLC ile elde edilen spektrumlarda saflıkların peptitlerle yapılan in vitro çalışmalarda genel kabul gören %90 ve üzerindeki saflık değerlerinde oldukları tespit edilmiştir (Tablo 1). K(RhB)YFAW ve K(RhB) YWAY peptitlerine ait analitik HPLC kromatogramı, pik tablosu ve LC-HRMS spektrumu aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 1 PD-L1’e yönelik sentezlenen peptitlere ait saflık yüzdeleri.

	Peptit Sekansı	Molekül Ağırlığı	% Saflık
1	K(RhB)YFAW	1136.10	92.0
2	K(RhB)YWAY	1152.09	96.2
3	K(RhB)WQWW	1255.15	96.8
4	K(RhB)WAIW	1125.14	94.0

Analitik HPLC sonucu K(RhB)YFAW peptidine ait kromatogram ve kromatograma ait pik değer tablosu gösterilmiştir (Şekil 1). Kromatogram ve tabloya bakıldığında, peptide ait saflık pikinin 23.4’üncü dakikada geldiği görülmektedir. Analitik HPLC sonucu peptite ait pikin saflık değeri %92 olarak ölçülmüştür.



PeakTable

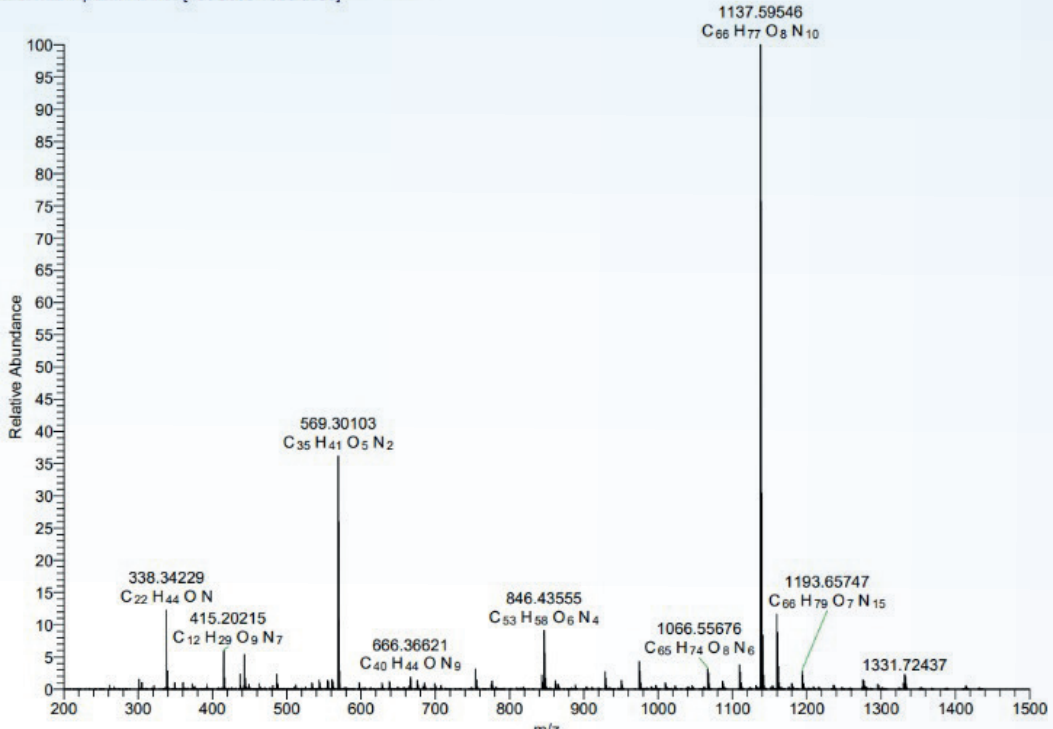
PDA Ch2 214nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	21.146	3522	314	0.032	0.027
2	22.066	3720	466	0.034	0.040
3	22.318	29398	3565	0.266	0.306
4	22.650	38009	2318	0.344	0.199
5	23.084	1629	208	0.015	0.018
6	23.409	10151596	1069047	92.001	91.883
7	24.556	26116	3080	0.237	0.265
8	25.149	35949	4211	0.326	0.362
9	25.387	645088	71553	5.846	6.150
10	25.853	18903	2433	0.171	0.209
11	26.528	52215	3632	0.473	0.312
12	27.889	8790	793	0.080	0.068
13	29.058	19333	1862	0.175	0.160
Total		11034269	1163483	100.000	100.000

Şekil 1 K(RhB)YFAW peptidine ait analitik HPLC kromatogramı ve pik tablosu.

K(RhB)YFAW peptidinin sentezlendiği kütle analizi ile doğrulanmıştır. Peptide ait kütle bilgileri ve kütle analiz sonucu aşağıdaki gibidir (Şekil 2). K(RhB)YFAW peptidinin gerçek kütlesi 1136.10, teorik M+1 değeri ise 1137.10'dur. LC-HRMS spektrumunda ise deneysel M+1 değeri 1137.60 bulunmuştur.

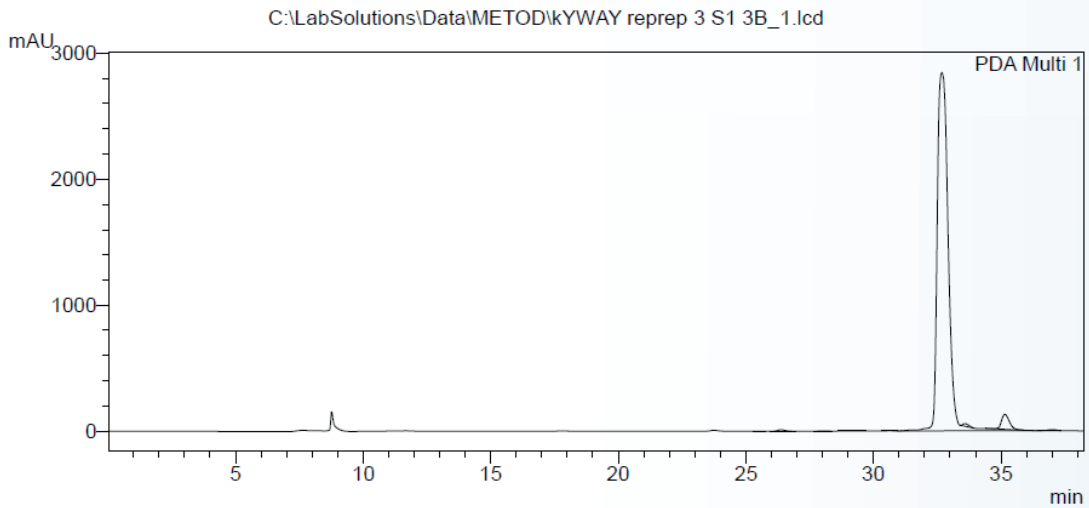
kYFAW S1_POS #1 RT: 0.01 AV: 1 SM: 7G NL: 1.52E9
T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1500.0000]



Şekil 2 K(RhB)YFAW peptidine ait LC-HRMS spektrumu.

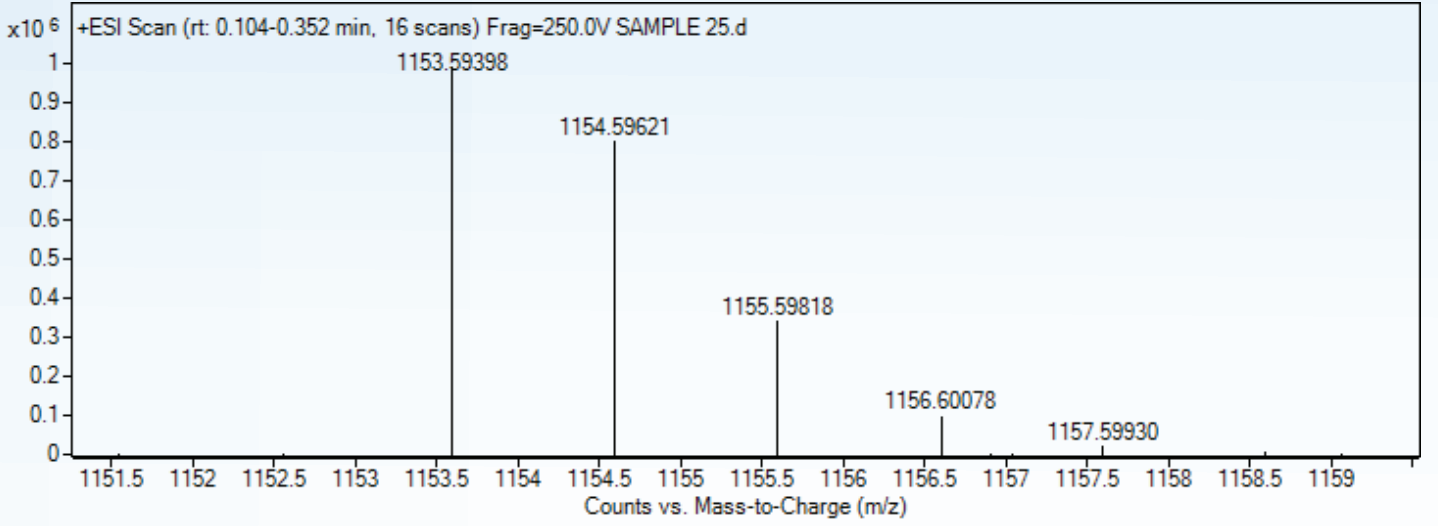
Analitik HPLC sonucu K(RhB) YWAY peptidine ait kromatogram ve kromatograma ait pik değer tablosu gösterilmiştir (Şekil 3). Kromatogram ve tabloya bakıldığında, peptide ait saflık pikinin 32.6'ncı dakikada geldiği görülmektedir. Analitik HPLC sonucu peptide ait pikin saflık değeri %96.2 olarak ölçülmüştür.

<Chromatogram>



Şekil 2 K(RhB)YWAY peptidine ait analitik HPLC kromatogramı ve pik tablosu.

K(RhB)YWAY peptidinin sentezlendiği kütle analizi ile doğrulanmıştır. Peptide ait kütle bilgileri ve kütle analiz sonucu aşağıdaki gibidir (Şekil 4). K(RhB)YFAW peptidinin gerçek kütlesi 1152.09, teorik M+1 değeri ise 1153.09'dur. LC-HRMS spektrumunda ise deneysel M+1 değeri 1153.59 bulunmuştur.



Şekil 4 K(RhB)YWAY peptidine ait LC-HRMS spektrumu.

SONUÇLAR

Komputasyonel metodlar aracılığıyla PD-1/PDL-1 yolağını hedefleyen dörtlü amino asit kombinasyonları taranması sonucu, toplam 160.000 adet dörtlü peptidin PD-L1 reseptörüne bağlanma hesapları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Moleküler Dinamik simülasyonları ile stabil olan peptitler seçilerek, bu amino asit sekansları katı hal peptit sentez yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen peptitler semipreparatif-HPLC ile saflaştırılmış ve saflık yüzdeleri %90 üzeri ölçülmüştür. Saflaştırılan peptitler LC-HRMS ile de karakterize edilmiştir. Sonraki çalışmalarda ise; bu sentezlenen moleküllerin kanserle ilgili immunolojik yolları hedefleyebilme özellikleri nedeniyle, immün sistem hücrelerindeki etkileri, hücre proliferasyonu ve canlılıkları incelenecektir.

KAYNAKÇA

- [1] Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*. 2018;48:434-452.
- [2] Jia L, Zhang Q, Zhang R. PD-1/PD-L1 pathway blockade works as an effective and practical therapy for cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med*. 2018;15:116-123.
- [3] Weber J. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol*. 2010;37:430-439.
- [4] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12: 252-264.
- [5] Cai S, Yang X, Chen P, Liu X, Zhou J, Zhang H. Design, synthesis and biological evaluation of bicyclic carboxylic acid derivatives as IDO1 inhibitors. *Bioorg Chem*. 2020;94:103356.
- [6] Zarganes-Tzitzikas T, Konstantinidou M, Gao Y, Krzemien D, Zak K, Dubin G, Holak TA, Dömling A. Inhibitors of programmed cell death 1 (PD-1): a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat*. 2016;26:973-977.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın bir bölümü 116E661 numaralı TÜBİTAK 1003 projesi ile desteklenmiştir.

POSTER SUNUMLAR

YENİ NİKOTİNAMİT FOSFORİBOZİLTRANSFERAZ (NAMPT) İNHİBİTÖR ADAYLARININ SANAL TARAMA YÖNTEMİ İLE KEŞFİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

P1

Fikriye ÖZGENCİL¹, Yeşim ÖZKAN², Gökçen EREN¹

¹SIRTeam Grup, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara

²Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara

(e-posta: fikriyeozgencil@gazi.edu.tr)

GİRİŞ

Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) hücre metabolizmasında görev alan önemli bir redoks kofaktördür ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalık durumunda önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir [1]. NAD⁺ aynı zamanda pek çok NAD⁺-bağımlı enzim için substrat görevi yapmakta ve özellikle PARP, SIRT ve ART gibi sinyal iletiminde rol oynayan enzimlerin aktiviteleri için de gereklidir [2, 3]. Kanser hücrelerinde, hızla çoğalmanın gerçekleşebilmesi için adenozin trifosfat (ATP) ihtiyacının artması ve NAD⁺-tüketen enzimlerin artan aktivitesi sonucu NAD⁺ hızlıca tüketilmektedir [4]. Bu nedenle kanser hücreleri, normal hücelere nazaran NAD⁺ varlığına daha duyarlı hale gelmekte ve hızlıca çoğalmanın sağlanabilmesi için NAD⁺ seviyelerini tekrar yükseltilmesi gerekmektedir [5]. NAD⁺, memeli hücrelerinde triptofan amino asidinden “de novo” sentez yolağı ile sentezlenebildiği gibi nikotinamitin (NAM), nikotinik asitin (NA) veya nikotinamid ribozidin (NR) prekürsör olarak kullanıldığı üç ayrı kurtarma yolağı üzerinden de elde edilebilmektedir. Bu yollar arasında prekürsör olarak NAM'ın kullanıldığı yolak, hücrel NAD⁺ 'ın ana kaynağını oluşturmaktadır. Nikotinamid fosforiboziltransferazın (NAMPT) bu yolakta hız limitleyici enzim olduğu dikkate alındığında, NAMPT inhibisyonunun NAD⁺ metabolizmasını ve kanser hücresinin aşırı ve zamansız çoğalmasını önemli ölçüde etkilediği görülmüştür [6, 7]. Bu nedenle NAMPT, kansere karşı geliştirilen yeni stratejiler arasında ilgi çekici bir hedef haline gelmiştir. Günümüze kadar literatürde kimyasal yapı olarak çeşitlilik gösteren, etkili NAMPT inhibitör moleküller bildirilmiştir [4, 8, 9]. Bu moleküller arasından FK866, CHS828 ve ön ilacı GMX1777 insan klinik denemelere girmiştir [10-12]. Fakat sebep oldukları trombositopeni ve çeşitli gastrointestinal yan etkiler, bu moleküllerin klinik denemelerde ilerlemelerine engel olmuştur [13, 14]. Bu nedenle, yeni kimyasal yapı iskeletine sahip, etkili NAMPT inhibitörlerine ihtiyaç devam etmektedir.

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında son yıllarda kanser ve metabolizma hastalıklarının tedavisi için yeni bir hedef haline gelen NAMPT enzimine karşı inhibitör etkili yeni moleküllerin keşfi amacıyla literatürde kayıtlı amit, üre ve siyanoguanidin türevi NAMPT inhibitörlerinden yola çıkılarak farmakofor temelli sanal tarama çalışması yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Farmakofor modelleme

Farmakofor modelleme çalışmaları, Schrödinger Küçük Molekül ilaç Keşfi programı (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2018-1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) kullanılarak yapılmıştır. Farmakofor model oluşturmak amacıyla daha önce insan NAMPT enzimi üzerinde inhibitör etkileri bildirilmiş siyanoguanidin, üre ve amit türevi toplamda yirmi yedi NAMPT inhibitörü literatürden derlenmiş ve veri seti oluşturulmuştur [5, 15-25]. Farmakofor model oluşturma sürecinden önce, moleküllerin hizalanması gerçekleştirilmiştir. İnsan NAMPT x-ray kristal yapılarına bağlı olarak bulunan siyanoguanidin türevi (PDB kodu: 4LTS) [18] üre türevi (PDB kodu: 4JNM) [23] ve amit türevi (PDB kodu: 4M6P) [17] koligandlara ait biyoaktif konformasyonlar sabit tutularak, hizalamalarda referans olarak kullanılmış, işlem sonunda hizalanmış üç ayrı molekül seti elde edilmiştir. Moleküllerin hizalanması, Schrödinger programının Flexible Ligand Alignment modülü ile ortak yapı iskeletleri temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hizalı molekül setleri kullanılarak Schrödinger programının Phase modülünde yer alan “Developing Pharmacophore Model” protokolü ile istenilen farmakofor özellikler tanımlanarak ortak farmakofor yöntemi ve E-farmakofor yöntemi kullanılarak 6 adet farmakofor model elde edilmiştir (Tablo 1).

Farmakofor model doğrulama

Seçilen farmakofor modeller, performanslarının değerlendirilmesi için doğrulama işlemine tabi tutulmuşlardır. Decoy finder programı ile ZINC “drug-like” bileşik kütüphanesi üzerinden 1240 adet insan NAMPT enzimine karşı aktivitesi olmayan molekül elde edilmiştir. Bunun yanında, veri setine eklenmeyen fakat literatürde insan NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilen 50 adet inhibitör seçilmiştir. Tarama sonuçları farmakofor modellerin verimini ve yeterliliğini ortaya koyan doğruluk, hassasiyet, EF ve GH gibi göstergeler hesaplanmış, ROC analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sanal tarama basamağında kullanılmak üzere ROC grafiklerinde, her model için “model yorulma noktası” belirlenmiştir.

Sanal tarama

Sanal tarama basamağı, doğrulanmış farmakofor modeller ile yaklaşık 13 milyon molekülden oluşan ZINC “drug-like” sanal kütüphanesi kullanılarak Hızlı Esnek arama yöntemi üzerinden gerçekleştirilmiş, doğrulanmış farmakofor modelin taşıdığı özellikleri karşılayan moleküller tarama çıktısı olarak belirlenmiş ve farmakofor uyum puanına göre sıralanmıştır. Elde edilen sanal tarama çıktısı moleküller, filtreleme basamağına geçirilmiş, ilk filtre olarak ROC analizlerinde [26] her farmakofor model için belirlenen model yorulma noktası uygulanmıştır. Doğrulanmış modellere ait performansların bozulma gösterdiği yüzdellik dilimlere göre sanal tarama çıktısı moleküllerin ilgili yüzdellik dilimleri değerlendirmeye alınmıştır. Daha sonra Lipinski'nin beş kuralı, ADMET, sentezlenebilme, reaktivite ve görsel inceleme gibi filtrelerle ikinci bir inceleme gerçekleştirilmiş ve tüm filtrelerden geçen sanal tarama çıktıları moleküler docking basamağına iletilmiştir.

Moleküler docking

İnsan NAMPT x-ray kristal yapıları (PDB kodları: 4LTS, 4JNM, 4M6P), RCSB Protein Data Bank veri tabanından indirilmiş, Schrödinger programının Protein Preparation Wizard modülü kullanılarak hazırlanmıştır. Enzim x-ray kristal yapısına bağlı inhibitör molekül seçilerek, inhibitörün çevresinde aktif bölgeyi koordinatlarıyla tanımlayan 20 Å'luk bir kutu (grid) “receptor grid generation” paneli ile oluşturulmuştur. Elde edilen reseptör grid dosyaları moleküler docking çalışmasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Moleküler docking çalışmaları, Schrödinger programının Glide modülüne ait sanal tarama iş akışı protokolüne [27] göre gerçekleştirilmiştir. Protokol çok basamaklı bir iş akışından oluşmaktadır: (i) Glide yüksek çıktılı sanal tarama (HTVS), (ii) standart duyarlılık (SP) ile docking, (iii) ekstra duyarlılık (XP) ile docking ve (iv) MM-GBSA ile işlem sonrası değerlendirme. Bu basamaklardan başarıyla geçen sanal tarama çıktısı moleküller, ilgili insan NAMPT kristal yapısına sanal tarama iş akışı protokolü ile yerleştirilmiş, elde edilen bağlantı modları XP Gscore ile puanlandırılmıştır. XP Gscore puanı -5 kkal/mol değerinden yüksek olan bağlantı modlarına sahip moleküller elenmiştir. Kalan moleküller ise aktif bölgeyi oluşturan amino asitlerle beklenen etkileşimleri sağlayıp sağlamadığına ve aynı zamanda ilgili farmakofor modele de uyumu sağlamasına göre tekrar incelenmiş, sonuç olarak yirmi üç adet moleküle ulaşılmıştır. Bu moleküllerden on adeti aday molekül olarak seçilmiş ve satın alınmıştır.

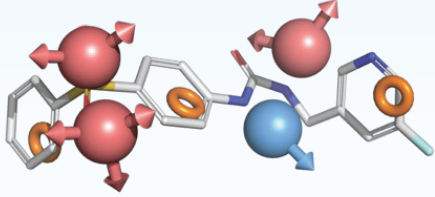
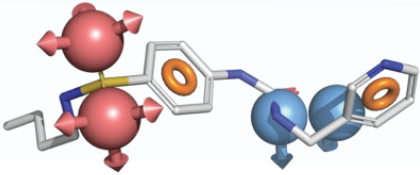
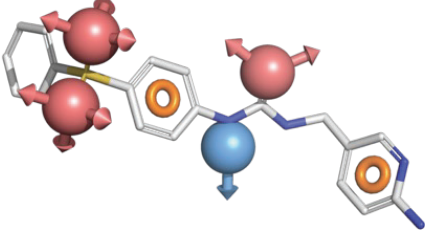
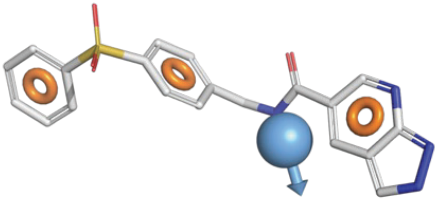
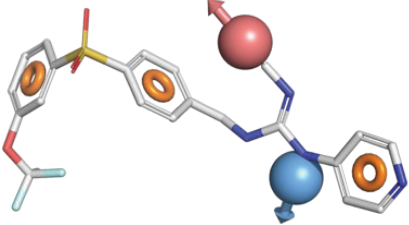
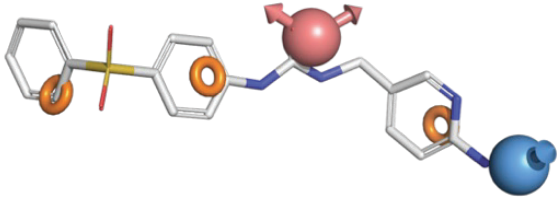
İn Vitro NAMPT İnhibisyon Testi

Sanal tarama çıktısı bileşiklerin in vitro NAMPT inhibitör etkilerinin belirlenmesinde BPS Bioscience NAMPT Inhibitor Screening Assay Kiti (Katalog No: 71276) [28] üretici firmanın belirlediği protokole uyularak kullanılmıştır. Referans bileşik olarak NAMPT inhibitörü FK866 seçilmiştir. Sanal tarama bileşikleri ve FK866 300, 100, 30 ve 10 µM olmak üzere dört konsantrasyonda taranmıştır. IC50 değerleri GraphPad Prism programı (v7.04, demo, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) ile nonlinear regresyon (inhibitor vs response) yöntemi üzerinden hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yeni NAMPT inhibitör bileşiklere ulaşmak amacıyla farmakofor-temelli sanal tarama çalışması yapılan bu çalışmada, ligand- ve yapı-temelli ilaç tasarımı yaklaşımlar bir arada kullanılmıştır. Literatürden derlenen NAMPT inhibitörlerinden yola çıkarak oluşturulan farmakofor model ligand-temelli yaklaşımı karşılarken, molekül hizalama basamağında NAMPT x-ray koligandına ait biyoaktif konformasyonun kullanılması aktif bölge özelliklerini sunduğundan yapı-temelli yaklaşımın da dahil olmasını sağlamıştır. Farmakofor model oluşturmak için kullanılan E-farmakofor yöntemi de enzim-inhibitör etkileşimine dayandığı için yine bu iki yaklaşımın birleştirilmesine olanak vermiştir.

Tablo 1 Elde edilen farmakofor modeller.

Farmakofor model	Bileşenleri	Referans molekül ile gösterimi**
Model 1	AAADRRR	
Model 2	AADRRR	
Model 3	AAADRR	
Model 4	DRRR	
Model 5	ADRRR	
Model 6	ADRRR	

*Hidrojen bağı akseptörü (A) kırmızı, hidrojen bağı donörü (D) mavi, aromatik halka (R) turuncu renk ile gösterilmiştir.

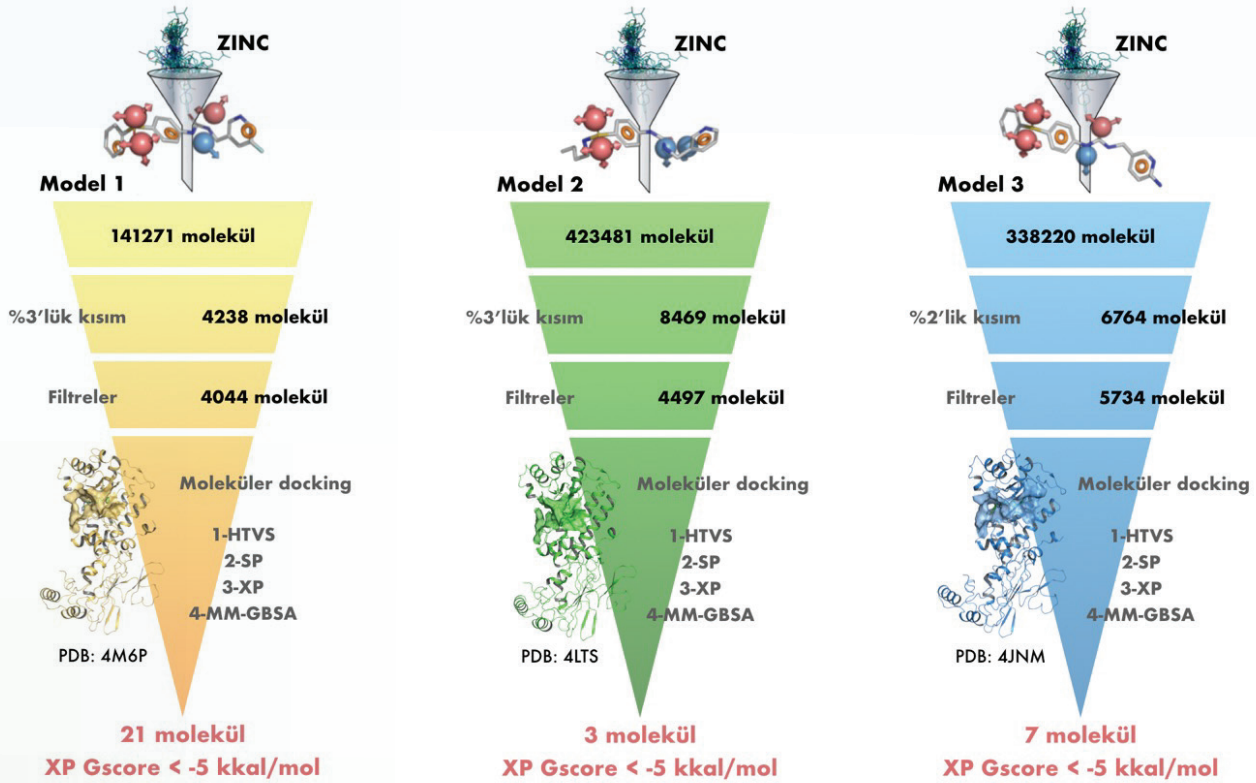
Bu tez çalışmasının moleküler modelleme bölümünde üçü ortak farmakofor yöntemi, üçü e-farmakofor yöntemi kullanılarak toplamda altı farmakofor model (Model 1-6) elde edilmiştir. Farmakofor model doğrulama basamağı sonunda elde edilen parametreler değerlendirildiğinde (Tablo 2), altı model içerisinde Model 1, tarama sonucu 23 adet aktif molekül tanımlanmış, 30 adet molekül aktif olmasına rağmen inaktif olarak, 3 inaktif molekülü de aktif olarak tanımlamıştır. Model 2, Model 1 ile benzerlik gösterirken Model 3 28 aktif molekülü tanımlamış ve aktif olmasına rağmen inaktif olarak bulunduğu molekül sayısı 22, inaktif olması gerekirken aktif olarak tanıdığı molekül sayısı 7 olarak bulunmuştur. Model 4-6 için elde edilen sonuçlarda ise aktif-inaktif molekül ayırımının yani % aktif veriminin Model 1-3 sonuçlarına göre düşük olduğu gözlemlenmiştir. GH değerlerine göre Model 1-4 kullanılabilir modeller olarak düşünülürken, Model 5 ve 6 performans açısından iyi sonuçlar vermemiştir. Bu nedenle sanal tarama aşamasında bu modellerin kullanılmayacağına karar verilmiştir. ROC ve BEDROC değerleri incelendiğinde ise Model 4'ün yetersiz kaldığı görülmüştür. Hesaplanan bu parametrelerin bire yakın olması farmakofor model performansının iyi olduğunu gösterdiğinden Model 4 de sanal taramada kullanılacak modeller dışında kalmıştır.

Tablo 2 Farmakofor model performansını belirleyen parametreler

Parametreler*	Farmakofor Modeller					
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5	Model 6
D	1290	1290	1290	1290	1290	1290
A	50	50	50	50	50	50
H	23	27	35	17	58	49
TP	20	21	28	15	22	24
FN	30	29	22	35	28	26
FP	3	6	7	2	36	25
TN	1237	1234	1233	1238	1204	1215
% Aktif verim	87	78	80	88	38	49
% Aktif oran	40	42	56	30	44	48
Se	0,40	0,42	0,56	0,30	0,44	0,48
Sp	0,99	0,99	0,99	0,99	0,97	0,98
Doğruluk	0,97	0,97	0,98	0,97	0,95	0,96
Kesinlik	0,87	0,78	0,80	0,88	0,38	0,49
GH	0,75	0,69	0,74	0,74	0,38	0,48
ROC	0,40	0,42	0,56	0,30	0,44	0,48
BEDROC ($\alpha=20$)	0,48	0,50	0,63	0,38	0,51	0,55
BEDROC ($\alpha =160$)	0,85	0,87	0,92	0,81	0,87	0,91
RIE	6,75	7,01	8,92	5,30	7,11	7,79
AUAC	0,69	0,70	0,77	0,64	0,70	0,73
EF (manuel)	22,61	20,22	20,80	22,94	9,86	12,73
EF (%1)	22	24	26	22	26	26

*D: Veri tabanındaki toplam molekül sayısı; A: Veri tabanındaki toplam aktif molekül sayısı; H: Veri tabanının taranması sonucu ulaşılan çıktı molekül sayısı; TP (true positive): Aktif çıktı moleküllerin sayısı; FN (false negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen aktif molekül sayısı; FP (false positive): Veri tabanındaki çıktı olarak görülen inaktif molekül sayısı; TN (true negative): Veri tabanındaki çıktı olarak verilmeyen inaktif molekül sayısı; % Aktif verim: $[(TP/H) \times 100]$; % Aktif oran: $[(TP/A) \times 100]$; Se (Sensitivity): $[TP/(TP+FN)]$; Sp (Specificity): $[TN/(TN+FP)]$; Doğruluk: $[(TP+TN)/D]$; Kesinlik: $[TP/(TP+FP)]$; GH (goodness of hit score): $[(TP/4HA)(3A+H)(1-((H-TP)/(D-A)))]$; ROC: Receiver Operating Characteristic; BEDROC: Boltzmann-geliştirilmiş ROC ayrımı; RIE: Robust Initial Enhancement; AUAC: Kümelenmiş eğri altında kalan alan; EF (Enrichment factor): $[(TP/H)/(A/D)]$.

Doğrulama aşamasında yapılan veri seti taramasında yeterli performans gösteren Model 1-3, yaklaşık 13 milyon bileşikten oluşan ZINC "drug-like" sanal kütüphanesinin tarandığı sanal tarama basamağına geçmiştir. Sanal tarama çalışmasının iş akış şeması Şekil 1'de özetlenmiştir. Sanal tarama prosedürü sonunda ulaşılan 31 molekül, kimyasal çeşitliliği sağlayacak şekilde on moleküle indirilmiştir.



Şekil 1 Uygulanan sanal tarama prosedürüne ait iş akış şemaları

Sanal tarama çıktısı olarak belirlenen bu on molekül (GF1-10) satın alınmış, in vitro NAMPT inhibitör etkileri fluorimetrik yöntemle NAMPT enzim kiti kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 3). Ancak GF2, GF3, GF5, GF6 ve GF9 bileşiklerinin fluorojenik özellikte moleküller olması nedeniyle bu bileşiklerin NAMPT inhibitör etkileri hakkında yorum yapılamamıştır. Fluorojenik özellikleri olan bileşikler dışındaki GF1, GF4, GF7, GF8 ve GF10 bileşiklerinin NAMPT % inhibisyon değerleri incelendiğinde iki NAMPT inhibitörüne ulaşıldığı görülmektedir. GF4 ve GF8 (Şekil 2) insan NAMPT enzimini sırasıyla 2,26 μ M ve 7,42 μ M IC50 değerleriyle inhibe etmektedir.

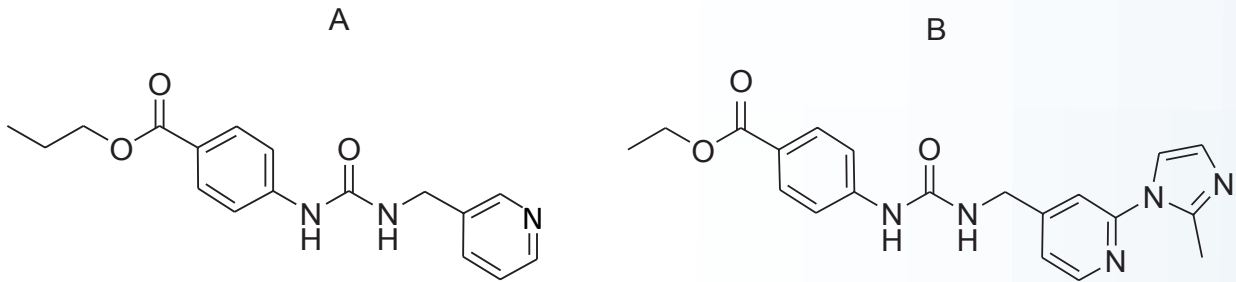
Tablo 3 Final sanal tarama çıktısı moleküllerin in vitro NAMPT inhibisyon değerleri**

Kod	% İnhibisyon değerleri ± standart sapma			
	300 µM	100 µM	30 µM	10 µM
GF1	48,26 ± 0,55	31,11 ± 0,23	28,06 ± 1,57	15,29 ± 0,05
GF4	100 ± 0,36	100 ± 0,80	100 ± 0,62	100 ± 0,25
GF7	42,39 ± 0,26	30,17 ± 1,38	25,16 ± 1,32	8,75 ± 0,67
GF8	66,70 ± 0,20	62,20 ± 0,66	59,45 ± 0,41	58,52 ± 0,12
GF10	32,91 ± 1,42	9,02 ± 0,88	6,24 ± 0,08	i.y.
FK866	100 ± 0,09	100 ± 1,21	100 ± 0,84	100 ± 0,21

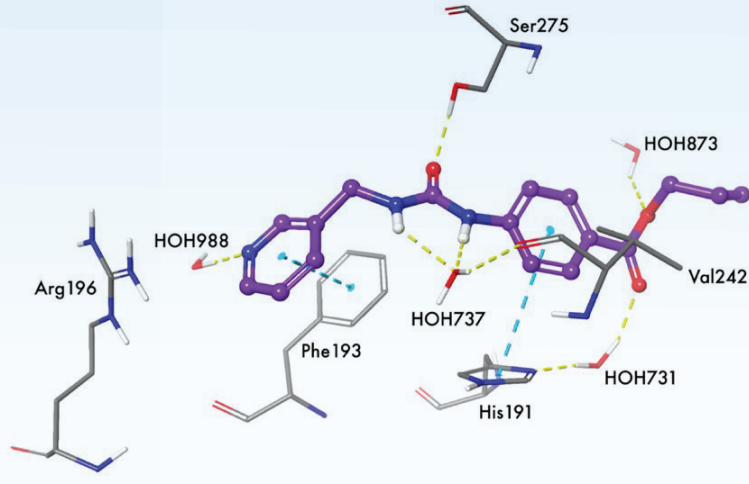
Tablo 4 GF4 ve GF8 bileşiklerinin NAMPT IC₅₀ değerleri*

Kod	% İnhibisyon değerleri ± standart sapma			IC ₅₀ (µM)
	3 µM	1 µM	0,1 µM	
GF4	t.e.	14,32 ± 2,59	i.y.	2,26 ± 1,82
GF8	i.y.	i.y.	t.e.	7,42 ± 2,82

* IC₅₀ değerleri ortalama değer ± standart hata olarak verilmiştir, n=2 olarak test edilmiştir, t.e.: test edilmedi, i.y.: inhibisyon yok.

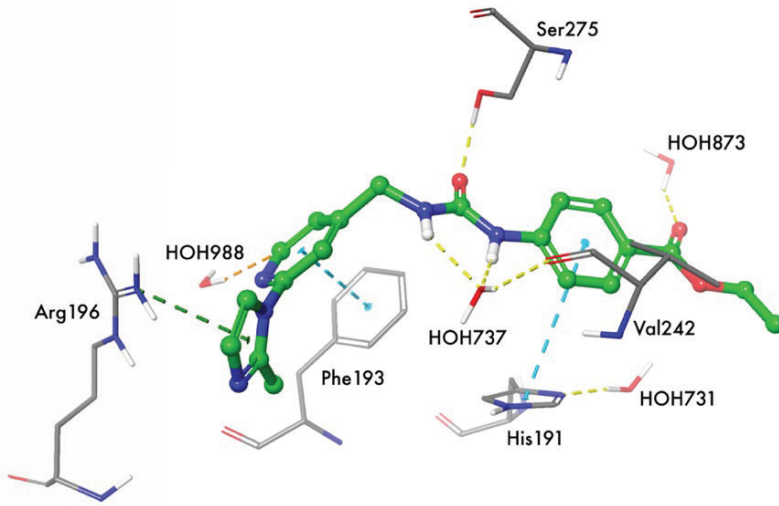
**Şekil 2** GF4 (A) ve GF8 (B) kimyasal yapıları

GF4 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesini oluşturan amino asitlerle etkileşimleri incelendiğinde (Şekil 3), piridin halkasının Phe193 ile, fenil halkasının ise His191 ile π - π etkileşimlerde bulunduğu görülmüştür. Üre yapısına ait karbonil oksijeni Ser275 ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Tüm insan NAMPT x-ray kristallerinde korunduğu görülen aktif bölge su molekülleri ile de etkileşimler görülmüş, üre grubunun azot atomlarına bağlı hidrojen atomları Val242 ile HOH737 aracılı hidrojen bağı oluşturmuştur. Fenil halkasına bağlı ester grubunun karbonil oksijeni HOH731 aracılığı ile His191 ile hidrojen bağı meydana getirmiştir. Bu etkileşimlere ilaveten piridin halkasının azot atomunun HOH988 ile, fenil halkasına bağlı ester oksijeninin ise HOH873 ile hidrojen bağı oluşturduğu gözlenmiştir.



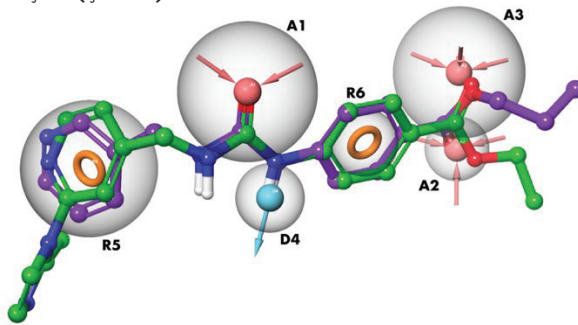
Şekil 3 GF4 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4JNM) bağlantı modu

GF8 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki enzim-inhibitör etkileşimler incelendiğinde, GF4 ile benzer bir bağlantı moduna sahip olduğu gözlenmiştir. GF4 bileşiği için gözlenen piridin halkası-Phe193 ve fenil halkası-His191 arasındaki π - π etkileşimleri, üre grubuna ait karbonil oksijeni ile Ser275 arasındaki hidrojen bağı, üre grubuna ait azot hidrojenlerinin Val242 ile HOH737 aracılıklı yaptığı hidrojen bağları ve ester grubunun karbonil oksijeni ile His191 arasındaki HOH731 aracılıklı hidrojen bağı, GF8 bileşiği için de gözlenmiştir. Yine GF4 bileşiği gibi HOH873 ve HOH988 aktif bölge su molekülleriyle hidrojen bağları meydana getiren GF8, GF4 yapısından farklı olarak taşıdığı üçüncü halka olan imidazol halkası Arg196 ile π -katyon etkileşimine girmiştir.



Şekil 4 GF8 bileşiğinin insan NAMPT aktif bölgesindeki (PDB kodu: 4JNM) bağlantı modu

GF4 ve GF8 bileşiklerinin aktif bölge amino asitleriyle meydana getirdikleri etkileşimlerin FK866 gibi bilinen NAMPT inhibitörlerinin etkileşimleriyle aynı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bileşikler, bu konformasyonda farmakofor model uyumunu da sağlamıştır. GF8 bileşiğinin Model 3 bileşeni hidrojen bağı akseptör özelliğini (A2) GF4 bileşiğine göre tam olarak karşılamaması, iki bileşik arasındaki aktivite farkının sebebi olarak düşünülmüştür (Şekil 5).



Şekil 5 GF4 (mor renk) ve GF8 (yeşil renk) bileşiklerinin insan NAMPT aktif bölgesindeki bağlanma modları ile Model 3 arasındaki uyum

SONUÇLAR

Antikanser ilaç geliştirilmesinde ümit veren bir hedef olarak görülen ve gün geçtikçe ilgi odağı haline gelen NAMPT enzimine karşı inhibitör özellikte yeni moleküller keşfetme amacıyla, NAMPT inhibitör aktivitesi bildirilen moleküllerden ve enzim aktif bölgesinin yapısal özelliklerinden yola çıkılarak farmakofor modeller elde edilmiş ve farmakofor-temelli sanal tarama prosedürü uygulanmıştır. Ulaşılan sanal tarama çıktısı moleküllerin in vitro NAMPT inhibitör etkinlikleri değerlendirilmiş ve iki yeni NAMPT inhibitörüne ulaşılmıştır. GF4 (NAMPT IC50=2,26 µM) ve GF8 (NAMPT IC50=7,42 µM) bileşiklerini çalışmaları için öncü moleküller olarak belirlenmiş, inhibitör etkiyi iyileştirmek amacıyla moleküler modelleme yöntemlerinin de desteğiyle yapısal modifikasyonlara gidilerek daha etkili inhibitörlere ulaşılmaya çalışılmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Sharif T, Martell E, Dai C, Ghassemi-Rad MS, Kennedy BE, Lee PW, Gujar S. Regulation of cancer and cancer-related genes via NAD⁺. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30(6):906-23.
- [2] Yaku K, Okabe K, Hikosaka K, Nakagawa T. NAD Metabolism in Cancer Therapeutics. *Front Oncol*. 2018;12(8):622.
- [3] Poljsak B. NAD⁺ in Cancer Prevention and Treatment: Pros and Cons. *J Clin Exp Oncol*. 2016;5(4):1-15.
- [4] Sampath D, Zabka TS, Misner DL, O'Brien T, Dragovich PS. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacol Ther*. 2015;151:16-31.
- [5] Chen W, Dong G, He S, Xu T, Wang X, Liu N, Zhang W, Miao C, Sheng C. Identification of benzothiophene amides as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(3):765-8.
- [6] Revollo JR, Grimm AA, Imai S-i. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(2):164-70.
- [7] Rongvaux A, Andris F, Van Gool F, Leo O. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *Bioessays*. 2003;25(7):683-90.
- [8] Galli U, Travelli C, Massarotti A, Fakhfour G, Rahimian R, Tron GC, Genazzani AA. Medicinal Chemistry of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) Inhibitors. *J Med Chem*. 2013;56(16):6279-96.
- [9] Xu T-Y, Zhang S-L, Dong G-Q, Liu X-Z, Wang X, Lv X-Q, Qian Q-J, Zhang R-Y, Sheng C-Q, Miao C-Y. Discovery and characterization of novel small-molecule inhibitors targeting nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Sci Report*. 2015;5(1):10043.
- [10] Hasmann M, Schemainda I. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*. 2003;63(21):7436-42.
- [11] Beuparlant P, Bédard D, Bernier C, Chan H, Gilbert K, Goulet D, Gratton M-O, Lavoie M, Roulston A, Turcotte É, Watson M. Preclinical development of the nicotinamide phosphoribosyl transferase inhibitor prodrug GMX1777. *Anti-cancer Drugs*. 2009;20(5):346-54.
- [12] Watson M, Roulston A, Bélec L, Billot X, Marcellus R, Bédard D, Bernier C, Branchaud S, Chan H, Dairi K, Gilbert K, Goulet D, Gratton M-O, Isakau H, Jang A, Khadir A, Koch E, Lavoie M, Lawless M, Nguyen M, Paquette D, Turcotte É, Berger A, Mitchell M, Shore G-C, Beuparlant P. The Small Molecule GMX1778 Is a Potent Inhibitor of NAD⁺ Biosynthesis: Strategy for Enhanced Therapy in Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase 1-Deficient Tumors. *Mol Cell Biol*. 2009;29(21):5872-88.
- [13] von Heideman A, Berglund A, Larsson R, Nygren P. Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(6):1165-72.
- [14] Holen K, Saltz LB, Hollywood E, Burk K, Hanauke A-R. The pharmacokinetics, toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis inhibitor. *Invest New Drugs*. 2008;26(1):45-51.
- [15] Zheng X, Bauer P, Baumeister T, Buckmelter AJ, Caligiuri M, Clodfelter KH, Han B, Ho Y-C, Kley N, Lin J, Reynolds DJ, Sharma G, Smith CC, Wang Z, Dragovich PS, Oh A, Wang W, Zak M, Gunzner-Toste J, Zhao G, Yuen P, Bair KW. Structure-Based Identification of Ureas as Novel Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *J Med Chem*. 2013;56(12):4921-37.

- [16] Zheng X, Bauer P, Baumeister T, Buckmelter AJ, Caligiuri M, Clodfelter KH, Han B, Ho Y-C, Kley N, Lin J, Reynolds DJ, Sharma G, Smith CC, Wang Z, Dragovich PS, Gunzner-Toste J, Liederer BM, Ly J, O'Brien T, Oh A, Wang L, Wang W, Xiao Y, Zak M, Zhao G, Yuen P, Bair KW. Structure-Based Discovery of Novel Amide-Containing Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (Nampt) Inhibitors. *J Med Chem.* 2013;56(16):6413-33.
- [17] Zheng X, Bair KW, Bauer P, Baumeister T, Bowman KK, Buckmelter AJ, Caligiuri M, Clodfelter KH, Feng Y, Han B, Ho Y-C, Kley N, Li H, Liang X, Liederer BM, Ly J, O'Brien T, Oeh J, Oh A, Reynolds DJ, Sampath D, Sharma G, Skelton N, Smith CC, Treymane J, Wang L, Wang W, Wang Z, Wu H, Wu J, Ziao Y, Yang P, Zak M, Dragovich PS. Identification of amides derived from 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylic acid as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(20):5488-97.
- [18] Zheng X, Baumeister T, Buckmelter AJ, Caligiuri M, Clodfelter KH, Han B, Ho Y-C, Kley N, Lin J, Reynolds DJ, Sharma G, Smith CC, Wang Z, Dragovich PS, Oh A, Wang W, Zak M, Wang Y, Yuen P, Bair KW. Discovery of potent and efficacious cyanoguanidine-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(1):337-43.
- [19] Dragovich PS, Bair KW, Baumeister T, Ho Y-C, Liederer BM, Liu X, Liu Y, O'Brien T, Oeh J, Sampath D, Skelton N, Wang L, Wang W, Wu H, Xiao Y, Yuen P, Zak M, Zhang L, Zheng X. Identification of 2,3-dihydro-1H-pyrrolo[3,4-c]pyridine-derived ureas as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(17):4875-85.
- [20] Dragovich PS, Zhao G, Baumeister T, Bravo B, Giannetti AM, Ho Y-C, Hua R, Li G, Liang X, Ma X, O'Brien T, Oh A, Skelton NJ, Wang C, Wang W, Wang Y, Xiao Y, Yuen P, Zak M, Zhao Q, Zheng X. Fragment-based design of 3-aminopyridine-derived amides as potent inhibitors of human nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(3):954-62.
- [21] Clark DE, Waszkowycz B, Wong M, Lockey PM, Adalbert R, Gilley J, Clark J, Coleman MP. Application of virtual screening to the discovery of novel nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with potential for the treatment of cancer and axonopathies. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(12):2920-6.
- [22] Bai J, Liao C, Liu Y, Qin X, Chen J, Qiu Y, Qin D, Li Z, Tu Z-C, Jiang S. Structure-Based Design of Potent Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Inhibitors with Promising in Vitro and in Vivo Antitumor Activities. *J Med Chem.* 2016;59(12):5766-79.
- [23] Gunzner-Toste J, Zhao G, Bauer P, Baumeister T, Buckmelter AJ, Caligiuri M, Clodfelter KH, Fu B, Han B, Ho Y-C, Kley N, Liang X, Liederer BM, Lin J, Mukadam S, O'Brien T, Oh A, Reynolds DJ, Sharma G, Skelton N, Smith CC, Sodhi J, Wang W, Wang Z, Xiao Y, Yuen P, Zak M, Zhang L, Zheng X, Bair KW, Dragovich PS. Discovery of potent and efficacious urea-containing nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with reduced CYP2C9 inhibition properties. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(12):3531-8.
- [24] Chen W, Dong G, Wu Y, Zhang W, Miao C, Sheng C. Dual NAMPT/HDAC Inhibitors as a New Strategy for Multitargeting Antitumor Drug Discovery. *ACS Med Chem Lett.* 2018;9(1):34-8.
- [25] Dong G, Chen W, Wang X, Yang X, Xu T, Wang P, Zhang W, Rao Y, Miao C, Sheng C. Small Molecule Inhibitors Simultaneously Targeting Cancer Metabolism and Epigenetics: Discovery of Novel Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) and Histone Deacetylase (HDAC) Dual Inhibitors. *J Med Chem.* 2017;60(19):7965-83.
- [26] Zhao W, Hevener KE, White SW, Lee RE, Boyett JM. A statistical framework to evaluate virtual screening. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:225.
- [27] Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J Med Chem.* 2006;49(21):6177-96.
- [28] Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong H-K, Chong JL, Buhr ED, Lee C, Takahashi JS, Imai S-i, Bass J. Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis. *Science.* 2009;324(5927):651-4.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 118S726) tarafından desteklenmiştir.

YENİ 2-HİDRAZİNOTİYAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE KOLİNESTERAZ, MONOAMİN OKSİDAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

P2

Beyzanur TUTUŞ^{1,2}, Leyla YURTTAŞ²

1 Mustafa Kemal Üniversitesi Kırıkhan MYO, Eczane Hizmetleri Bölümü, 31440 Hatay.
2 Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir.
(e-posta: beyzanur.tutus@mku.edu.tr)

GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklardan olan Alzheimer ve Parkinson hastalıkları giderek daha yaygın hale gelmektedir. Şu anda, Alzheimer veya Parkinson hastalıklarının tedavisi için saptanmış radikal bir tedavi bulunmamaktadır. Klinikte kullanılan ilaçlar yalnızca semptomatik rahatlama sağlarken nörodejenerasyonu sonlandırma beceresine sahip değildir [1]. Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının tedavisinde genel olarak kullanılan stratejilerden birisi kolinesteraz (ChE) ve monoamin oksidaz (MAO) enzimleri üzerinde inhibitör aktivite göstererek nörotransmitter seviyelerini eski haline döndürmektir [2]. Yapılan bu çalışmada monoamin oksidaz inhibisyonu aktivitesi gösteren moleküllerin yapısında bulunan hidrazin ile asetilkolinesteraz (AChE) ve monoamin oksidaz enzimlerine karşı inhibitör aktivitesi rapor edilmiş olan tiyazol halkası birleştirilerek 2-[2-(süstitü benziliden)hidrazinil]-4-(süstitü fenil)tiyazol türevleri (2a-2p) elde edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntemler

Sentez

Çalışma kapsamında elde edilen bileşikler iki aşamalı sentez prosedürü ile sentezlenmiştir. İlk basamakta seçilen uygun benzaldehit türevleri ile tiyosemikarbazit reaksiyona sokularak oluşturulan ara ürün, 2-(süstitü benziliden)hidrazin karbotiyoamit türevleridir. Elde edilen bu türevler ile α -haloketon yapısındaki 3,4-(disüstitü asetofenon) türevleri Hantzsch tiyazol sentezine göre reaksiyona sokularak final bileşiklerine ulaşılmıştır [3,4].

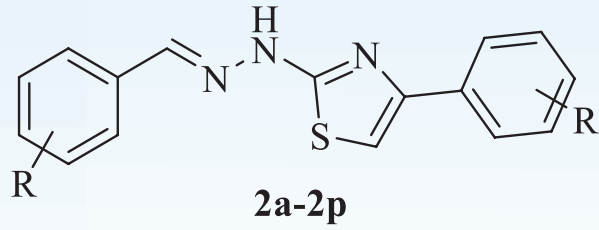
Enzim inhibisyon çalışmaları

Elde edilen bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları için, antikolinesteraz aktiviteleri AChE ve BChE enzimleri üzerinde modifiye Ellman metoduna göre test edilirken, MAO enzim inhibitör aktiviteleri MAO-A ve MAO-B enzimleri üzerinde florometrik metoda göre test edilmiştir [5, 6].

Moleküler modelleme çalışmaları

AChE ve MAO-B enzimlerinin aktif ceplerinde aktif olarak belirlenen maddelerin bağlanma şeklini tanımlama maksadıyla in silico prosedür kullanılarak moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. X-ışını kristal yapıları (PDB ID: 4EY7 ve 2V5Z), Protein Data Bank'tan (www.pdb.org, erişilen 28 Mart 2021) indirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA



Bileşik	R	R'	Bileşik	R	R'
2a	2-Cl	3,4-diCl	2i	2-OH	3,4-diCl
2b	2-Cl	3,4-diOH	2j	2-OH	3,4-diOH
2c	3-Cl	3,4-diCl	2k	3-OH	3,4-diCl
2d	3-Cl	3,4-diOH	2l	3-OH	3,4-diOH
2e	4-Cl	3,4-diCl	2m	4-OH	3,4-diCl
2f	4-Cl	3,4-diOH	2n	4-OH	3,4-diOH
2g	3,4-diCl	3,4-diCl	2o	3,4-diOH	3,4-diCl
2h	3,4-diCl	3,4-diOH	2p	3,4-diOH	3,4-diOH

Şekil 1 Sentezlenen bileşikler.

Sentezlenen bileşiklerin yapıları Şekil 1'de gösterilmiş ve bu yapılar ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektroskopileri ile doğrulanmıştır.

Elde edilen bileşiklerin AChE ve MAO-A enzimlerine karşı gösterdiği inhibitör aktivitesinin BChE ve MAO-B enzimlerine gösterdiği inhibitör aktivitesinden daha fazla olduğu saptanmıştır. Bileşik **2c**, **2e**, **2k** ve **2l**'nin AChE'a karşı en fazla inhibitör aktivite gösteren bileşikler olduğu, ayrıca bileşik **2f**, **2h**, **2j**, **2k** ve **2n**'nin ise MAO-B'ye karşı en fazla inhibitör aktivite gösteren bileşikler olduğu saptanmıştır. Çalışma kapsamında sentezlenen bileşiklerden ise bileşik **2k**'nin hem AChE (0.030±0.001 µM) hem de MAO-B (0.048±0.002 µM) enzimlerine karşı en yüksek inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanında bileşik **2k**'nin AChE/MAO-B dual inhibitör aktivite gösteren serideki tek bileşik olduğu görülmüştür. Bununla birlikte sentezlenen bileşiklerin hiçbirinin standart ilaçlar olan donepezil ve selejilin kadar yüksek aktivite göstermediği fakat standart ilaçlara çok yakın bir değerle aktivite gösterdiği bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1 Bileşiklerin AChE ve MAO-B'ye karşı IC₅₀ değerleri

Bileşik	AChE IC ₅₀ (µM)	Bileşik	MAO-B IC ₅₀ (µM)
2c	0.041±0.001	2f	0.089±0.003
2e	0.069±0.002	2h	0.072±0.003
2k	0.030±0.001	2j	0.162±0.007
2l	0.158±0.007	2k	0.048±0.002
Donepezil	0.020±0.001	2n	0.307±0.012
		Selejilin	0.037±0.002

Yapılan moleküler modelleme çalışmalarına göre bileşiklerin enzim aktivite sonuçları yerleştirme çalışması sonuçlarının uyumlu olduğu bulunmuştur. Yapı-etki ilişkisi bakımından hidrazona bağlı 3. veya 4. konumdan monosübstitüefenil halkasının Trp86 ile bağ oluşturması aktivite açısından değerli bulunmuştur.

SONUÇLAR

2-Hidrazinotiyazol türevlerinin AChE ve MAO enzimleri üzerindeki inhibitör aktivitesinin literatürde birçok çalışmada yer aldığı görülmüştür. Yapılan bu literatür taramasından edinilen bilgilerden yola çıkılarak bu çalışma kapsamında tasarlanan yeni hidrazinotiyazol türevlerinin MAO ve AChE inhibisyon aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Bununla beraber yapı-aktivite çalışmaları kapsamında, sübstitüent etkileri açısından değerlendirilme yapıldığında tiyazolün 4. konumunda bulunan fenil halkasına 3,4-dikloro grubu bağlı bulunduğu AChE inhibisyonuna, 3,4-dihidroksi grubu bağlı bulunduğu MAO-B inhibisyonuna eğilim gözlenmiştir. İlâveten 2-[2-(3-hidroksibenziliden)hidrazinil]-4-(3,4-diklorofenil)tiyazol (2k) bileşiğinin AChE ve MAO-B enzimlerinin her ikisi için de en yüksek aktiviteyi gösterdiği bulunmuştur ve ileriki çalışmalarda her iki enzim üzerinde dual inhibitör aktivite göstermesi gayesiyle tasarlanan bileşiklerde bu tespit edilen yapılar üzerinden tasarım yapılması düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] Cruz-Vicente P, Passarinha L.A, Silvestre S, Gallardo E. Recent developments in new therapeutic agents against Alzheimer and Parkinson diseases: In-silico approaches. *Molecules*. 2021;26(8): 2193.

[2] Mathew B, Parambi DGT, Mathew GE, Uddin MS, Inasu ST, Kim H, Marathakam A, Unnikrishnan MK, Carradori S. Emerging therapeutic potentials of dual-acting MAO and AChE inhibitors in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Arch. Pharm(Weinheim)*. 2019;352: 1900177.

[3] Egan RS, Garmaise DL, Gaunce AP. Intermediates in the Hantzsch thiazole synthesis. *J. Org. Chem.*1968;33(12): 4422-4426.

[4] Ding YQ, Cui YZ, and Li TD. (2015). New views on the reaction of primary amine and aldehyde from DFT study. *J. Phys. Chem. A*. 2015 Apr 23;119(18):25859816.

[5] Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961;7: 88-95.

[6] Sağlık BN, Kaya Çavuşoğlu B, Osmaniye D, Levent S, Acar Çevik U, İlgin S, Özkay Y, Kaplancıklı ZA, Öztürk Y. In vitro and in silico evaluation of new thiazole compounds as monoamine oxidase inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2018;13: 97-108.

TEŞEKKÜR

Bileşiklerin spektroskopik analizlerinin gerçekleştirildiği Anadolu Üniversitesi BİBAM ve DOPNALAB'a; çalışmanın biyolojik aktivite testlerini gerçekleştiren Doç. Dr. Begüm Nurpelin Sağlık ve Öğr. Gör. Asaf Evrim Evren'e teşekkürlerimizi sunarız.

BAZI 2-FENOKSİASETAMİT/ 3-FENOKSİPROPANAMİT TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

P3

Shakila SHAKILA¹, Burcu KILIÇ¹, Rahşan ILIKÇI SAĞKAN², Fatma AKSAKAL³, Deniz S. DOĞRUER¹

¹ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

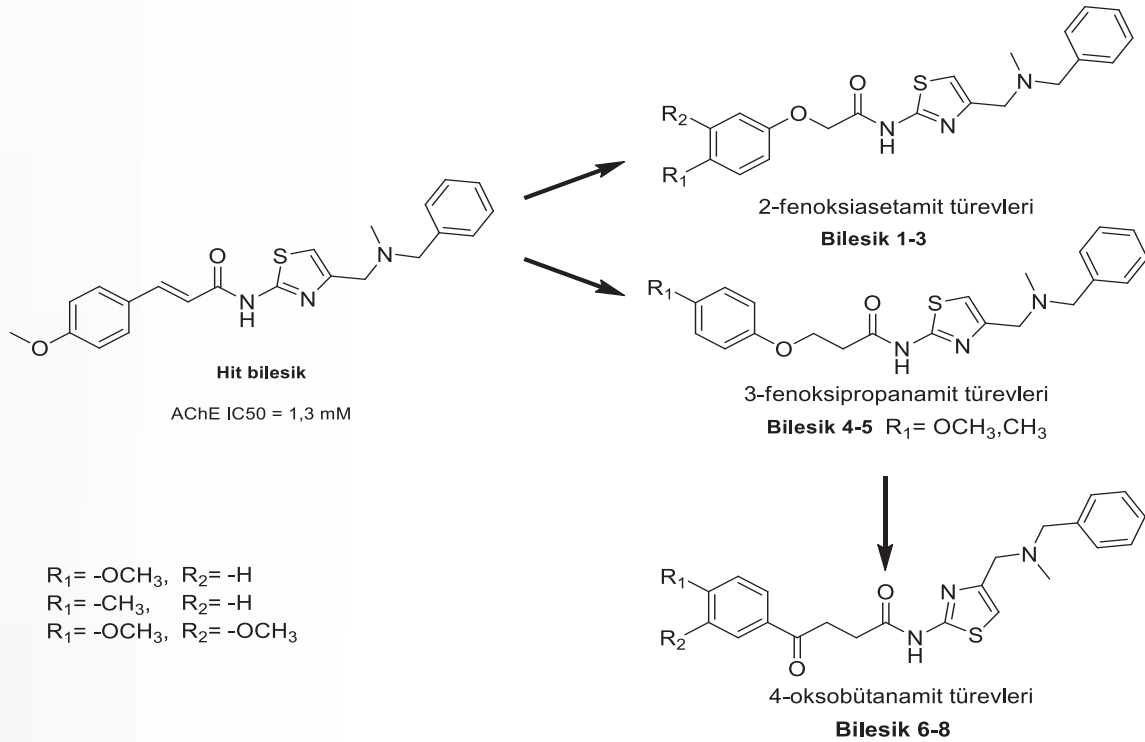
² Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 64000 Uşak.

³ Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, 06230 Ankara

(shakila.shakila@gazi.edu.tr)

GİRİŞ

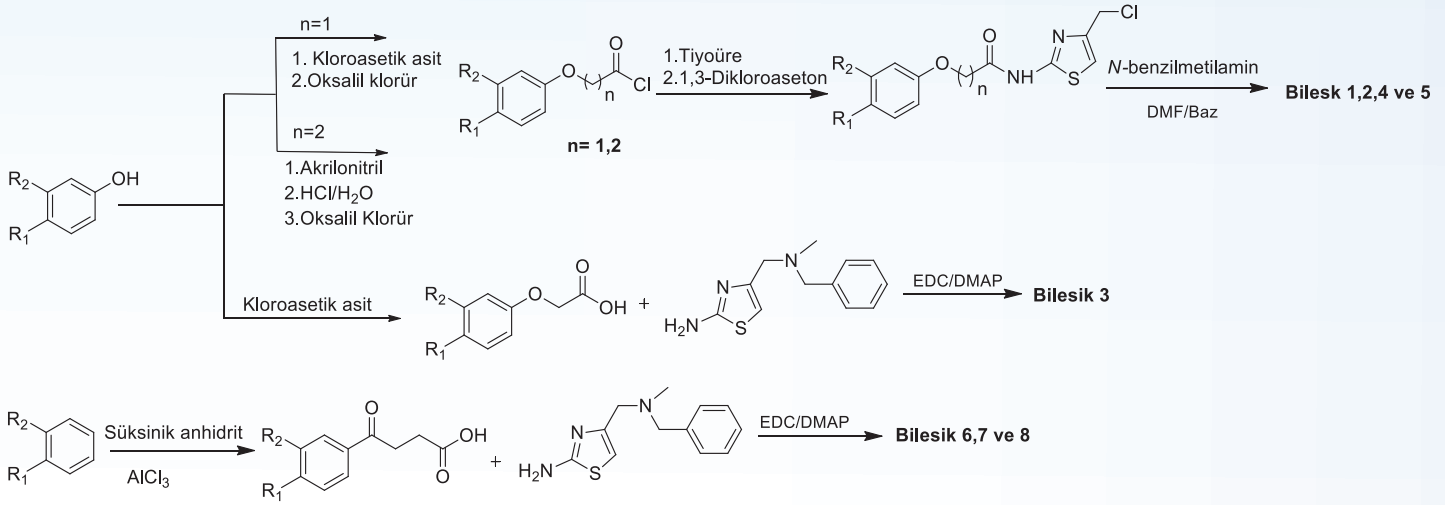
Alzheimer hastalığı (AH) genellikle yaşlılıkla birlikte ortaya çıkan nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. World Alzheimer Report 2019 verilerine göre ise, dünya çapında demansla yaşayan 50 milyondan fazla insan bulunmaktadır ve bu sayının 2050' ye kadar 152 milyona yükselmesi beklenmektedir. AH'nin klinik bulguları başta unutkanlık olmak üzere, diğer zihinsel ve davranışsal bozukluklardır. Hastalığın patolojik göstergeleri ise genel olarak; beyindeki asetilkolin (AK) azlığı, glutamat seviyesinde artış, enflamasyon, oksidatif stres, hücre dışı amiloid beta (A β) plaklar ve hücre içi nörofibriler yumaklardır (NFY) [1]. Son yıllarda AH'ye yönelik ilaç etkin madde geliştirme çalışmalarında, hastalığın karmaşık ve çok faktörlü olması nedeniyle, hastalığın farklı patolojik hedefleri ile etkileşebilecek moleküllerin daha etkili olacağı yaklaşımı benimsenmektedir. Ayrıca, grubumuz tarafından yapılmış olan bir çalışmada, 3-fenilprop-2-enamit türevi seçici asetilkolinesteraz inhibisyonuna sahip olduğu belirlenen hit bileşiğimizden hareketle (Şekil 1.) tez çalışmamızdaki bileşiklerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamızda güncel ilaç tasarımı yaklaşımı ve hit bileşikten hareketle, hastalığın farklı patolojik hedefleri ile etkileşebileceğini öngördüğümüz sekiz yeni bileşik sentez edilerek aktivite taramaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1 Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin yapısı

GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamızda, 3-fenilprop-2-enamit türevi hit bileşiğimizden esinlenerek 2-fenoksiasetamit, 3-fenoksipropanamit ve 4-oksobütanamit yapısında bileşikler sentez edildi.



Şekil 2 Bileşiklerin sentez şeması

Bileşiklerin sentez şeması

Sentezlerini gerçekleştirdiğimiz bileşiklerin kolinesteraz inhibitör aktiviteleri, Electrophorus electricus tip VI-S asetilkolinesteraz enzimi ve at serum bütirilkolinesterazı kullanılarak spektrofotometrik bir yöntem olan Ellman testi ile belirlenmiştir [2].

Hücre kültürü çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik etki taramaları, PC-12 (Rat adrenal pheochromocytoma) hücre hattı kullanılarak MTT (Cell Viability Assay Kit (Cat No. PI-30006) yöntemiyle gerçekleştirildi.

Antienflamatuvar aktivite çalışması

Sentezlenen bileşikler hücre hattı THP-1 (ATCC® TIB-202™) üzerinde 10 µM son konsantrasyonda, IL-1 beta (Human İnterlökin 1 Beta ELISA Kit, katalog no E0143Hu), IL-6 (Human İnterlökin 6 ELISA Kit, katalog no E0090Hu), TNF- (Human Tümör Nekrozis Faktör Alpha ELISA Kit, katalog no E0082Hu) ve NO (Human Nitrik Oksit ELISA Kit, katalog no E1510Hu) seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Metal şelasyon çalışması

FeSO4·7H2O, CuSO4·5H2O ve ZnCl2 etanol ile çözülerek 200 µM derişimde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Test edilecek bileşikler önce DMSO ile çözüldükten sonra etanol ile seyreltilerek, 400 µM'lık stok çözeltileri hazırlanmıştır. Final hacimde 40 µM test bileşiği ve ekvalen miktarda metal (1:1) karışımının UV spektrumlarının ölçümleri gerçekleştirilmiştir [3].

Moleküler modelleme çalışmaları

Moleküler kenetlenme (docking) çalışmalarında kullanılan asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerinin kristal yapıları sırasıyla 1EVE ve 4BDS [4] erişim kodlarıyla RCBS protein veri bankasından (<http://www.rcsb.org/pdb>) alınmıştır. Moleküler docking çalışmaları Molecular Operating Environment (MOE) programı [5] ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentez Çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS ve elementel analiz verileri ile kanıtlandı ve bu sonuçlar önerilen kimyasal yapılar ile uyumlu bulundu. Sonuç bileşiklerin verimi %10-%55 aralığında elde edildi. Sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR spektrumlarında, amit protonuna ait sinyal 12.61-12.17 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Bileşik 1, 2, 3, 4 ve 5'te tersiyer amin tuzuna ait sinyal 11.35-11.22 ppm aralığında singlet olarak gözlenmiştir. Tiyazol halkasının 5.konumundaki proton 7.57-6.92 ppm aralığında singlet olarak görülmüştür. Bileşiklerin diğer aromatik halka protonları beklenildiği gibi gözlenmiş.

Enzim inhibisyon çalışmaları

Aktivite sonuçları, fenoksiasetamid türevi bileşiklerin (bileşik 1 ve 2) ve onların fenoksipropanamid türevi eşleniklerinin (bileşik 4 ve 5) AKE inhibitör aktiviteleri arasında bir fark olmadığını göstermiştir. Ayrıca fenoksi halkasının 3 ve 4. konumlarında dimetoksi grubu taşıyan bileşik 3'ün (IC₅₀=5.80 µM) monometoksi türevi bileşik 1 ile karşılaştırıldığında daha iyi AKE inhibisyonuna sahip olduğu görülmüştür. Sentez edilen bileşikler arasında, 4-oksobütanamid türevi bileşiklerin seçici AKE inhibitör aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. 0.63 µM'lık IC₅₀ değeri ile bu yapıyı taşıyan bileşik 8 en yüksek AKE inhibisyonuna sahiptir.

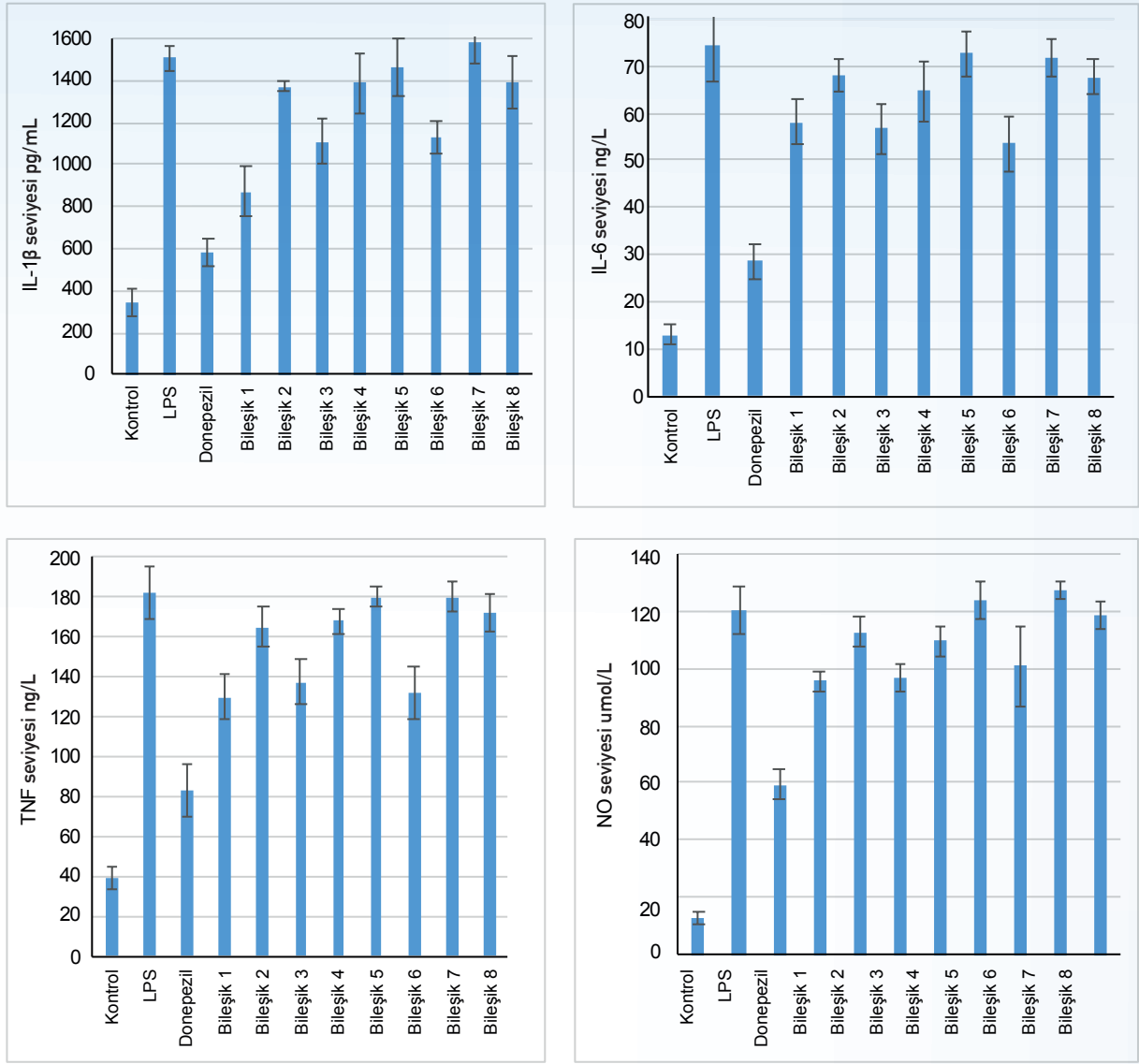
Bileşiklerin BKE inhibitör aktiviteleri değerlendirildiğinde genel olarak, 4-oksobütanamid yapısındaki bileşiklerin BKE inhibitör aktivitesi bulunmamıştır. 3,4-Dimetoksiasetamid türevi bileşik 3 haricinde (AKE IC₅₀=5.80 µM; BKE IC₅₀=12.40 µM) asetamid yapısındaki bileşiklerin (bileşik 1 ve 2) BKE inhibitör aktiviteleri AKE inhibitör aktivitelerine kıyasla daha iyi ve seçicidir.

Tablo 1 Kolinesteraz aktivite bulguları

Bileşik	n	R1	R2	AKE için IC ₅₀ ± SD (µM)	BKE için IC ₅₀ ± SD (µM)
1	1	OCH ₃	H	12.10 ± 0.02	2.10 ± 0.09
2	1	CH ₃	H	-	2.86 ± 0.05
3	1	OCH ₃	OCH ₃	5.80 ± 0.12	12.39 ± 0.07
4	2	OCH ₃	H	12.00 ± 0.05	5.64 ± 0.06
5	2	CH ₃	H	-	4.99 ± 0.08
6	-	OCH ₃	H	1.18 ± 0.05	-
7	-	CH ₃	H	1.20 ± 0.05	-
8	-	OCH ₃	OCH ₃	0.63 ± 0.04	-
Donepezil				0.06 ± 0.07	3.70 ± 0.02

Antienflamatuvar aktivite çalışması

Sentez edilen bileşikler arasında bileşik 1, 3 ve 6'nın diğer bileşiklere kıyasla 10 µM konsantrasyonda, test edilen tüm enflamatuvar belirteçlerin seviyesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı tespit edilmiştir (p<0,05). Bu üç bileşiğin IL-6, TNF-α ve NO seviyelerini istatistiksel olarak hemen hemen aynı düzeyde azalttığı, bileşik 1'in ise IL-1β belirtecinin seviyesini diğer iki bileşiğe kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı düzeyde azalttığı söylenebilir (p<0,05) ve bulgular Şekil 3'de sunulmuştur.



Şekil 3 LPS ile indüklenmiş enflamasyonda enflamatuvar belirteçlerin seviyesine donepezil ve bileşiklerin etkisi.

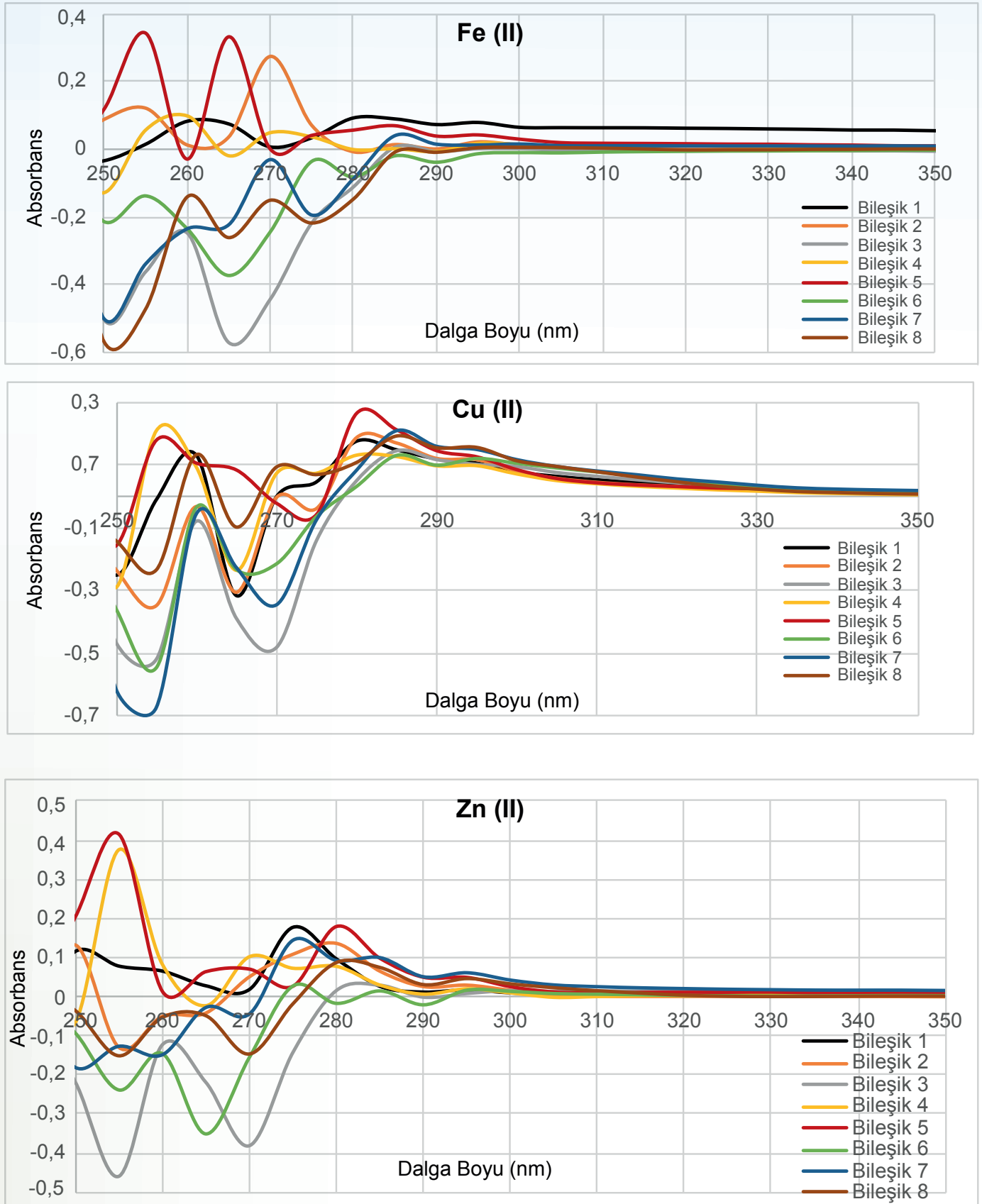
Hücre kültürü çalışmaları

Bileşiklerin 5 ve 10 µM konsantrasyonlarda sitotoksosite göstermedikleri ve hücre canlılığının %100'ün üzerinde olduğu belirlenmiştir ve elde edilen bulgular Tablo 2.'de gösterilmiştir.

Bileşik	5 µM için % hücre canlılığı SD	10 µM için % hücre canlılığı ±SD
1	115.26 ± 16.88	111.00 ± 5.70
2	132.00 ± 10.68	102.00 ± 6.11
3	114.04 ± 14.09	118.30 ± 13.51
4	141.60 ± 4.30	106.37 ± 6.22
5	115.14 ± 7.73	112.91 ± 12.98
6	142.74 ± 20.49	135.00 ± 10.60
7	112.42 ± 1.78	114.00 ± 6.27
8	120.94 ± 3.69	116.19 ± 8.01

Metal şelasyon çalışması

Grafikler incelendiğinde tüm bileşiklerin Fe(II), Cu(II) ve Zn(II) varlığında anlamlı düzeyde absorbands kaymasına neden olduğu görülmüştür. Sonuç olarak sentezlenen tüm bileşiklerin Fe(II), Cu(II) ve Zn(II) iyonları için şelatör etkilerinin olduğu bulunmuştur.

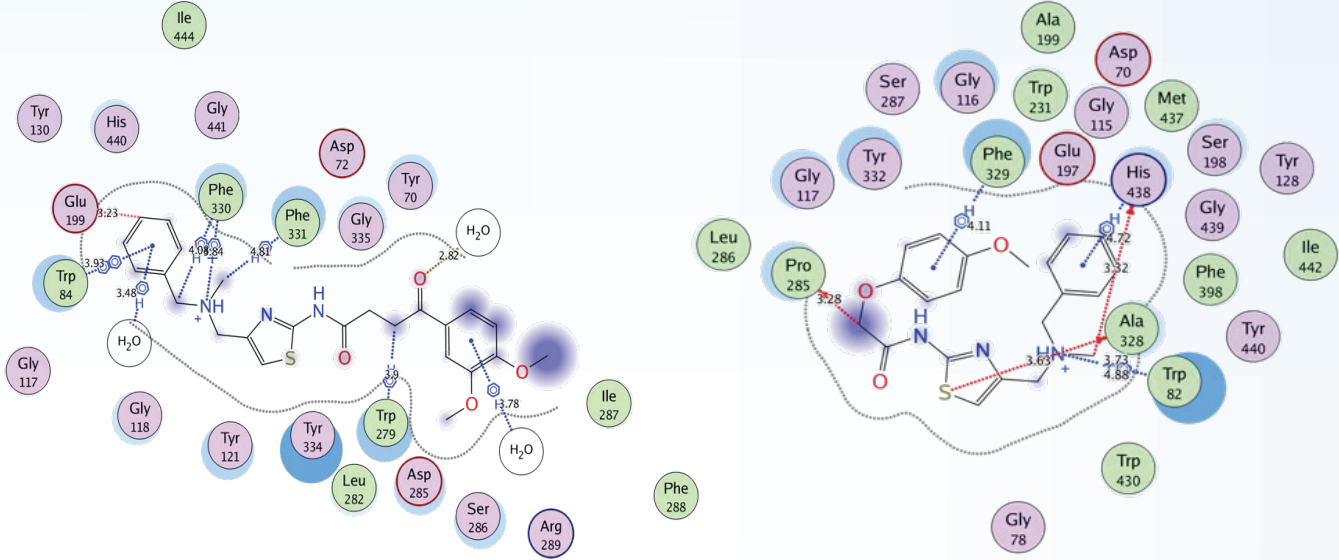


Şekil 4 Bileşikler ve metal iyonları için absorbands kayması grafikleri.

Moleküler modelleme çalışmaları

Moleküler docking çalışmasında, en yüksek AKE (Bileşik 8) ve en yüksek BKE (Bileşik 1) inhibitör aktiviteye sahip iki bileşiğin bu enzimlerin aktif bölgelerinde yer alan amino asitler ile yaptıkları kovalent olmayan etkileşimler ve bağlanma modları belirlendi.

Tablo 3. En yüksek AKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 8'in AKE kristali ile (A) ve en yüksek BKE inhibitör aktiviteye sahip bileşik 1'in BKE kristali ile (B) elde edilen 2D docking sonuçları.



SONUÇLAR

Hit bileşiğimiz 1.3 μM 'lık IC50 değeri ile seçici AKE inhibitör aktiviteye sahipken, bu bileşiğin 2-fenoksiasetamid eşleniği olan bileşik 1'in, seçici BKE inhibitör aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak 3-fenoksipropanamid türevlerinde BKE inhibitör aktivitenin azaldığı gözlenmiştir. 4-Oksobütanamid yapısına sahip bileşiklerin ise seçici AKE inhibitör aktiviteye sahip oldukları ve bu serinin en güçlü AKE inhibitör aktivitesine sahip bileşik 8'in, hit bileşikten yaklaşık 2 kat daha aktif olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Huang, L. K., Chao, S. P., and Hu, C. J. (2020). Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1-13.
- [2] Erdogan, M., Kilic, B., Sagkan, R. I., Aksakal, F., Ercetin, T., Gulcan, H. O., and Dogruer, D. S. (2021). Design, synthesis and biological evaluation of new benzoxazolone/benzothiazolone derivatives as multi-target agents against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 212, 113124.
- [3] Bortolami, M., Pandolfi, F., De Vita, D., Carafa, C., Messori, A., Di Santo, R., Feroci, M., Costi, R., Chiarotto, I., Bagetta, D., Alcar, S., Colone, M., Stringaro, A., and Scipione, L. (2020). New deferiprone derivatives as multi-functional cholinesterase inhibitors: design, synthesis and in vitro evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 198, 112350.
- [4] Nachon, F., Carletti, E., Ronco, C., Trovaslet, M., Nicolet, Y., Jean, L., and Renard, P. Y. (2013). Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal*, 453(3), 393-399.
- [5] Molecular Operating Environment (MOE), 2014.0901; Chemical Computing Group ULC, Montreal, QC, Canada, (2014).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK-118S686) çok teşekkür ederim.

BAZI YENİ KİNOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ, ANTİMİKROBİYAL VE DNA GİRİZ İNHİBİTÖRÜ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

P4

Asaf Evrim EVREN^{1,2}, Leyla YURTTAŞ¹

¹Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir

²Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, 11230 Gölümbe/Bilecik
(e-posta:asafevrimevren@anadolu.edu.tr)

GİRİŞ

Enfeksiyon, bir organizmada patojen mikroorganizmaların neden olduğu birtakım istenmeyen etkilerin görülmesine denir [1]. Özellikle de bakteri ve mantar kaynaklı enfeksiyonlar sıklıkla görülmektedir [2]. Bu rahatsızlıkların tedavisinde kullanılan birçok antimikrobiyal ajan vardır. Ancak, günümüzde bu ajanların etkileri giderek azalmaktadır, bu duruma sebep olan ve dünya sağlığını tehdit eden en büyük problem antimikrobiyal ilaçlara karşı gelişen farklı fenotipteki dirençlerdir [3-9]. Kinolin ve tiyazol, antimikrobiyal etkinlik açısından kendilerini kanıtlamış birer halka sistemleri olup klinikte kullanımı olan birçok antimikrobiyal ajanın yapısında bulunmaktadır. Araştırmalar, her iki halkanın da DNA giraz enziminin çalışmasını engelleyerek patojen mikroorganizmada birtakım bozukluklara sebep olduğunu ve bu sayede antimikrobiyal etki oluşturduğunu göstermektedir [10-13].

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans çalışmasında, yeni antimikrobiyal ajan geliştirmek amacıyla bazı yeni kinolin-tiyazol türevleri sentezlenmiştir. Türev elde etmek için tiyazol halkası, hidrazin köprüsüyle kinolin halkasına birleştirilerek yeni 14 molekülün sentezi yapılmıştır. Bileşiklerin yapıları IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) ile aydınlatılmıştır. Antibakteriyel aktivite çalışması için MİK₉₀ değerleri E. coli (ATCC 35218), E. coli (ATCC 25922), S. aureus (ATCC 6538), Metisiline Dirençli S. aureus (MRSA) (Klinik izolat), S. typhimurium (ATCC 13311) ve K. pneumoniae (NCTC 9633) hücrelerine karşı [14]; antikandidal aktivite çalışması için ise C. albicans (ATCC 24433), C. glabrata (ATCC 90030), C. krusei (ATCC 6258), C. parapsilosis (ATCC 22019) hücrelerine karşı belirlenmiştir [15]. Elde edilen aktivite sonuçları ile aktif bileşikler belirlenmiştir. Bu bileşiklerin aktivite yolağını test etmek için DNA giraz enzimi üzerinde çalışılmıştır [16]. Daha sonra DNA giraz enziminin etki mekanizmasının aktif bileşiklerle olan ilişkisini gözlemlemek için in silico ortamda moleküler modelleme çalışmaları yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sonuçlar, antibakteriyel açıdan değerlendirildiğinde **4g**, **4m** ve **4n** bileşiklerindeki bileşiklerde antibakteriyel etki görülmemiştir. Ancak bu üç bileşiğin, özellikle de **4g** ve **4m**'nin antibakteriyel aktiviteleri, siprofloksazin ve kloramfenikolün antibakteriyel etkileriyle karşılaştırıldığında antibakteriyel aktivite açısından önemli bir yere sahip oldukları saptanmıştır. Bileşiklerin, antikandidal aktivitelerini değerlendirmek için referans ilaç olarak ketokonazol kullanılmıştır. C. glabrata (ATCC 90030) için MİK₉₀ değeri 0,24 µg/mL, diğer türler için 0,06 µg/mL'den küçük olarak bulunmuştur. Sonuçlara olan yaklaşım genelleştirildiğinde **4d**, **4e**, **4i**, **4k**, **4m** ve **4n** bileşiklerindeki tüm türlere karşı oldukça düşük konsantrasyonlarda yüksek antikandidal etki göstermektedir.

SONUÇLAR

Tez kapsamında, dört basamakta sentezi gerçekleştirilen on dört yeni 2-klorokinolin türevi bileşik saf olarak elde edilmiş, bileşiklerin yapıları, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi yöntemleriyle aydınlatılmıştır. Sonrasında bu bileşiklerin antimikrobiyal etkinlikleri altı bakteri ve dört Candida türüne karşı araştırılarak elde edilen tüm veriler, moleküler modelleme çalışmalarıyla desteklenip literatüre kazandırılmıştır. Sonuçlar, hedef bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesinin sadece heteroaromatik farmakofor yapıya değil, aynı zamanda ikame edicilerin niteliğine ve onların konum ilişkisine bağlı olduğunu da göstermektedir. Bileşik **4m** hem DNA giraz inhibisyonu ile yüksek antibakteriyel etkinliğe hem de iyi derecede antikandidal etkiye sahip olmasından ötürü farmasötik etki açısından en parlak bileşik olarak tespit edilmiştir.

- [1] Molecular Biology of the Cell. 4: International Student Edition ed. New York, US: Routledge; 2002. p. 1485-1538.
- [2] Peng X-M, Cai G-X, Zhou C-H. Recent Developments in Azole Compounds as Antibacterial and Antifungal Agents. *Curr Top Med Chem.* 2013;13:1963-2010.
- [3] Singh N, Rogers P, Atwood CW, Wagener MM, Yu VL. Short-course empiric antibiotic therapy for patients with pulmonary infiltrates in the intensive care unit. A proposed solution for indiscriminate antibiotic prescription. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162:505-511.
- [4] Zehra A, Gulzar M, Singh R, Kaur S, Gill JPS. Prevalence, multidrug resistance and molecular typing of MRSA in retail meat from punjab, India. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018.
- [5] Tfifha M, Ferjani A, Mallouli M, Mlika N, Abroug S, Boukadida J. Carriage of multidrug-resistant bacteria among pediatric patients before and during their hospitalization in a tertiary pediatric unit in Tunisia. *Libyan J Med.* 2018;13:1419047.
- [6] Miyanaga M, Nejima R, Miyai T, Miyata K, Ohashi Y, Inoue Y, et al. Changes in drug susceptibility and the quinolone-resistance determining region of *Staphylococcus epidermidis* after administration of fluoroquinolones. *J Cataract Refract Surg.* 2009;35:1970-1978.
- [7] Ozeki S, Deguchi T, Yasuda M, Nakano M, Kawamura T, Nishino Y, et al. Development of a rapid assay for detecting *gyrA* mutations in *Escherichia coli* and determination of incidence of *gyrA* mutations in clinical strains isolated from patients with complicated urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2315-2319.
- [8] Todd B. Reconsidering Antibiotic Resistance. *Am J Nurs.* 2017;117:66-67.
- [9] Spellberg B. The New Antibiotic Mantra—"Shorter Is Better". *JAMA Intern Med.* 2016;176:1254-1255.
- [10] Thompson RE, Collin F, Maxwell A, Jolliffe KA, Payne RJ. Synthesis of full length and truncated microcin B17 analogues as DNA gyrase poisons. *Org Biomol Chem.* 2014;12:1570-1578.
- [11] Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T. Structure-based discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *J Med Chem.* 2012;55:6413-6426.
- [12] Sun XY, Wu R, Wen X, Guo L, Zhou CP, Li J, et al. Synthesis and evaluation of antibacterial activity of 7-alkyloxy-4,5-dihydroimidazo[1,2-a]quinoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 2013;60:451-455.
- [13] Xia L, Idhayadhulla A, Lee YR, Kim SH, Wee YJ. Microwave-assisted synthesis of diverse pyrrolo[3,4-c]quinoline-1,3-diones and their antibacterial activities. *ACS Comb Sci.* 2014;16:333-341.
- [14] CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. CLSI document M07-A9. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- [15] Rodriguez-Tudela J, Arendrup M, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, et al. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:398-405.
- [16] Alovero FL, Pan XS, Morris JE, Manzo RH, Fisher LM. Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: Benzenesulfonamide modifications at C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. *Antimicrob Agents Ch.* 2000;44:320-325.

BAZI YENİ TRIAZOL TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE CANDİDA TÜRLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

P5

Emir GÜZEL^{1,2}, Ulviye ACAR ÇEVİK¹, Asaf Evrim EVREN^{1,3}, Ülküye Dudu GÜL⁴, Gizem BAYAZIT⁵,
Yusuf ÖZKAY¹, Zafer Asım KAPLANCIKLİ¹

¹Anadolu Üniversitesi, Sağlık bilimleri Fakültesi, Farmasötik kimya Anabilim Dalı, 26120 Eskişehir.

²Fenerbahçe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34758 İstanbul.

³Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczacılık Hizmetleri Bölümü, 11000, Bilecik, Türkiye.

⁴Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Bilecik, Türkiye.

⁵Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Bilecik, Türkiye.

(e-posta: 32470795018@anadolu.edu.tr)

GİRİŞ

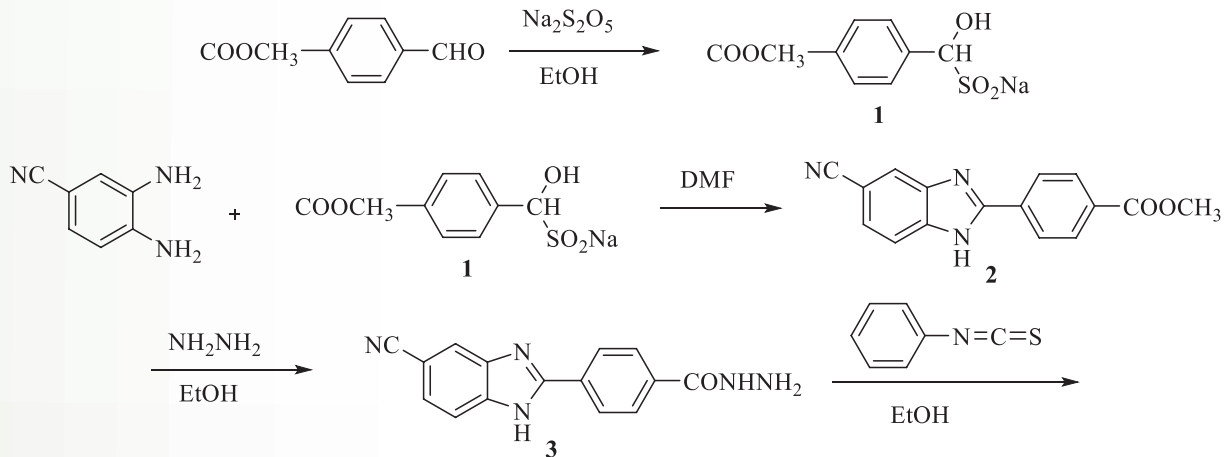
İnvaziv mantar enfeksiyonu, glukokortikoidlerin, geniş spektrumlu antimikrobiyallerin ve AIDS kemoterapi ilaçlarının yaygın kullanımının yanı sıra hemodiyaliz, derin ven kateterizasyonu ve transplantasyon gibi invaziv prosedürlerin kullanımı nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite ile büyüyen bir tehdit haline gelmiştir. Tahminlere göre her yıl 1,5-2 milyon kişi mantar hastalıkları nedeniyle ölmektedir [1,2]. Şu anda, dünya çapında mantar hastalıklarının tedavisi için beş ilaç kategorisi vardır; azoller (Flukonazol, Mikonazol, Albakonazol, VT1161 vb.), polienler (Amfoterisin B, Nistatin), akrilaminler (Butenafin, Naftifin, Terbinafin, vb.), antimetabolitler (5-florositozin) ve ekinokandinler [3-7]. Bununla birlikte, terapötik ilaçlar şu anda kullanımdadır ve ilaç toksisitesi, ilaç-ilac etkileşimleri ve ilaca dirençlilik gibi önemli engellerle karşı karşıyadır. Sonuç olarak, hem etkili hem de güvenli olan yeni antifungal ilaçlar yaratmak çok önemlidir [5-9].

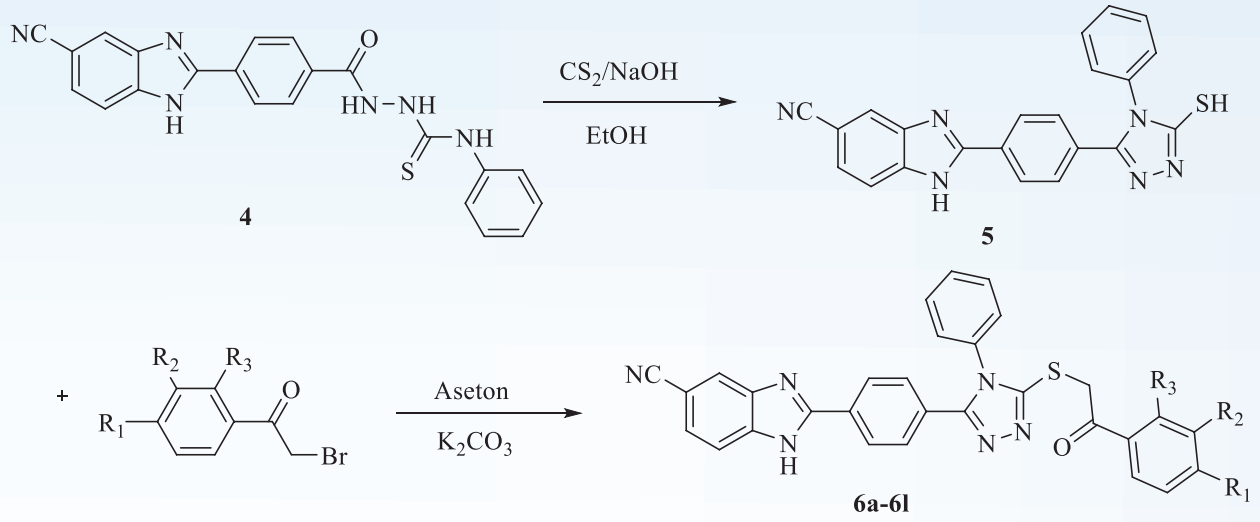
Bu çalışmada, 12 adet benzimidazol-1,2,4-triazol türevi bileşikler (6a-6l) sentezlendi ve bileşiklerin yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS spektral analizi ile karakterize edildi. Tüm hedef bileşikler, C. Albicans, C. Glabrata, C. Krusei ve C. Parapsilopsis'e karşı in vitro antifungal aktiviteleri açısından tarandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yöntem ve Sentez

Hedef moleküller, Şekil 1'de gösterildiği gibi altı basamakta sentezlenmiştir. İlk basamakta, metil 4-formilbenzoat bileşiğinin aldehit kısmı, aldehitin sodyum bisülfid katım ürününü elde edilmiştir. İkinci aşamada, benzaldehit sodyum bisülfid ürünü ile 5-siyano-1,2-fenilendiaminin geri çeviren soğutucu altında 3-4 saat kaynatılmış ve reaksiyon içeriği buzlu suya dökülerek metil 4-(5-siyano-1H-benz[d]imidazol-2-il) bileşiği elde edilmiştir. Bir sonraki adımda, bileşik 2, 4-(5-siyano-1H-benz[d]imidazol-2-il)benzohidrazid (3)'ü elde etmek için etanol içinde hidrazin hidrat ile reaksiyona sokulmuştur. Hidrazid türevi bileşik (3), fenil izotiyosiyanat ile geri çeviren soğutucu altında kaynatıldı ve çöken ürün süzülerek alındı. Etanol içindeki bileşik (4), karbon disülfid ve NaOH ile reflux yapılarak triazol halkası kapatılmıştır. Son basamakta ise, bileşik 5 ile uygun 2-bromoasetofenon türevleri arasında gerçekleştirildi ve hedef bileşikler (6a-6l) elde edildi.





Şekil 1 Hedef bileşiklerin (6a-6l) genel sentez şeması.

Antifungal Aktivite

Nihai bileşiklerin (6a-6l) bileşiklerinin antifungal aktivitesi, önceki çalışmada [10] tarif edildiği gibi standart CLSI prosedürüne göre dört mantar suşuna karşı tarandı (*Candida albicans* (ATCC 24433), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilopsis* (ATCC 22019) ve *Candida glabrata* (ATCC 9)). Vorikonazol ve flukonazol referans ilaçlar olarak kullanıldı.

Molecular Docking

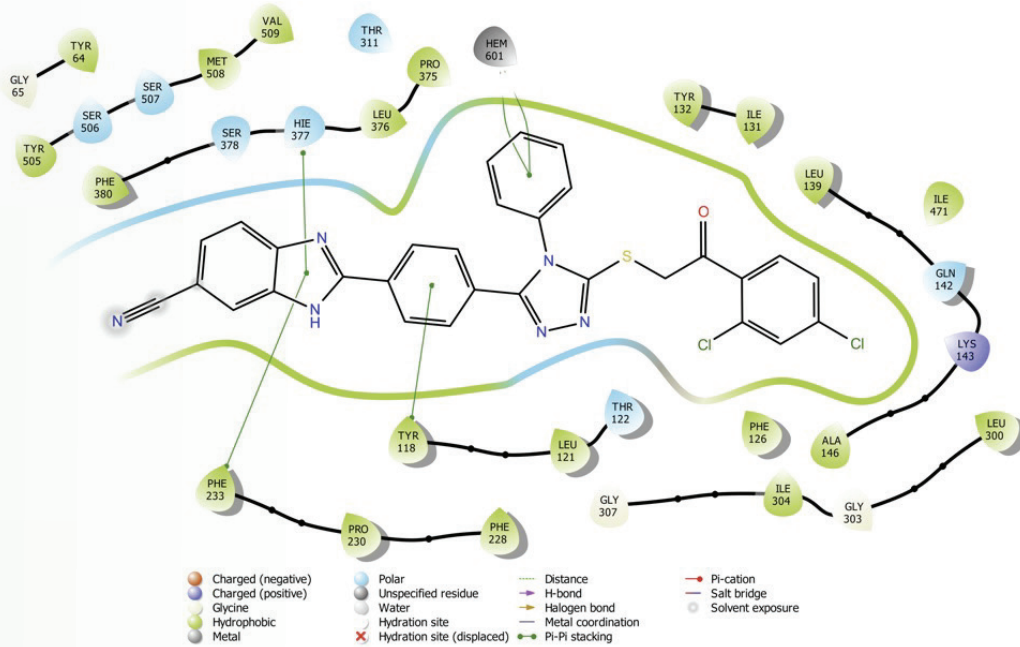
Moleküler docking çalışmaları, bağlanmayı tanımlamak için in siliko olarak 14 α -sterol demetilaz enzim aktif bölgesi (PDB kodu: 5TZ1) kullanılarak belirlendi.

BULGULAR ve TARTIŞMALAR

Hedef bileşiklerin (6a-6l) antifungal aktivitesi, *C. Albicans*, *C. Glabrata*, *C. Krusei* ve *C. Parapsilopsis*'e karşı in vitro yöntemle değerlendirildi. Sonuçlar Tablo 1'de listelenmiştir. Bileşiklerin mantar önleyici etkileri incelendiğinde serideki tüm bileşiklerin *C. glabrata*'ya karşı etkili olduğu bulundu. Özellikle 6b, 6i ve 6j bileşikleri, 0.97 μ g/mL Mik değeri ile serideki en etkili bileşiklerdir. Bu bileşiklerin referans ilaç vorikonazolden 2 kat, flukonazolden 4 kat daha etkili olduğu bulundu. Seride 6a, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6k ve 6l bileşikleri vorikonazol ile aynı aktiviteyi gösterirken flukonazolden iki kat daha etkili bulunmuştur. Yapı aktivite ilişkisi (SAR) incelendiğinde, 2,4-diklorofenil, 4-kloro ve 4-metoksi gruplarının varlığının, antifungal aktiviteyi önemli derecede arttırdığı görülmüştür.

Tablo 1 6a-6l bileşiklerinin MİK değerleri (µg/mL)

Bileşik	C. albicans	C. krusei	C. glabrata	C. parapsilosis
6a	31.25	125	1.95	62.5
6b	31.25	125	0.97	31.25
6c	31.25	125	1.95	31.25
6d	62.5	125	1.95	125
6e	62.5	125	1.95	62.5
6f	62.5	125	1.95	62.5
6g	125	250	1.95	31.25
6h	62.5	62.5	1.95	62.5
6i	62.5	125	0.97	31.25
6j	62.5	125	0.97	31.25
6k	31.25	125	1.95	31.25
6l	31.25	125	1.95	31.25
Vorikonazol	3.90	3.90	1.95	3.90
Flukonazol	7.81	7.81	3.90	3.90



Şekil 2 C. glabrata' sterol 14-alfa demetilazın aktif bölgesindeki bileşik 6j'nin 2D şematik protein-ligand etkileşimleri (PDB ID: 5TZ1).

SONUÇLAR ve YORUM

Çalışmalar sonucu elde edilen 12 adet benzimidazole-triazol türevi bileşikler altı basmakta elde edilmiştir. Sentez edilen maddelerin yapıları ¹H NMR, ¹³C NMR ve Kütle Spektroskopisi yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bileşiklerin antifungal etkileri *C. albicans* (ATCC 24433), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 9), *C. parapsilosis* olmak üzere 4 farklı *Candida* türü üzerinde incelenmiştir. Bileşiklerin aktivite sonuçları incelendiğinde, bileşiklerin tamamının *C. Glabrata* üzerinde belirgin bir aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Özellikle 6b, 6i ve 6k bileşikleri 0.97 µg/mL MİK değeri ile vorikonazoldan (1.95 µg/mL) 2 kat, flukonazolden (3.9 µg/mL) 4 kat daha etkili bulunmuştur. En etkili olarak seçilen bileşik 6b, 6i ve 6k için Sterol 14-alfa demetilaz enzimine karşı moleküler yerleştirme işlemi yapılmış ve bileşiklerin yapıları ile enzimleri arasındaki etkileşimi incelenmiştir. Bileşiklerin yapıları incelendiğinde fenil halkası üzerinde 4. konumda metoksi süstitüenti (6b), 2,4 ve 4. konumlarında kloro süstitüenti içeren (6i ve 6j) bileşiklerinin daha etkili olduğu görülmektedir. Bileşiklerin tamamının *C. glabrata* üzerinde etkili olduğu düşünülürse bileşiklerinin genel ortak yapısının *C. glabrata* üzerinde etkili olduğu söylenebilir. İlerleyen süreçteki çalışmalarda yap-etki bulgularını kullanarak kimyasal olarak benzer yapıya sahip daha etkili olabilecek maddelerin sentezinin planları yapılabilir.

KAYNAKÇA

- [1] Meng, F., Mi, P., Yu, Z., Wei, W., Gao, L., Ren, J., ... & Dai, H. (2022). Design, synthesis and biological evaluation of 5 substituted sulfonylureas as novel antifungal agents targeting acetoxyacid synthase. *Journal of Molecular Structure*, 1260, 132756.
- [2] Jabli, S., Hrichi, S., Chaabane-Banaoues, R., Molton, F., Loiseau, F., Roisnel, T., ... & Nasri, H. (2022). Study on the synthesis, physicochemical, electrochemical properties, molecular structure and antifungal activities of the 4-pyrrolidinopyridine Mg (II) meso-tetratolylporphyrin complex. *Journal of Molecular Structure*, 1261, 132882.
- [3] Yang, L. (2022). Design, Synthesis, and Antifungal Activity of Novel Benzimidazole Derivatives Bearing Thioether and Carbamate Moieties. *Journal of Chemistry*, 2022.
- [4] Yin, W., Cui, H., Jiang, H., Zhang, Y., Liu, L., Wu, T., ... & Cheng, M. (2022). Broadening antifungal spectrum and improving metabolic stability based on a scaffold strategy: Design, synthesis, and evaluation of novel 4-phenyl-4, 5-dihydrooxazole derivatives as potent fungistatic and fungicidal reagents. *European journal of medicinal chemistry*, 227, 113955.
- [5] Liu, W., Sun, Z., An, Y., Liu, Y., Fan, H., Han, J., & Sun, B. (2022). Construction and activity evaluation of novel dual-target (SE/CYP51) anti-fungal agents containing amide naphthyl structure. *European journal of medicinal chemistry*, 228, 113972.
- [6] Kazeminejad, Z., Marzi, M., Shiroudi, A., Kouhpayeh, S. A., Farjam, M., & Zarenezhad, E. (2022). Novel 1, 2, 4-Triazoles as Antifungal Agents. *BioMed Research International*, 2022.
- [7] Salehi, F., Emami, L., Rezaei, Z., Khabnadideh, S., Tajik, B., & Sabet, R. (2022). Fluconazole-Like Compounds as Potential Antifungal Agents: QSAR, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Chemistry*, 2022.
- [8] Sun, S., Yan, J., Tai, L., Chai, J., Hu, H., Han, L., ... & Chen, M. (2022). Novel (Z)/(E)-1, 2, 4-triazole derivatives containing oxime ether moiety as potential ergosterol biosynthesis inhibitors: design, preparation, antifungal evaluation, and molecular docking. *Molecular Diversity*, 1-13.
- [9] Jacobs, S. E., Zagaliotis, P., & Walsh, T. J. (2021). Novel antifungal agents in clinical trials. *F1000Research*, 10.
- [10] Evren AE, Yurttas L, Yılmaz-Cankilic M. Synthesis of novel N-(naphthalen-1-yl) propanamide derivatives and evaluation their antimicrobial activity. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 2020; 195(2): 158-164

BİR SERİ ADAMANTAN HALKASI TAŞIYAN SPIROTIYAZOLIDİNON YAPISINDAKİ BİLEŞİĞİN SENTEZİ VE YAPILARININ AYDINLATILMASI

P6

Başak TÜRK ERBUL^{1,2}, Ecem Fatma KARAMAN³, Sibel ÖZDEN⁴, Füsün GÖKTAŞ²

¹Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34684 İstanbul

²İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34116 İstanbul.

³Biruni Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 34010 İstanbul.

⁴İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 34116 İstanbul

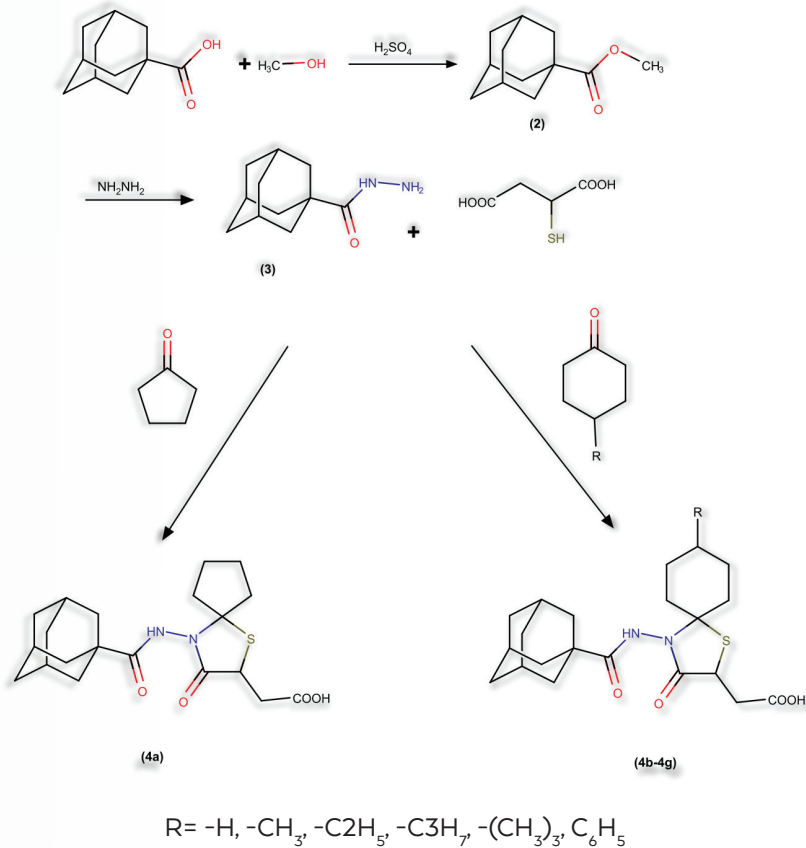
(e-posta: basak.turk@acibadem.edu.tr)

GİRİŞ

Amantadin'in 1960 yılında keşfinden sonra günümüze kadar adamantan halka sistemi taşıyan antiviral [1,2], antikanser [3], antibakteriyel [4], antifungal [5], antiinflamatuvar [6] ve antiparkinson [7] aktivite gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Adamantil halkası, yüksek lipofilik özelliğe sahip olmasından dolayı yapısına katıldığı moleküllerin biyolojik kullanılabilirliğini arttırmaktadır. Ayrıca yapısında bulunduğu moleküllerin sitotoksik etkisini arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [8].

Diğer yandan 2-alkil/aryl-süstitüe 4-tiyazolidinon yapılarının homologları olan spirotiyazolidinon yapısındaki bileşikler, antibakteriyel [9], antifungal [10], antikanser [11] gibi geniş biyolojik aktivite çeşitliliğinden dolayı en çok çalışılan heterosiklik halkalardan biridir.

Bu bilgiler ışığında, adamantan halkası taşıyan bir seri yeni spirotiyazolidinon yapısındaki bileşikler Şekil 1' deki sentez yoluyla izlenerek sentezlenmiş, elde edilen tüm bileşiklerin yapıları elementel analiz, UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve kütle spektroskopik yöntemleri ile aydınlatılmış ve HepG2, PC-3, A549 ve NIH/3T3 hücre hatlarına karşı in vitro sitotoksik etkinliği araştırılmıştır.



Şekil 1 Sentezlenen bileşiklere (4a-4g) ait genel sentez yolu.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Bileşiklerin erime noktaları Büchi Erime Noktası B-540 cihazında kaydedilmiştir ve düzeltilmemiştir. UV spektrumları Shmadzu UV-1601; ^1H ve ^{13}C NMR, DEPT ^{13}C NMR, 2D NMR (HSQC) spektrumları DMSO- d_6 kullanılarak Varian UNITY INOVA 500 MHz NMR cihazıyla elde edilmiştir. Kütle spektrumları APCI MS, Advion Expression Compact Mass Spectrometer (CMS) yardımıyla elde edilmiştir. Element analizleri (C, H, N) Thermo Finnigan Flash EA 1112 Series cihazı ile yapılmıştır.

Sentez sırasında reaksiyonu izlemek ve bileşiklerin saflığını kontrol etmek için silika jel ile önceden kaplanmış 60 F254 alüminyum levhalar (katman kalınlığı 0.25 mm) Merck kullanılarak ince tabaka kromatografisi yapılmıştır. Aseton:sikloheksan (60:40, v/v) solvent sistemi kullanılarak lekeler Dragendorff reaktifi yardımıyla turuncu renkte görüntülenmiştir. Reaktifler, başlangıç malzemeleri ve solventler Merck ve Sigma-Aldrich gibi ticari tedarikçilerden satın alınmıştır. Ham reaksiyon ürünleri, etanol-su karışımından kristalizasyonla saflaştırılmıştır.

In vitro sitotoksosite, MTT (Mitokondriyal Süksinat Dehidrojenaz Tayini) yöntemi kullanılarak belirlendi. İnsan karaciğer kanseri (HepG2), insan prostat kanseri (PC-3), insan akciğer kanseri (A549) ve fare embriyo fibroblast (NIH/3T3) hücre hatları kullanıldı.

Yöntem

Sentez

Metil adamantan 1-karboksilat, literatürde Marchand ve ark. tarafından bildirilen yöntemle göre sentezlendi [12]. Adamantan 1-karboksilik asit hidrazid, Al-Aboudi ve ark. tarafından bildirilen yöntemle elde edildi [13]. Adamantan halkası taşıyan spirotriazolidinon türevlerinin (4a-g) eldesi için 0.005 mol adamantan 1-karboksilik asit hidrazidin 30 ml susuz tolüendeki çözeltisine 0,015 mol siklopentanon/4-(nonsüstitüe/süstitüe)heksanon bileşiği eklendi. Reaksiyon karışımı Dean-Stark tuzağı kullanılarak geri çeviren soğutucu altında 2 saat ısıtıldı. Üzerine 0.015 mol 2-merkaptosüksinik asit ilave edildikten sonra reaksiyon karışımı 13-14 saat daha ısıtıldı. Susuz toluen alçak basınç yardımıyla uzaklaştırılarak asidin fazlası doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi ile nötralize edildi. Soğukta bekletildikten sonra çöken ürün süzülde ve etanol-su karışımından kristallendirilerek saflaştırıldı.

Hücre kültürü çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik etki taramaları, HepG2, PC-3, A549 ve NIH/3T3 hücre dizileri kullanılarak MTT yöntemiyle gerçekleştirildi [14, 15] ve test sonuçları ve değerlendirmeler literatürde belirtildiği şekilde açıklandı [16].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentez çalışmaları

Bu çalışmada, sentezlenen bileşiklerin yüzde verimleri ve bazı analitik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. **4a-4g** bileşiklerine ait IR spektrumunda ortak olarak bulunan CONH grubundan kaynaklı O-H/N-H ve C=O fonksiyonel grubuna ait gerilme bantları sırasıyla $3275-3110\text{ cm}^{-1}$ ve $1668-1663\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde gözlenmiştir. Ayrıca, IR spektrumlarında laktam C=O ($1697-1689\text{ cm}^{-1}$) ve asit C=O ($1707-1616\text{ cm}^{-1}$) gerilme bantlarının gözlenmesi halkanın kapandığının kanıtıdır.

Adamantan-1- karbohidrazid ve **4c** bileşiğinde karbon ve hidrojen arasındaki ilişkileri belirlemek amacıyla 2D-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) deney verilerinden ve örnek olarak seçilen **4b** bileşiğinde katerner C, -CH ve -CH₂ karbonlarının ayrımını gözlemleyebilmek için ¹³C (DEPT) NMR deney verilerinden yararlanılmıştır. 1H NMR spektrumlarında bileşikler oluşumunu destekleyen en önemli bulgu CONH grubuna ait kimyasal kayma değerinin δ 9,59-9,61 ppm aralığında gözlenmesi ve asit ilavesiyle yapıya katılan COOH grubuna ait hidrojenin δ 12,54-12,63 ppm'de singlet gözlenmesidir. ¹³C NMR spektrumunda da yapıya ait 3 farklı karbonil grubunun 3 farklı yerde rezonans gösterdiği saptanmıştır. 4a-g bileşiklerinde adamantan halkasında C₂, C₈, C₁₀ karbonlarına ait protonlar δ 1,84-1,85 ppm' de 6H değerinde dublet ve C₄, C₆, C₉ karbonlarına ait protonlar da δ 1,60-1,80 ppm aralığında sikhopentanon/sikloheksanon halkasıyla beraber multipler olarak gözlenmiştir.

Kütle spektrumlarında negatif iyonlaştırma modunda [M-H]⁻ moleküler iyon piki gözlenirken, pozitif iyonlaştırma modunda moleküler iyon piki gözlenmemiş ancak hepsinde adamantanın karakteristik m/z 135 piki ortak olarak gözlenmiştir.

Tablo 1 Bileşiklerin yüzde verimleri ve bazı analitik verileri.

Madde	Kapalı Formül (MA)	Verim (%)	Erime Derecesi (°C)	Elementel Analiz Teorik ^a /Pratik C% H% N%
4a	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₄ S (392, 512)	74	143	58,51/58,47 7,37/7,07 6,82/6,70
4b	C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₄ S (406, 539)	41	158-159	59,41/59,43 7,60/7,50 6,60/6,57
4c	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₄ S (420, 208)	33	181-182	60,25/60,35 7,81/7,36 6,39/6,23
4d	C ₂₃ H ₃₄ N ₂ O ₄ S (434, 592)	81	156-157	61,03/61,09 8,02/7,57 6,19/6,14
4e	C ₂₄ H ₃₆ N ₂ O ₄ S (448, 619)	93	148-149	61,77/61,86 8,21/7,76 6,00/5,99
4f	C ₂₅ H ₃₈ N ₂ O ₄ S (462, 645)	69	180	62,47/62,54 8,39/7,99 5,83/5,70
4g	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₄ S (482, 635)	100	174-175	64,77/64,88 7,25/6,90 5,60/5,45

^a Teorik değerler, moleküllerin 1 mol su tuttuğu göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

Sitotoksosite çalışmaları

4a, 4b, 4c bileşiklerinin özellikle A549 hücre hattında sırasıyla 0,15, 0,23 ve 0,22 Mm IC₅₀ değerleriyle yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği, NIH/3T3 hücre hattında ise en az sitotoksik aktivite gözlenmiştir. Ayrıca 4b bileşiğinin, diğer bileşiklere kıyasla üç kanserli hücre hattına karşı en fazla sitotoksik etki göstermektedir (Tablo 2).

Tablo 2 Kanserli ve sağlıklı hücrelerde MTT testi kullanılarak elde edilen maddelerin IC₅₀ (mM) değerleri.

Madde	PC-3		HepG2	
	IC ₅₀ ^a	SI ^b	IC ₅₀ ^a	SI ^b
4a	nd(>2.55)	nd	2,52 0,1	0,679
4b	0,41±0,003	5,86	0,53±0,05	4,55
4c	1,24±0,05	0,85	1±0,06	1,06
4d	1,08± 0,01	0,54	0,51±0,03	1,13
4e	0,45± 0,01	1,31	0,57±0,02	1,04
4f	0,66±0,02	1,06	0,37±0,03	1,88
4g	0,54±0,02	1,31	0,31±0,01	2,33
Madde	A549		NIH/3T3	
	IC ₅₀ ^a	SI ^b	IC ₅₀ ^a	SI ^b
4a	0,15± 0,01	11,6	1,71± 0,08	
4b	0,23± 0,02	10,32	2,42± 0,08	
4c	0,22± 0,02	4,77	1,06± 0,05	
4d	0,24± 0,01	2,41	0,58± 0,03	
4e	0,48± 0,02	1,22	0,59± 0,05	
4f	0,35± 0,02	2,01	0,7± 0,03	
4g	0,28± 0,02	2,58	0,71± 0,03	

^aIC50 = In vitro test edilen hücrelere karşı %50 sitotoksik konsantrasyon

^bSI = Seçicilik indeksi - IC₅₀ değerinin normal hücreye göre oranı
te = tespit edilemedi

SONUÇLAR

Tüm veriler ışığında yeni adamantil artığı taşıyan spirotyazolidinon türevleri, potansiyel antitümör aktivitesine sahip bazı bileşiklerin tasarımı ve geliştirilmesi için umut verici bir sonuç sağlamıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Griffin SDC, Beales LP, Clarke DS. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003; 535:34-38
- [2] Stylianakis I, Kolocouris A, Kolocouris N. Spiro[pyrrolidine-2,2'-adamantanes]: Synthesis, anti-influenza virus activity and conformational properties. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2003; 13(10): 1699-1703.
- [3] Hu H, Lin C, Ao M, Ji Y, Tang B, Zhou X, Fang M, Zeng J, Wu Z. Synthesis and biological evaluation of 1-(2-(adamantane-1-yl)-1H-indol-5-yl)-3-substituted urea/thiourea derivatives as anticancer agents. *R. Soc. Chem. Adv.* 2017, 7, 51640.
- [4] Orzeszko A, Kaminska B, Orzesko G, Starosciak B. Synthesis and antimicrobial activity of new adamantane derivatives II. *Farm.* 2000; 55: 619-623.
- [5] Plachta DA, Baranowski AM, Laudy AE, Starosciak BJ, Kleps J. Synthesis of 1-[4-[4-(Adamant-1-yl) phenoxy]methyl] with expected antifungal and antibacterial activity. *Acta Pol Pharm Res.* 2007;64(6): 535-540.
- [6] Kadi AA, El-Brollosy NR, Al-Deeb OA, Habib EE, Ibrahim TM, El-Emam AA. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles. *Eur J Med Chem.* 2007;42(2): 235-242.
- [7] Kumar S, Kaur H, Saxena KK, Sharna M, Vishwakarma P, Kumar A, Indian. *ChemInform Abstract: Synthesis and Antiparkinsonian Activity of Some New Adamantyl Thiazolidinonyl/Azetidinonyl Indole Derivatives.* *J. Chem. Sect. B.* 2010; 49B: 1398.
- [8] Koperniku A, Foscolos A-S, Papanastasiou I, Foscolos GB, Tsotinis A, Schols D. 4-(1-Adamantyl)phenylalkylamines with potential antiproliferative activity. *Lett Org Chem.* 2016;13(3): 171-176.
- [9] Dwivedi J, Devi K, Asmat Y, Jain S, Sharma S. Synthesis, characterization, antibacterial and antiepileptic studies of some novel thiazolidinone derivatives. *J Saudi Chem Soc.* 2016;20: 16-20.
- [10] Raju KR, Prasad ARG, Kumar BS, Ravindranath LK. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Novel Spiro Compounds Containing Thiazolidinone and 1, 3, 4-Oxadiazole Moieties. *J Chem Technol Metall.* 2014; 49 (3): 238-246.
- [11] Kaminsky D, Khylyuk D, Vasylenko O, Zaprutko L, Lesyk R. A facile synthesis and anticancer activity evaluation of spiro[Thiazolidinone-isatin] conjugates. *Sci Pharm.* 2011; 79 (4): 763-777.
- [12] Marchand AP, Xing D, Bott SG. Synthesis of (Z)- and (E)-1,2-di(1-adamanyl)ethene and their respective reactions with dichlorocarbene *Tetrahedron* 1996; 52: 825.
- [13] Al-Aboudi A, Al-Qawasmeh RA, Shahwan A, Mahmood U, Khalid A, Ul-Haq Z, In-silico identification of the binding mode of synthesized adamantyl derivatives inside cholinesterase enzymes. *Acta Pharmacol. Sin.* 2015; 36: 879.
- [14] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 1983; 65 (1-2): 55.
- [15] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research.* 1988; 48 (3) :589-601.
- [16] Karaman EF, S. Ozden S. Alterations in global DNA methylation and metabolism-related genes caused by zearalenone in MCF7 and MCF10F cells. *Mycotoxin Res.* 2019; 35: 309.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2017-25681.

FENOTİYAZİN TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZLERİ, ANTİKANSER AKTİVİTELERİ VE MOLEKÜLER DOKİNG ANALİZLERİ

P7

Mehmet Murat KIŞLA¹, Murat YAMAN², Özlen KONU², Zeynep ATEŞ ALAGÖZ¹

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560 Ankara.

²Moleküler Biyoloji ve Genetik Departmanı, Bilkent Üniversitesi, 06800, Ankara.

(e-posta: mmkisla@ankara.edu.tr)

GİRİŞ

Fenotiyazin türevleri bilinen nöroleptik etkilerinin yanı sıra antikanser etkinliklerini çeşitli yollar aracılığıyla gösterebilmektedir [1-4]. Son yıllarda, kolinerjik sistem nörotransmitteri olan asetilkolinin hayatta kalma, farklılaşma ve proliferasyondaki etkisi açığa çıkmıştır. Kolinerjik sistem ile birlikte çok sayıda proteinin tümörjenezdeki önemi son günlerde artmıştır [5,6]. Örneğin, Pérez-Aguilar ve çalışma arkadaşları hepatosellüler karsinom ile ilişkili hücre hatlarında (HD, Huh-7 ve HepG2) AChE düzeyinde artışa karşılık AChE aktivitesinde azalma görmüşlerdir [7]. Bu bulgulardan yola çıkarak AChE'nin tümör baskılayıcı olduğu ve HCC'de prognostik marker olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır [8]. Buna ek olarak, sonraki yıllarda yapılan pek çok çalışma asetilkolin aktivitesinin kanserdeki rolünü aydınlatmıştır [9-12]. Fenotiyazin içeren yeni ilaç moleküllerinin tasarımı, tanımlanması ve antikanser etkilerinin çeşitli sübstitüyonlar ile artırılmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

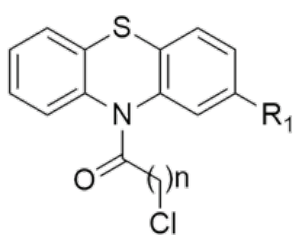
Bu çalışmada, fenotiyazin türevi bileşiklerin sentezi için non-sübstitüe veya 2-klorofenotiyazin ile asetil klorür/propiyonil klorür muamele edilerek fenotiyazin 10-il açıl klorürler elde edilmiştir. Daha sonra uygun aminler ile K_2CO_3 ya da Nal varlığında reaksiyona sokularak fenotiyazin 10-karboksamitler elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları elementel analiz, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları ve Mass (ESI+) spektral verileriyle kanıtlanmıştır. Sonuçta, sentezlenen 12 adet fenotiyazin türevi ve 5 adet ara basamak fenotiyazin türevlerinin arasından fenotiyazin ana yapısına göre daha yüksek antikanser aktiviteye sahip türevler bulunmuştur. Sentezlenen ara basamak türevlerinden 1 ve 3 ve sonuç ürünlerden 13 ve 14 öne çıkmıştır. Genel kapsamda, hepatosellüler karsinomadaki antikanser aktivitenin AChE modülasyonundan kaynaklanabileceği tezinin moleküler doking çalışmaları ile temellendirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışma ile antikanser ilaç keşif araştırmalarında fenotiyazin türevlerinin drug repurposing ile kullanılabilmesi vurgulanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

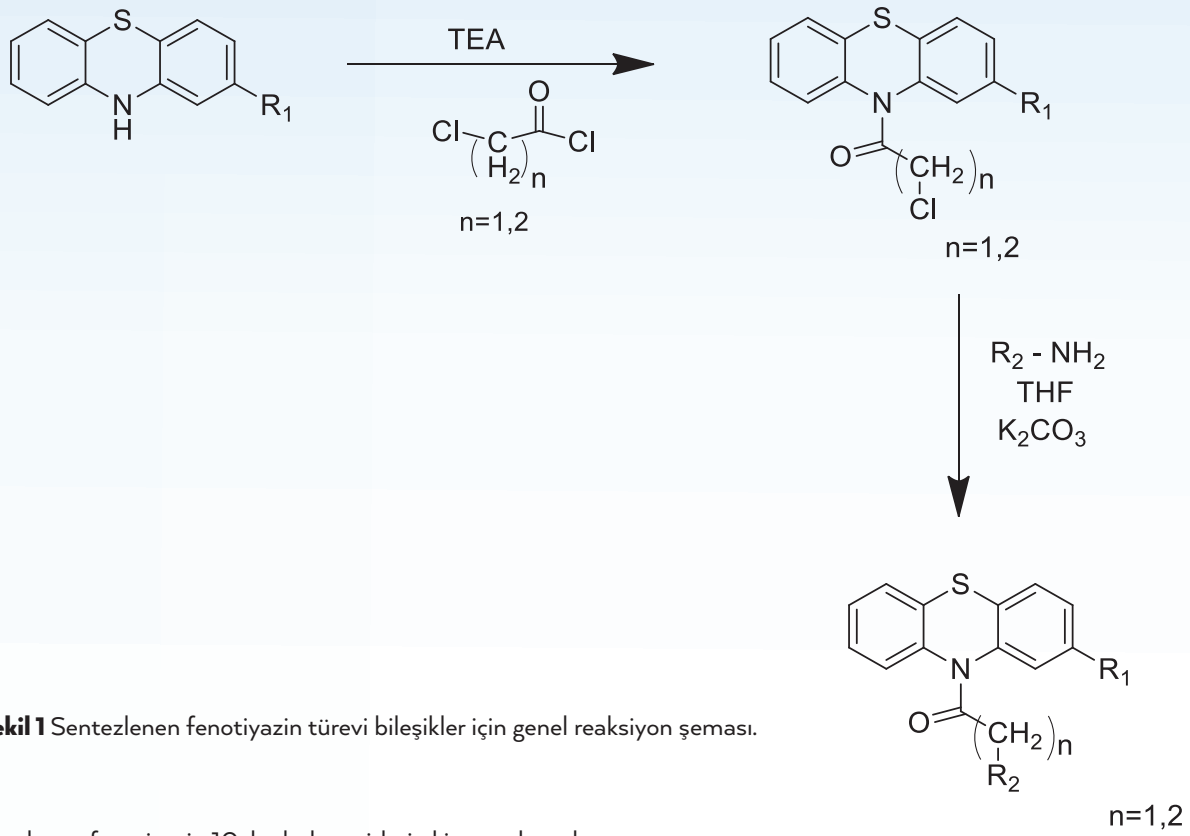
Sentez

Bu çalışmada, fenotiyazin türevi bileşiklerin sentezi için non-sübstitüe veya 2-klorofenotiyazin ile asetil klorür/propiyonil klorür muamele edilerek fenotiyazin 10-il açıl klorürler elde edilmiştir (Tablo 1, Şekil 1). Daha sonra uygun aminler ile K_2CO_3 ya da Nal varlığında reaksiyona sokularak fenotiyazin 10-karboksamitler elde edilmiştir (Şekil 1, Tablo 2). Sentezlenen bileşiklerin yapıları elementel analiz, 1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları ve Mass (ESI+) spektral verileriyle kanıtlanmıştır.

Tablo 1 Sentezlenen fenotiyazin türevi ara bileşiklerin kimyasal özellikleri.



	n	R ₁	MS (ESI+) m/z	Erime Noktası (°C)
1	1	-H	276	117
2	1	-Cl	311	118
3	1	-SCH ₃	321	124
4	2	-H	290	144
5	2	-Cl	325	113



Şekil 1 Sentezlenen fenotiyazin türevi bileşikler için genel reaksiyon şeması.

Tablo 2 Sentezlenen fenotiyazin 10-karboksamitlerin kimyasal yapıları.

Bil.	n	R ₁	R ₂	Bil.	n	R ₁	R ₂
6	1	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{F}$	12	2	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$
7	1	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_2$	13	2	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$
8	1	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{F})_2$	14	2	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{F}$
9	1	-Cl	$-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}_6\text{H}_5$	15	2	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{F})_2$
10	1	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}_6\text{H}_5$	16	1	-H	$-\text{C}_6\text{H}_5$
11	1	-H	$-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$	17	1	-H	$-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CF}_3$

Biyolojik aktivite çalışmaları

Sentezlenen fenotiyazin türevi bileşiklerin biyolojik aktivite çalışmaları Doç. Dr. Özlen Konu ve Dr. Murat Yaman tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, bileşikler naif HCC hatlarından en az iki tanesi (Hep3B, SkHep1, HepG2 ve Huh7) ve MCF-7 lüminel epitel meme kanseri tipinde taranmıştır. Ek olarak Hep3B ve SkHep1 hatlarının eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) ifade eden stabil klonlarında da taramalar gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen 5 adet ara ürün ve 12 adet sonuç ürünün hücre varlığına etkileri MTT deneyleriyle test edilmiştir. %0.1 DMSO referans değeri olarak tüm uygulamalar için sabitlenirken, Sorafenib (SFB) ise kontrol molekülü olarak kullanılmıştır.

Moleküler modelleme çalışmaları

Proteinler, Schrödinger Maestro'daki Protein Preparation Wizard ile [13] ve gridbox, Glide'in Receptor Grid Generation modülü ile hazırlanmıştır. Ligandlar 2D builder ile çizilip, LigPrep işlemine [14] tabi tutulmuş ve ardından Ligand Docking [15] işlemi başlatılmıştır. Ligand Interactions işlemi ile etkileşimler görüntülenmiştir. Docking aşamasında belli enerji değerinden yüksek değerle bağlananlar program tarafından elimine edilmiştir. Yeşil ile gösterilen etkileşimler hidrofobik (Pi-Pi veya alkil olmak üzere); mor olanlar, hidrojen bağı etkileşimlerini; mavi-kırmızı, tuz köprüsünü; ve kırmızı ise pi-kasyon etkileşimlerini temsil etmektedir. Kolinesteraz inhibisyonu için AChE enzimi (pdb id: 4BDT) test edilmiş olup pozitif kontrol olarak Huprin W kullanılmıştır [16]. Ayrıca QikProp ile bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri hesaplanmış ve ilaç olabilmek için Huprin W ile karşılaştırılmıştır (Tablo 4) [17].

BULGULAR VE TARTIŞMA

Antikanser etki çalışmaları

24 saatlik ilaç uygulamaları sonucunda fenotiyazin ana yapısından daha etkin türevler gözlemlenmiştir. Ara ürünlerden 1 ve 3 öne çıkmışlardır. Diğer ara ürün türevleri 2, 4 ve 5'in fenotiyazin (PTZ) yapısına benzerliği değerlendirildiğinde, 1 ve 3 ileri sentez yolları için öncül bilgiler sunmaktadırlar. Özgün türevler arasındaysa 13 ve 14 öne çıkmışlardır (Tablo 3).

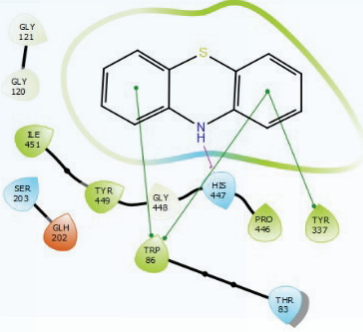
Tablo 3 24 saatlik türev uygulamaları nihayetinde elde edilen IC50 değerleri (µM).

	Hep3B	SkHep1	HepG2	Huh7	MCF7
PTZ	61,05	44,74	71,17	138,51	ns
SFB	5,973876	0,258861	11,28758	6,643247	--
1	11,14	12,46	45,43	31,33	17,46
2	33,69	49,44	92,32	82,2	40,17
3	9,78	10,95	41,49	28,06	4,92
4	43,44	40,11	--	--	42,47
5	56,72	44,72	--	--	61,69
6	103,16	405,23	152,01	177,59	49,42
7	57,64	ns	ns	ns	--
8	80,87	ns	139,33	78,42	--
9	87,5	ns	92,41	105,17	85,14
10	101,67	166,84	ns	36,69	45,78
11	88,81	ns	95,44	101,8	--
12	34,24	91,74	67,51	104,33	64,94
13	30,01	62,9	25,17	22	19,76
14	24,25	53,15	21,48	28,58	20,83
15	23,83	71,51	--	--	39,07
16	218,84	ns	ns	107,55	--
17	61,3	141,33	99,62	166,96	--

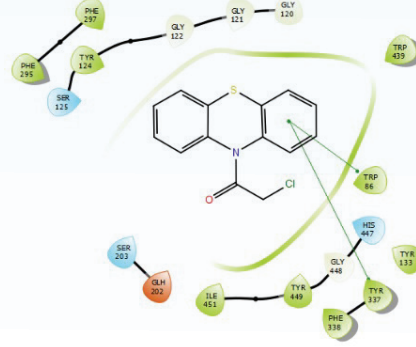
Moleküler kenetlenme analizleri

ACHe (pdb ID=4BDT) modülasyonunun simüle edilmesi için bu komplekste var olan etkileşimleri taklit eden fenotiyazin türevleri mercek altına alınmıştır. Ligandların bu hedef ile oluşturdukları etkileşimler Şekil 2'de sunulmuş ve Huprin W bileşiğinin etkileşimleri ile karşılaştırılmıştır [16].

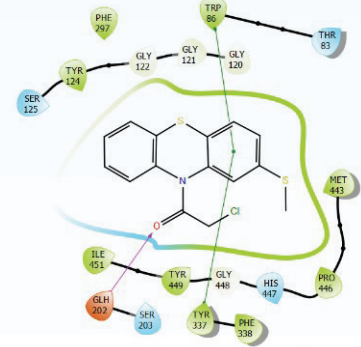
PTZ (Glide score: -9.773)



1 (Glide score: -8.216)



3 (Glide score: -8.935)



Şekil 2 Schrödinger ile elde edilen iki-boyutlu etkileşim diyagramları.

QikProp analizleri

Tablo 4 AChE ligandları için QikProp ile hesaplanan moleküler özellikler

	Moleküle ağırlık	Moleküler hacim	QPlogp	% Oral absorpsiyon
HUW	313.829	990.146	2.876	83.916
PTZ	199.270	663.265	3.568	100.000
1	275.752	804.331	3.570	100.000
2	310.197	857.505	4.186	100.000
3	321.839	937.634	4.338	100.000
4	289.779	862.599	4.987	100.000
5	324.224	921.603	4.647	100.000
6	364.436	1126.716	4.490	100.000
7	415.336	1199.044	5.237	100.000
8	382.427	1111.739	4.457	100.000
9	380.891	1162.276	4.810	100.000
10	346.446	1117.491	4.299	100.000
11	380.891	1161.551	4.793	100.000
12	360.473	1164.140	5.422	100.000
13	394.918	1207.711	5.912	100.000
14	378.463	1190.619	5.590	100.000
15	396.4542	1207.435	5.729	100.000
16	332.419	1051.181	4.604	100.000
17	400.418	1119.542	5.364	100.000

Hesaplanan parametrelerden moleküler hacmin büyük olması kaviteyle etkileşimi zorlaştırabilmektedir. PTZ ve 1, reseptöre bağlanabilmek için gerekli olan düşük moleküler hacme sahiptirler. 13 ve 15 numaralı bileşikler, HUW'a göre aşırı yüksek bir log P değerine sahiptir ve Lipinski kurallarına uymamaktadır. Bu değer, bileşiğin membranlardan geçişini ve toksisiteyi etkilediğinden 3'ten yüksek olmamalıdır ve HUW bu parametreyi sağlamaktadır. Aktif bileşik 3'ün özellikleri incelendiğinde, moleküler ağırlığın HUW'a yakın olduğu fakat moleküler hacmin yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, kompütasyonel log P değeri HUW'a göre oldukça yüksek bulunmuştur. İlacın bu özelliği biyoyararlanımda uygun olmayan sonuçlar doğurmakla birlikte, ilaç olabilmek kriterlerine uyumu etkilemektedir.

SONUÇLAR

Elde edilen 17 bileşiğin (1-17) Hep3B, SkHep1, HepG2, Huh7 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı in vitro sitotoksik etkileri taranmıştır. Sonuçta, fenotiyazin türevi bileşiklerden 13 ve 14 'e ek olarak ara ürün bileşikleri 1 ve 3 aktif olarak bulunmuştur. Yapı-etki ilişkileri incelendiğinde, fenotiyazin halkasının ikinci konumundaki metiltiyo grubunun ve sonuç ürünlerden 13 ve 14'teki p-klorofenil ve p-fluorofenil gruplarının sitotoksik etkiyi artırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Sitotoksitesi en yüksek bulunan 3 numaralı bileşiğin doking analizlerindeki bağlanma modu ve etkileşimleri bu bileşiğin Hep3B, SkHep1, ve HepG2 hücre hatları üzerindeki aktivitesini destekler niteliktedir. Bu bileşik, reseptör kavitesindeki Trp86 ve Tyr337 ile Pi-Pi etkileşimlerine ek olarak Glh202 ile hidrojen bağı etkileşimleri oluşturmuştur. Nispeten daha az aktif olan bileşik 1'in ise bileşik 3'e göre bir hidrojen bağı etkileşimi göstermediği görülmüştür. Bu karşılaştırmadan yola çıkılarak, kavite yüzeyindeki polar bir aminoasitle gerçekleşecek olan bir hidrojen bağı etkileşiminin aktiviteyi artırdığı söylenebilmektedir.

Sonuçta, fenotiyazin türevlerinin arasından ana yapıya göre daha yüksek antikanser aktiviteye sahip türevler bulunmuş ve bunlardan birkaçı standart Sorafenib'e yakın değerlerde aktivite sergilemiştir. Türevlerden en aktif olan bileşik 3'ün AChE enzimine yüksek afinite ve bu enzim ile çok sayıda etkileşim göstermesi, AChE modülasyonunun antikanser etkideki rolünü in silico olarak ispatlamıştır. Bu çalışma ile antikanser ilaç keşif araştırmalarında fenotiyazin türevlerinin drug repurposing ile kullanılabileceği vurgulanmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Gil-Ad I, Shtaif B, Levkovitz Y, Nordenberg J, Taler M, Korov I, Weizman A. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth. *Oncology Reports*. 2006; 15:107-112.
- [2] Gil-Ad I, Shtaif B, Levkovitz Y, Dayag M, Zeldich E, Weizman A. Antiproliferative activity of phenothiazines in neuroblastoma and glioma cell-lines. Evidence for apoptotic mechanism and relevance to brain cancer therapy. *J Mol Neurosci*. 2004;22:189-198.
- [3] Hwang MK, Min YK, Kim SH. Calmodulin inhibition contributes to sensitize TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer H1299 cells. *Biochem Cell Biol*. 2009;87(6):919-926.
- [4] Qi L, Ding Y. Potential antitumor mechanisms of phenothiazine drugs. *Science China Life Sciences*. 2013;56(11): 1020-1027.
- [5] Tata AM. Muscarinic acetylcholine receptors: new potential therapeutic targets in antinociception and in cancer therapy. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2008;3:94-103.
- [6] Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P. Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis. *Mutat Res*. 2008;659:221-231.
- [7] Pérez-Aguilar B, Vidal CJ, Palomec G, García-Dolores F, Gutiérrez-Ruiz MC, Bucio L, Gómez-Olivares JL, Gómez-Quiroz LE. Acetylcholinesterase is associated with a decrease in cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015;1852(7):1380-1387.
- [8] Zhao Y, Wang X, Wang T, Hu X, Hui X, Yan M, Gao Q, Chen T, Li J, Yao M, Wan D, Gu J, Fan J, He X. Acetylcholinesterase, a key prognostic predictor for hepato-cellular carcinoma, suppresses cell growth and induces chemosensitization. *Hepatology*. 2011;53:493-503.

- [9] Cieslik-Boczula K, Swiatek P, Jaszczyszyn A, Zawilska P, Gasiorowski K, Malinka W, Kohler G. Phase separation in phosphatidylcholine membrane caused by the presence of a pyrimidine analogue of fluphenazine with high anti-multidrug-resistance activity. *J Phys Chem B*. 2014;118:3605-3615.
- [10] Sadek B, Ashoor A, Al Mansouri A, Lorke DE, Nurulain SM, Petroianu G, Wainwright M, Oz M. N3,N7-diaminophenothiazinium derivatives as antagonists of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Pharmacol Res*. 2012;66:213-218.
- [11] Darvesh S, MacDonald IR, Martin E. Selectivity of phenothiazine cholinesterase inhibitors for neurotransmitter. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(13):3822-3825.
- [12] Okada M, Watanabe S, Matada T, Asao Y, Hamatani R, Yamawaki H, Hara Y. Inhibitory effects of psychotropic drugs on the acetylcholine receptor-operated potassium current (IK.ACh) in guinea-pig atrial myocytes. *J Vet Med Sci*. 2013;75:743-747.
- [13] Schrödinger Release 2019-3: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [14] Schrödinger Release 2019-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [15] Schrödinger Release 2019-3: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [16] Schrödinger Release 2019-3: QikProp, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019.
- [17] Nachon F, Carletti E, Ronco C, Trovaslet M, Nicolet Y, Jean L, Renard PY. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochem J*. 2013;453(3):393-369.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 116Z388) tarafından desteklenmiştir.

BAZI KINAZOLİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE NÖTRAL SFİNGOMİYELİNAZ ENZİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

P8

Özge KUYRUKÇU, Yasemin DÜNDAR

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.
(e-posta: ozgekuyrukcu@gazi.edu.tr)

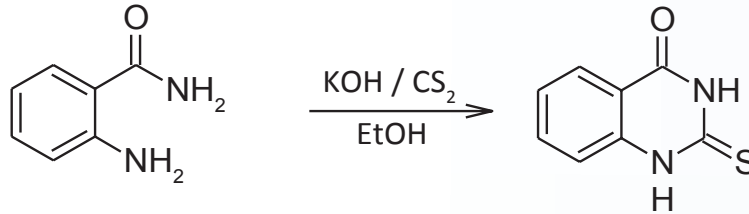
GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, ilerleyen hafıza kaybı ve bilişsel bozukluklarla karakterize, demansın en yaygın şeklidir. Dünya genelinde yaklaşık 50 milyon Alzheimer hastası bulunmaktadır ve her geçen yıl hasta sayısı artmaktadır. Alzheimer hastalığının nöropatolojisinde, amiloid beta plakları, nörofibriller yumaklar, sinaptik kayıp, kolinerjik nöronların dejenerasyonu ve enflamasyon gözlenmektedir [1]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Alzheimer hastalarının beyinlerinde nötral sfingomiyelinaz enzim aktivitesinde artış olduğu tespit edilmiştir [2,3]. Bu sebeple nötral sfingomiyelinaz enzim inhibitörleri üzerine araştırmalar hızla artmıştır [4].

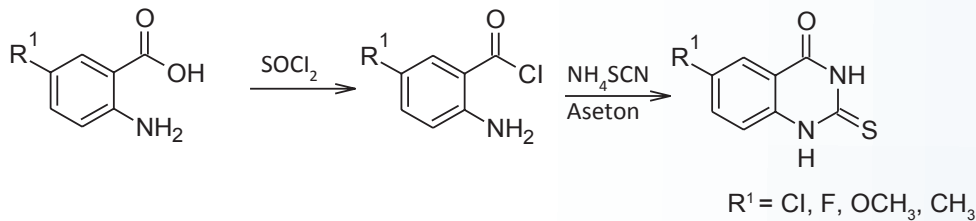
Bu çalışmada, yeni nötral sfingomiyelinaz enzim inhibitörleri elde edebilmek amacıyla tasarlanan bazı kinazolin türevi bileşiklerin sentezi ve inhibitör etkileri sunulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

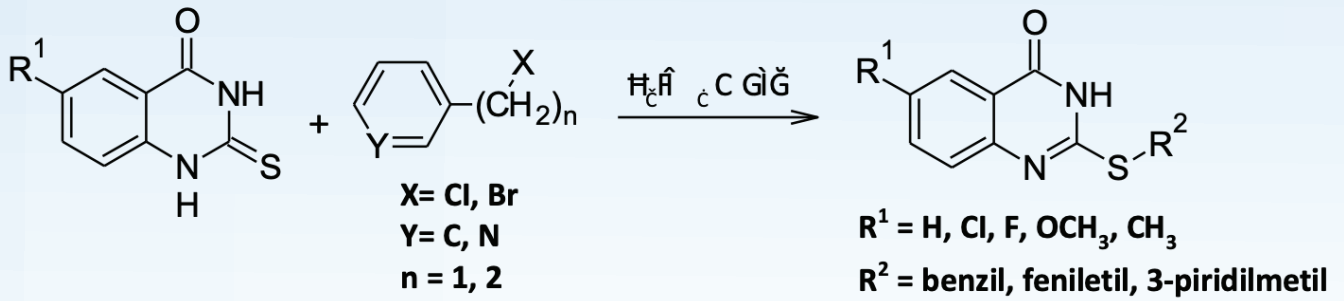
Tasarlanan bileşikler için sentez şemaları aşağıda yer almaktadır. Başlangıç maddesi olarak, antranilik asit türevleri veya antranilamid kullanılmış, literatürde verilen yöntemlere göre ana halkalar sentezlenmiştir [5,6] (Şekil 1,2). S-süstitüe türevlere ise, ana halkaların potasyum karbonat varlığında, feniletıl bromür/ benzil klorür/ 3-piridilmetıl klorür ile tepkimesi ile geçilmiştir [7] (Şekil 3). Sentezlenen orijinal bileşiklerin yapıları HRMS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spektrumları ve elementel analiz verileri ile kanıtlanmıştır. Orijinal olmayan moleküller için sadece HRMS analizi yapılmıştır. Enzim inhibisyon çalışmaları, kolorimetrik nötral sfingomiyelinaz test kiti protokolüne uygun olarak yürütülmüştür. Bileşiklerin aktiviteleri 50 µM konsantrasyonda taranmış ve standart olarak Kambinol (IC₅₀ = 5 µM) kullanılmıştır.



Şekil 1 2-Sülfaniliden-2,3-dihidrokinazolin-4(1H)-on sentezi.



Şekil 2 6-Süstitüe-2-sülfaniliden-2,3-dihidrokinazolin-4(1H)-on türevlerinin sentezi.

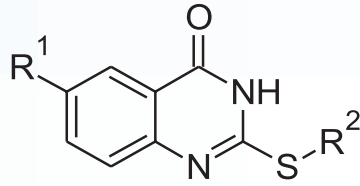


Şekil 3 S-süstitüe türevlerin sentezi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen türevlere ait, % verim, HRMS verileri ile nötral sfingomiyelinaz inhibitör aktiviteyi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1 S-süstitüe türevlere ait % verim, HRMS ve % inhibitör aktivite değeri



Bileşik	R ¹	R ²	% verim	HRMS	Nötral Sfingomiyelinaz Enzim İnhibisyonu (%)
1 [8]	H	Benzil	67,2	H: 269.0749 B: 269.0738	Aktivite yok
2 [9]	H	Feniletil	37	H: 283.0905 B: 283.0909	Aktivite yok
3	H	3-Piridilmetil	51,7	H: 270.0701 B: 270.0704	8,34±5,92
4 (Cas no: 392693-81-1)	Cl	Benzil	18,5	H: 303.0359 B: 303.0359	Aktivite yok
5	Cl	Feniletil	37	H: 317.0515 B: 317.0524	3,06±3,6
6	Cl	3-Piridilmetil	64,2	H: 304.0311 B: 304.0304	10,55±2,03
7	F	Benzil	18,1	H: 287.0654 B: 287.0660	Aktivite yok
8	F	Feniletil	50,5	H: 301.0811 B: 301.0807	6,19±2,41
9	F	3-Piridilmetil	53,4	H: 288.0607 B: 288.0593	29,88±4,35
10 [10]	OCH ₃	Benzil	19,7	H: 299.0854 B: 299.0842	7,82±2,50
11	OCH ₃	Feniletil	27,6	H: 313.1011 B: 313.1012	Aktivite yok
12	OCH ₃	3-Piridilmetil	41	H: 300.0807 B: 300.0802	48,53±2,36

13	CH3	Benzil	57,2	H: 283.0905 B: 283.0905	12,18±2,14
14	CH3	Feniletıl	35	H: 297.1062 B: 297.1058	Aktivite yok
15	CH3	3-Piridilmetil	30	H: 284.0858 B: 284.0847	7,96±1,45
Kambinol				28,58	96,83±0,10

SONUÇLAR

Nötral sfingomiyelinaz enziminin Alzheimer hastalığındaki rolü son yıllarda yapılan çalışmalarla ön plana çıkmış, enzim inhibitörü olabilecek bileşikler ile ilgili çalışmalar hızla artmıştır. Bu amaçla nötral sfingomiyelinaz inhibitörü olabilecek kinazolin halkası taşıyan bileşikler tasarlanmış, sentezleri gerçekleştirilmiş, yapıları aydınlatılmış ve inhibitör etkileri taranmıştır. Daha önce tasarlanan nonsüstitüe ve N-süstitüe kinazolin türevlerinin Kambinole benzer aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu serinin devamı olarak bu çalışmada S-süstitüe kinazolin türevleri tasarlanmış olup aktivite sonuçları değerlendirildiğinde, 50 µM konsantrasyonda, sadece 6 nolu konumda metoksi grubu bulunan Bileşik 12'nin %48,53 inhibisyona sahip olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Kosicek M, Hecimovic S. Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 10;14(1):1310-1322.
- [2] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008 Feb 29;319(5867):1244-1247.
- [3] Mielke MM, Haughey NJ, Bandaru VV, Schech S, Carrick R, Carlson MC, Mori S, Miller MI, Ceritoglu C, Brown T, Albert M, Lyketsos CG. Plasma ceramides are altered in mild cognitive impairment and predict cognitive decline and hippocampal volume loss. *Alzheimers Dement.* 2010 Sep;6(5):378-385.
- [4] Figuera-Losada M, Stathis M, Dorskind JM, Thomas AG, Bandaru VV, Yoo SW, Westwood NJ, Rogers GW, McArthur JC, Haughey NJ, Slusher BS, Rojas C. Cambinol, a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase 2 shows neuroprotective properties. *PLoS One.* 2015 May 26;10(5).
- [5] Jian Y, Forbes HE, Hulpia F, Risseeuw MDP, Caljon G, Munier-Lehmann H, Boshoff HIM, Van Calenbergh S. 2-((3,5-Dinitrobenzyl)thio)quinazolinones: Potent Antimycobacterial Agents Activated by Deazaflavin (F420)-Dependent Nitroreductase (Ddn). *J Med Chem.* 2021 Jan 14;64(1):440-457.
- [6] Chou SY, Yin WK, Chung YS, Chang LS, Liu CW, Chen SF, Shih KS. Kilogram-Scale Synthesis of a Highly Selective α_1 -Adrenoceptor Antagonist (DL-028A). *Org. Process Res. & Develop.* 2002;6(3):273-278.
- [7] Al-Salahi R, Anouar EH, Marzouk M, Abuelizz HA. Anti-HAV evaluation and molecular docking of newly synthesized 3-benzyl(phenethyl)benzo[g]quinazolines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019 Jul 1;29(13):1614-1619.
- [8] Sánchez AI, Martínez-Barrasa V, Burgos C, Vaquero JJ, Alvarez-Builla J, Terricabras E, Segarra V. Synthesis and evaluation of quinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2013 Apr 15;21(8):2370-2378.
- [9] Laurent V, Karen R. Compounds and Methods for Inducing UCP1 Expression. U.S. Patent No. WO 2021/207135 A1.
- [10] Murav'eva KM, Arkhangel'skaya NV, Shchukina MN, Zykhova TN, Pershin GN. Derivatives of 6-methoxy-2-mercaptoquinazolin-4-one as Compounds With Potential Anti-Tubercular Activity. *Pharm. Chem. J.* 1967;1(8):456-458.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 02/2019-28 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Işıl GÜLTEKİN¹, Filiz BAKAR², Oya BOZDAĞ-DÜNDAR¹

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560 ANKARA

²Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06560 ANKARA.

(e-posta: yuceilyas@ankara.edu.tr)

GİRİŞ

Geçmişten bugüne flavonoidlerin kanseri önlemedeki rolü üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Hücre döngüsü durdurma, apoptoz indüksiyonu, antioksidan etki ve sikline bağımlı kinazlar, tirozin kinazlar, topoizomerazlar gibi birçok etki mekanizması tanımlanmıştır [1-4]. Bromodomain içeren proteinlerin (BRD), hücre proliferasyonu ve enflamasyonda yer alan önemli genlerin düzenlenmesinde rol oynadığı ve BRD'lerin çeşitli kanser türleri için terapötik hedefler olarak tanımlanmasına neden olmuştur [3,4]. BRD2 ve özellikle BRD4, kanser ilerlemesinde hayati rol oynamaktadır [5-7]. BRD inhibitörlerinin kimyasal yapısı temel olarak triazolo- ve izoksazolodiazepinler, arilizoksazoller, kinazolinonlar ve kinolinonlar gibi hidrojen bağı alıcıları taşıyan aromatik yapılar içerir [8]. Bu çalışmada, antikanser ilaç geliştirme kapsamında üzerinde çalışılan bromodomain inhibitörü 'kinazolin sülfonamid' grubu bileşiklerin yapısını esas alarak bileşiklerin ana yapısını oluşturan flavon halkasını, sülfonil grubu üzerinden kinazolin yapısı ile birleştirerek etkin bileşik geliştirilmesi hedeflenmiştir.

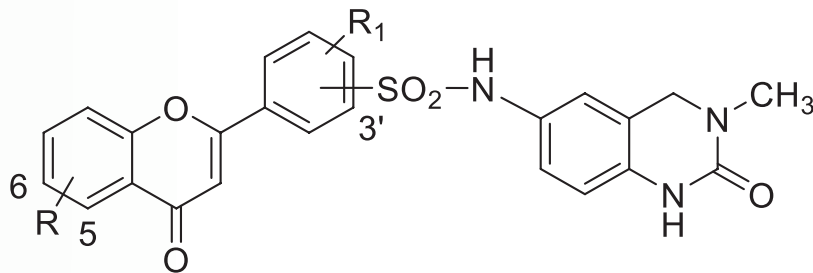
GEREÇ VE YÖNTEM

Kinazolinil flavon bileşikler, 6-amino-3-metil-3,4-dihidrokinazolin-2(1H)-on'un susuz tetrahidrofuran (THF) / piridin ortamında flavon-sülfonil klorür ile reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir. Sentez edilen bileşiklerin insan A549 akciğer karsinoma, MCF-7 meme karsinoma ve K562 myeloid lösemi hücre canlılığı üzerine etkileri MTT yöntemiyle incelenmiştir. Bunun için 5x10⁴ hücre/ml üzerine, 0,1 µM - 100 µM arasında değişen konsantrasyonlarda madde uygulanmıştır. Sonuçlar, canlı hücre yüzdesi ± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Bileşiklerin BRD inhibitör etkinlikleri BRD2, BRD3 ve BRD4 (BD1+BD2) TR-FRET Assay Kitleri (BPS Bioscience, Amerika) ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen kinazolinil flavon bileşikler (Şekil 1) in-vitro koşullarda, farklı kanser hücre hatlarında (A549, MCF-7, K562) sitotoksik/sitostatik etkileri bakımından test edilmiştir. Takiben, bileşiklerin antikanser aktivite mekanizması için bromodomain inhibisyon potansiyeli aydınlatılmıştır.

Sentezlenen 7 orjinal bileşiğin (SQZM, 4MQZM, 4SMQN, 4OQZM, 5OMQ, 6QZM, 6CQZM) potansiyel sitotoksik etkileri 3 farklı hücre hattında (A549, MCF-7, K562) araştırılmıştır (Tablo 1). Buna göre, sübstitüe edilmemiş flavon yapısı içeren SQZM bileşiğinin MCF-7 ve K562, flavonun 6. Konumdan klor sübstitüe 6QZM bileşiğinin ise A549 hücre hatlarına karşı en yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.



Bileşikler	R	R ₁	R-Konum	R ₁ -Konum	SO ₂ - Konum
SQZM	H	H	-	-	3'
4MQZM	H	CH ₃	-	4'	3'
5OMQ	OCH ₃	H	5	-	3'
4SMQN	H	CH ₃	-	3'	4'
6CQZM	Cl	H	6	-	3'
4OQZM	H	OCH ₃	-	4'	3'
6QZM	OCH ₃	CH ₃	6	4'	3'

Şekil 1 Sentezlenen kinazolinil flavon bileşikleri.

Tablo 1 Sentezlenen bileşiklerin A549, MCF-7, K562 hücre hatlarında sitotoksik aktiviteleri.

Bileşikler	IC ₅₀ değerleri (µM)		
	A549	MCF-7	K562
[SQZM]	97.271	91.175	174.814
[4MQZM]	154.298	132.630	409.851
[5OMQ]	322.087	312.757	1959.254
[6QZM]	80.848	119.825	265.499
[4SMQN]	325.778	180.591	238.070
[6CQZM]	364.674	357.289	640.384
[4OQZM]	282.262	219.743	250.752

Sitotoksik aktiviteleri incelenen bileşiklerin antikanser aktivite mekanizması için bromodomain inhibisyon potansiyelleri taranmıştır. BRD inhibisyon çalışması için seçilen SQZM bileşiğinin anlamlı BRD3 inhibisyonu gerçekleştirdiği saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 2 [SQZM] bileşiğinin bromodomain inhibisyonu IC₅₀ değerleri (µM).

Madde	BRD2	BRD3	BRD4
[SQZM]	282.95	65.96	750.75

SONUÇLAR

Sentezlenen 7 orjinal bileşiğin (SQZM, 4MQZM, 4SMQN, 4OQZM, 5OMQ, 6QZM, 6CQZM) potansiyel sitotoksik etkileri 3 farklı hücre hattına (A549, MCF-7, K562) uygulanmıştır. Hücre hatlarında sitotoksik aktivite gözlenmiş olup, bileşiklerin antikanser aktivite mekanizması için bromodomain inhibisyon potansiyelleri taranmıştır. SQZM bileşiğinin BRD3 inhibisyonu gerçekleştirdiği saptanmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Choi EJ. Hesperetin induced G1- phase cell cycle arrest in human breast cancer MCF-7 cells: involvement of CDK4 and p21. *Nutrition and Cancer* 2007;59: 115-119.
- [2] Lee WJ, Chen WK, Wang CJ, Lin WL, Tseng TH. Apigenin inhibits HGF-promoted invasive growth and metastasis involving blocking PI3K/Akt pathway and beta 4 integrin function in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2008;226: 178-191.
- [3] Sghaierra MB, Skabdrani I, Nasra N, Francac MGD, Chekir-Ghediraa L, Ghendiraa K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure- activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology, AAPS*, 2011;32: 336-348.
- [4] Strissel PL, Strick R. Multiple effects of bioflavonoids on gene regulation, cell proliferation and apoptosis: natural compounds move into the lime light of cancer research. *Leuk. Res.*,2005;29: 859-861.
- [5] Hewings DS, Rooney TPC, Conway SJ. Emerging Epigenetic Therapies—Bromodomain Ligands. *Epigenetic Cancer Therapy*, 2015;22: 495-524.
- [6] Ramadoss M, Mahadevan V. Targeting the cancer epigenome: synergistic therapy with bromodomain inhibitors. *Drug Discovery Today*,2018; 23: 76-89.
- [7] Belkina AC, Blanton WP, Nikolajczyk BS, Denis GV. The double bromodomain protein Brd2 promotes B cell expansion and mitogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 2014;95: 451-460.
- [8] Ferri E, Petosa C, Mckenna CE. Bromodomains;Structure, function and pharmacology of inhibiton. *Biochemical pharmacology*, 2016;106: 1-18.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 217S489 proje numarası ile desteklenmiştir.

BAZI YENİ 4-(FURAN-2-İLMETİL)-6-METİLPİRİDAZİN-3(2H)-ONLARIN SENTEZİ, ANTİMİKOBAKTERİYEL VE ANTİFUNGAL DEĞERLENDİRİLMESİ

P10

Burcu KARAYAVUZ¹, Vagolu Siva KRISHNA², Didem KART³, Oya Unsal TAN^{1*}

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06018, Ankara.

² Medisinal Kimya ve Antimikobakteriyel Araştırma Laboratuvarı, Eczacılık Grubu, Birla Teknoloji ve Bilim Enstitüsü – Pilani, Hyderabad Campus, Jawahar Nagar, Hyderabad 500 078, Andhra Pradesh, Hindistan

³ Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

^{1*} Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06100, Ankara
(e-posta: karayavuzburcu@gmail.com)

GİRİŞ

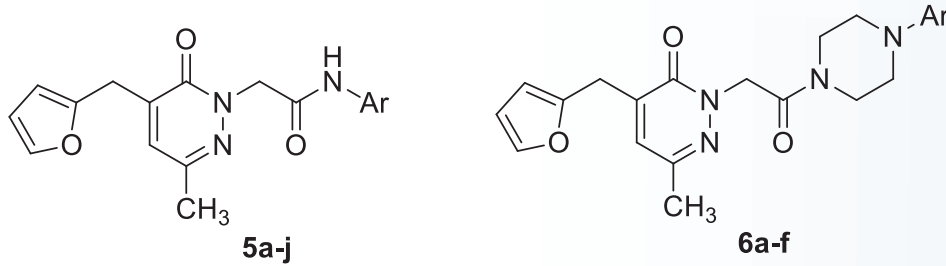
Tüberküloz (Tb), dünya çapında ilk 10 ölüm nedeni arasında yer alan ve Mycobacterium tuberculosis (Mtb) basilinin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Dünya nüfusunun yaklaşık dörtte biri Mtb ile enfekte olduğundan tüberküloz hastalığı geliştirme riski altındadır (1). M. tuberculosis ile enfekte bireylerin çoğu patojene karşı etkin bir immünite geliştirir, böylece tüberküloz hastalığının belirtileri görülmez ve enfeksiyon vücuda yayılamaz. Bu duruma latent tüberküloz denir (2). Latent tüberküloz enfeksiyonunun yeniden aktivasyonu, özellikle tüberküloz insidansının düşük olduğu ülkelerde, yeni tüberküloz vakalarının çoğunluğunu oluşturur (3). Tedavideki uyumsuz sorunu, giderek artan çoklu ilaç direnci ve basille enfekte olmuş çok sayıda latent tüberkülozlu bireyin ortaya çıkışı göz önüne alındığında yeni etkili antitüberküloz ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (4).

Piridazin-3(2H)-onlar, gösterdikleri antimikobakteriyel, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser, antikonvülsan gibi çok çeşitli farmakolojik aktiviteleri ve halkanın farklı konumlarından kolayca modifiye edilebilmeleri nedeniyle medisinal kimya alanında dikkat çeken heterosiklik yapılarıdır (5-6). Literatürde özellikle 2 numaralı konumundan türevlendirilmiş piridazin-3(2H)-onların güçlü antimikobakteriyel etki gösterdikleri tespit edilmiştir (7). Ayrıca, literatürde furan ve nitrofuran yapısı taşıyan birçok bileşiğin güçlü in vitro antimikobakteriyel aktivite sergiledikleri belirlenmiştir (8).

Bu çalışmada, 2-[5-(furan-2-ilmetil)-3-metil-6-oksopiridazin-1(6H)-il]-N-(aril)asetamid (5a-j) ve 4-(furan-2-ilmetil)-6-metil-2-[2-okso-2-(4-arilpiperazin-1-il)etil]piridazin-3(2H)-on (6a-f) olmak üzere, furan ve piridazin-3(2H)-on halkalarının hibridizasyon ürünü olan 16 yeni bileşik sentezlenmiş ve antimikobakteriyel ve antifungal aktiviteleri incelenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin kimyasal yapıları IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, kütle spektroskopisi ve elementel analiz yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Test edilen bileşiklerden bazıları Mycobacterium tuberculosis'e karşı ümit vadeden aktivite gösterirken, bazıları da C. albicans ve C. parapsilosis'e karşı orta düzeyde in vitro antifungal aktivite göstermiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bileşiklerin sentezinde başlangıç maddesi olarak kullanılan 4-(2-furilmetil)-6-metilpiridazin-3(2H)-on (2), 6-metil-4,5-dihidropiridazin-3(2H)-on (1) ve furfuralin potasyum hidroksit varlığında kondenzasyonu sonucu elde edilmiştir. Bileşik 2'nin, potasyum karbonat varlığında 2-kloro-N-arilasetamidler (3a-j) ve 2-kloro-1-(4-arilpiperazin-1-il)etanonlar (4a-f) ile reaksiyonları sonucu hedef bileşiklere (5a-j ve 6a-f) ulaşılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1 2-[5-(furan-2-ilmetil)-3-metil-6-oksopiridazin-1(6H)-il]-N-(aril)asetamid (5a-j) ve 4-(furan-2-ilmetil)-6-metil-2-[2-okso-2-(4-arilpiperazin-1-il)etil]piridazin-3(2H)-on (6a-f) türevleri

Hedef bileşiklerin *M. tuberculosis* H37Rv'ye karşı in vitro aktiviteleri Mikroplak Alamar Mavisi Deneyi (MABA) metodu kullanılarak incelenmiştir. İzonyazid ve bedakilin referans bileşikler olarak kullanılmıştır. Hedef bileşiklerin ve flukonazolün *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*'e karşı in vitro antifungal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Test edilen bileşiklerden bazıları *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı ümit vadeden aktivite gösterirken, bazıları da *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'e karşı orta düzeyde in vitro antifungal aktivite göstermiştir. Yapıya klor girişinin antitüberküler aktivitede artışa sebep olduğu ayrıca hacimli sübstitüentlerin daha küçük gruplara kıyasla aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Fenil halkası üzerindeki elektron çeken gruplar (F ve NO₂) antifungal aktiviteyi geliştirmiştir.

SONUÇLAR

Özetle, antimikobakteriyel ve antifungal aktivitelerini değerlendirmek için furan halkası taşıyan bir dizi yeni piridazin-3-on türevleri tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Hedef bileşiklerin yapısı, element analizi ve spektroskopik teknikler (IR, kütle, ¹H- ve ¹³C- NMR) ile karakterize edilmiştir. Test edilen bileşikler arasında, klor taşıyan türevler *M. tuberculosis* H37Rv'ye karşı en yüksek antimikobakteriyel aktiviteyi gösterirken, bazı bileşikler *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'e karşı orta düzeyde in vitro antifungal aktivite göstermiştir.

KAYNAKÇA

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021.
- [2] Vasava MS, Bhoi MN, Rathwa SK, Borad MA, Nair SG, Patel HD. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. *Indian J Tuberc* [Internet]. 2017;64(4):252-75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.03.002>
- [3] Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med*. 2015;372(22):2127-35. [4] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021.
- [4] Grüber, G., Introduction: Novel insights into TB research and drug discovery. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2020. 152: p. 2-5.
- [5] Unsal Tan, O., et al., Synthesis and antimycobacterial activities of some new N-acylhydrazone and thiosemicarbazide derivatives of 6-methyl-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-one. *Medicinal Chemistry Research*, 2012. 21(9): p. 2388-2394.
- [6] Mantu, D., et al., Synthesis and antituberculosis activity of some new pyridazine derivatives. Part II. *Eur J Med Chem*, 2010. 45(11): p. 5164-8.
- [7] Chiarelli, L.R., et al., New insight into structure-activity of furan-based salicylate synthase (MbtI) inhibitors as potential antitubercular agents. *Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry*, 2019. 34(1): p. 823-828.
- [8] Yang, Z., et al., Design, Synthesis, and Antifungal Activity of Novel Thiophene/Furan-1,3,4-Oxadiazole Carboxamides as Potent Succinate Dehydrogenase Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021. 69(45): p. 13373-13385.

SİSPLATİN BENZERİ PLATİN KOMPLEKSLERİNİN SENTEZİ VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

P11

Emre CANBOLAT¹, Rahşan ILIKÇI SAĞKAN², Semra UTKU¹

¹ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 33169 Mersin.

² Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 64000 Uşak.

(e-posta: e.canbolatecz@gmail.com)

GİRİŞ

Peyron kloridi olarak bilinen sisplatin 1844 yılında İtalyan kimyacı Michele Peyrone tarafından sentezlenip, kimyasal yapısı ise 1893 yılında Alfred Werner tarafından aydınlatılmıştır [1]. Rosenberg ve ark. tarafından 1965 yılında, elektriksel alanın yaşayan hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, sisplatinin E. coli'nin hücre bölünmesini inhibe ettiği tesadüfen keşfetmişlerdir [2]. Araştırmacılar, E. coli'nin hücre bölünmesinin inhibisyonuna dayanarak, platin bileşiklerinin antikanser ilaç olarak kullanımının yararlı olabileceği düşüncesi ile farelerde oluşturulan Sarkoma 180 ve Lösemi L1210 tümörüne karşı başlatılan çalışmalarda sisplatinin %63-100 arasında değişen başarısını test etmişlerdir [3]. İlk ağır metal bileşiği olan sisplatinin klinik denemeleri ise 1971 yılında yapılmıştır [4]. 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan sisplatin, testis ve ovaryum kanserlerine karşı etkili bir kemoterapötik ilaç olarak kullanılması onaylanmıştır [5,6].

Sisplatin tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlar ile kombine halde veya radyoterapi ile birlikte testis kanseri, yumurtalık, mesane, akciğer, baş ve boyun kanseri, pankreas, meme gibi birçok kanser türünün tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır [7,8]. Sisplatinin terapötik etkisi, doz artırımı ile önemli ölçüde artar ancak yüksek doz ile tedavi nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite gibi önemli komplikasyonları beraberinde getirmektedir [8-10]. Ayrıca, sisplatin ile tedavi edilen ovaryum kanserli hastaların %80-85'inde hastalık yeniden nüksetmekte ve sisplatin ile yapılan tekrar tedavide ise rezistans gelişmektedir [11]. Tedavide görülen bu istenilmeyen sorunların üstesinden gelmek için yeni platin kompleksi bileşiklerin tasarım ve sentezi üzerinde çalışmalara hız verilmiştir. Yeni tasarlanacak platin komplekslerinde, sisplatinin etki göstermediği veya direnç gelişen kanser türlerine karşı etki göstermesi ve istenilmeyen toksik etkilerinin azaltılması amaçlanmıştır [12-14].

Terapötik etkinliği DNA'ya katılma yeteneğine bağlı olan sisplatinin yapısında yer alan ayrılan klor ligandının daha stabil ligandlar olan dikarboksilat ayrılan ligandları ile değiştirilmiş ve ikinci kuşak platin kompleksi olan karboplatin geliştirilmiştir. Sisplatin ile karşılaştırıldığında daha yavaş hidroliz olan dikarboksilat ayrılan ligandına sahip olan karboplatin daha yüksek dozda kullanılmasına rağmen daha düşük toksisiteye sahiptir. Karboplatin, sisplatin ile benzer aktivite spektrumuna sahiptir ve sisplatin ile çapraz rezistans sergilemektedir. Bu durum siplatin gibi amanyok taşıyıcı ligandına sahip olması ile açıklanmaktadır [13, 15].

Sisplatin yapısında bulunan klor ayrılan ligandının daha yavaş hidroliz olan dikarboksilat ile yer değiştirilmesi ile toksik etkinin azalacağı görülmüştür. Taşıyıcı amonyak ligandlarının, heterosiklik amin grupları ile yer değiştirilmesi ile de sitotoksik etkinin olumlu yönde değişeceği kanıtlanmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, bazı amino asitleri, peptidleri veya glukozaminleri ligand olarak taşıyan Pt(II) kompleksi bileşiklerin sentezlendiği ve bu bileşiklerden bazılarının antitümör etkilerinin olduğu saptanmıştır [16-17].

İmidazol (1,3-diaza-2,4-pentadien), pürinler gibi biyolojik yapı taşları, birçok kofaktör, histidin ve biyoaktif moleküllerinin yapı taşlarında bulunmasından dolayı vücudun tanıdığı bir heteroaromatik halka sistemidir. Kimyasal yapısında bulunan azot atomları ile hidrojen bağı yapabilme yeteneğinden dolayı suda çözünür olması ve düşük toksisite göstermesi medisinal kimyacılar tarafından üzerinde araştırma yapılan bir halka sistemi olmuştur [2,18]. Ayrıca biyolojik sistemlerin en önemli bağlanma bölgelerinde yer alan histidin aminoasiti ve birçok enzimin aktif bölgesinde bağlanma noktalarında bulunmaktadır [19, 20]. Fungal, alzheimer, tüberküloz, ülser, tiroit ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların yapısında bulunması yeni geliştirilecek farmasötik bileşikleri için umut verici bir halka sistemi olarak araştırılmasına olanak sağlamıştır [19, 21-22].

Yapılan literatür taramaları ve grubumuz tarafından yürütülen çalışmaların sonuçlarına göre [23-30], bu tez çalışmasında potasyum di(oksالاتo)platin(II) dihidrat (Kompleks 1) ile 1-(4-metoksifenil)imidazol (L1), 1-benzilimidazol (L2) veya 1-fenilimidazol (L3)'ün reaksiyonu ile sentez edilen kapalı formülü [Pt(L1)2oksalat] (Kompleks 2) [Pt(L2)2oksalat] (Kompleks 3) ve [Pt(L3)2oksalat] (Kompleks 4) olan üç adet orijinal Pt(II) kompleksi tasarlanarak sentezlenmiştir. Sentez edilen Kompleks 2-4'ün kimyasal yapısı elementel analiz ve spektroskopik yöntemler ile aydınlatılmıştır. Komplekslerin MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile test edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sisplatin ve oksaliptatin referans olarak kullanılmıştır. Ayrılan oksalat ve klor ligandlarının sitotoksik etkiye olan katkısını değerlendirmek için daha önce Özge Eryiğit'in yüksek lisans tez çalışmasında [25] sentez edilen [Pt(L1)2Cl2], [Pt(L2)2Cl2] ve [Pt(L3)2Cl2] kompleksler MTT testinde kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Sentez çalışmalarında kullanılan taşıyıcı ligandlar, solvanlar ve kimyasallar analitik niteliktedir (Merck veya Aldrich). Platin(II) komplekslerinin sentezinde; 1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol, 1-benzil-1H-imidazol, 1-fenil-1H-imidazol, potasyum tetrakloroplatinat, potasyum oksalat monohidrat, isopropanol, etanol, metanol, kloroform, eter ve distile su kullanıldı. [Pt(L1)2Cl2], [Pt(L2)2Cl2] ve [Pt(L3)2Cl2] kapalı formülüne sahip kompleksler Uzm. Ecz. Özge Eryiğit'in Yüksek Lisans Tez Çalışmasında sentezlendi [25].

Kieselgel 60 F254 ile 0.2 mm kalınlığında kaplanmış hazır alüminyum plaklar ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmalarında kullanıldı (Merck). UV lambası ve dragendorff belirteci kullanılarak plaklardaki lekeler belirlendi.

MCF-7 (meme kanseri, Atlas Bioteknoloji firmasından temin edildi), hücre hattı kullanıldı. Sitotoksikite deneyinde kimyasal madde ve malzeme olarak DMSO (Amresco/200-664-3), PBS (Bioshop/PBS415.1), İzopropanol (Sigma Aldrich 67-63-0), L-glutamin (Wisent Bioproducts/ 609-065-EL), fetal sığır serumu (Biological Industres, USA/04-007-13), Tripsin/EDTA (Biological Industres, USA/03-053-1B), Dulbecco's modified Eagle medium hücre besiyeri (DMEM, Biological Industres, USA/01-050-1A), EMEM hücre besiyeri (Lonza, BE12-611F), %1 Penisilin/streptomisin (Penisilin 10000 units/mL Streptomisin 10mg/mL/Biological Industres, USA /03-031-1C), 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (SPL Lfe Science), Laminar hava akışlı kabin (Nüve MN120), Karbondioksit inkübatör, (Thermo, steril cycle İ160), İnverted mikroskop (Nikon), Soğutmalı Santrifüj (15 ml'lik tüpler için Thermo, SL40R), Derin dondurucu -80oC (Nüve), Derin dondurucu -20oC (Thermo, F700), Buzdolabı +4oC (Thermo, R700), Mikroplak okuyucu (Thermoscientific, Multisky) ve Vortex (Thermo, LP) kullanıldı.

Sentez

Potasyum di(oksالاتo)platin(II)dihidrat [K2[Pt(oksalat)2].2H2O sentezi (Kompleks 1) [29]

5 mmol potasyumtetrakloroplatinat'ın üzerine 70°C'deki 20 ml su ilave edilerek çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin üzerine 25 mmol potasyumoksalat monohidrat ilave edilerek 3 gün süreyle 70°C'lik su banyosunda ısıtılarak karıştırıldı [29]. Reaksiyon ısı kapatıldıktan sonra 1 gün buzdolabında +4°C bekletildi. Süre sonunda çöken kompleks süzülüp, sırasıyla sıcak su (70°C), oda sıcaklığındaki su ve soğuk su (4-5°C) ile yıkandı. Ardından sudan kristallendirildi ve oluşan iğne şeklindeki kristaller süzülerek kurutuldu.

Oksalato-di-(1-süstitüimidazol)platin(II) komplekslerinin genel sentez yöntemi (Kompleks 2, 3 ve 4)

Sentezlenmek istenilen komplekse göre seçilen 1.8 mmol ligandın (L1-L3) 50-60°C'de 10 ml izopropanol içerisindeki çözeltisine, 1 mmol K2[Pt(oksalat)2].2H2O'ın (Kompleks 1)'in 10 ml sulu çözeltisi yaklaşık 30 dakika süre ile damla damla ilave edilerek reaksiyon karışımı 50-60°C'de 2-3 gün karıştırıldı. Reaksiyon karışımının uygun aralıklarda alınan İTK ile takip edildi. Reaksiyonun tamamlandığının tespit edilmesinden sonra karışım 1 gün buzdolabında bekletildi ve oluşan çökelek süzülerek ayrıldı. Çökelek sırasıyla sıcak su (70°C), soğuk su (4-5°C), sıcak etanol (50-70°C), soğuk etanol (4-5°C) ve eter ile birkaç defa yıkanarak temizlendi. İTK çalışmalarında hazır plaklar, kloroform:metanol (80:20) ve (90:10) solvan sistemi kullanıldı.

Hücre kültürü çalışmaları

Bu tez çalışmasında sentez edilen Kompleks 2-4, Özge Eryiğit'in Yüksek Lisans Tez çalışmasında [25] sentez edilen kapalı formülü [Pt(L1)2Cl2], [Pt(L2)2Cl2] ve [Pt(L3)2Cl2] olan klor ayrılan ligandı taşıyan 3 adet kompleks, pozitif kontrol olarak sisplatin ve oksaliptatinin kullanılmıştır.

Kompleks 2-4, [Pt(L1)2Cl2], [Pt(L2)2Cl2], [Pt(L3)2Cl2] ve pozitif kontrol olarak siplatin ve oksaliplatinin sitotoksik etkisini test etmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı [31]

96 gözlü hücre kültür pleytlerine MCF-7 hücreleri ekildi. Her bir kuyuya ekilecek olan hücre yoğunluğu 10.000 hücre olacak şekilde ayarlandı. Hücrelerin 48 saatte ideal yoğunluğa ulaştığı gözlemlendi. MCF7 hücreleri, ısı ile inaktifleştirilmiş %10'luk FBS, 2µM L-glutamin, 100 µg/ml streptomisin ve 100 u/ml penisilin içeren DMEM vasatında %5 karbondioksit içeren ve 37°C olan inkübatörde kültüre edildi. Tripsinizasyondan sonra 96 kuyucuklu kültür plaklarına kuyucuk başına 5X10³ hücre olacak şekilde ekildi. Yirmi dört saat inkübasyondan sonra test edilecek kompleksler %10'luk DMSO'da çözülerek 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 olmak üzere 7 farklı konsantrasyonu (160, 80, 40, 20, 10, 5 ve 2.5 µM) hücreler üzerine uygulandı. 72 saat 37 °C %5 CO₂'de inkübatörde inkübe edildi. %10'luk DMSO çözücü kontrolü olarak; 100 µM konsantrasyondan başlamak üzere 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.56 µM sisplatin ve oksaliplatin pozitif kontrol olarak ve kontrol (kör) olarak sadece besiyeri kullanıldı. 72 saat sonunda test edilecek her 96-well kültür plate için 10 µl MTT solüsyonu her bir kuyudaki 100 µl medium üzerine eklendi. Orbital shaker kullanılarak pleytlerdeki mediumun MTT solüsyonu ile karışması sağlandı (Biotium MTT cell viability assay kit). 37°C'de 4 saat inkübe edildi. 200 µl DMSO (Sigma) her bir kuyuya ilave edildi. Thermoscientific, Multisky cihazında, 570 nm dalga boyunda sinyal absorbans değeri elde edildi. Background absorbans için 630 nm dalga boyu kullanıldı. Sinyal absorbans değerinden background absorbans değeri çıkarılarak normalize edilmiş absorbans değerine ulaşıldı. Sadece medium olup hücre içermeyen kuyucuklar kör olarak belirlendi ve OD değeri diğer tüm kuyucukların OD değerinden çıkarıldı. Negatif kontrol olarak belirlenen kuyucukların hücre canlılık oranı %100 olarak değerlendirilerek diğer kuyucuklardaki hücrelerin canlılık oranları tespit edildi. Bütün gruplar en az 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Hücre canlılığı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

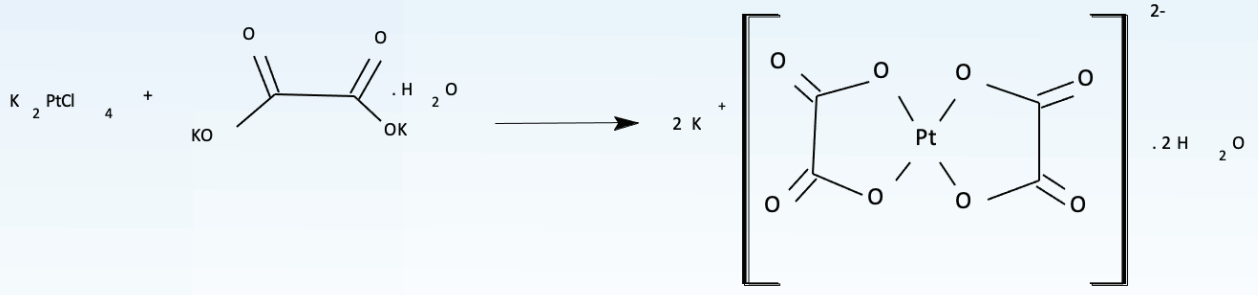
Platin komplekslerinin bazı kanser türlerinde etkili olmaması, direnç gelişimi ve ciddi yan etkilerinin görülmesi nedeniyle yeni bir platin kompleksi antikanser ajan tasarlarırken, çeşitli yapısal özellikler stratejik olarak değiştirilebilmektedir. N döner ligandlar, platin ile termodinamik olarak kararlı bağlar oluşturdukları ve platin-DNA katım ürünlerinde buldukları için "taşıyıcı ligand" olarak adlandırılmaktadır. Bu ligandların modifikasyonları, platin-DNA katım ürünlerinin yapısını ve dolayısıyla hücrel onarım yollarını değiştireceği için sisplatin'deki amanyok ligandından farklı taşıyıcı amin ligandları içeren kompleksler, genellikle farklı kanser hücre dizilerinde farklı bir aktivite spektrumu sergilemekte ve sisplatin ile çapraz direnç göstermemektedir [30].

Sisplatin analogu platin(II) komplekslerinde, ayrılan grup(lar)ın yapısı kompleksin reaksiyon kinetiğini, toksisite profilini ve biyolojik dağılımını etkilemektedir. Sisplatin ile aynı taşıyıcı ligandlara sahip olan karboplatin, siklobutan-1,1-dikarboksilat ayrılan grubu nedeniyle Pt-O bağının hidrolizi, Pt-Cl bağının hidrolizinden daha yavaş yani daha stabildir. Reaktif ürünlerinin oluşum hızının yavaş olması nedeniyle sisplatinde daha yüksek dozda kullanılmasına rağmen daha az toksik yan etkileri bulunmaktadır [13,15].

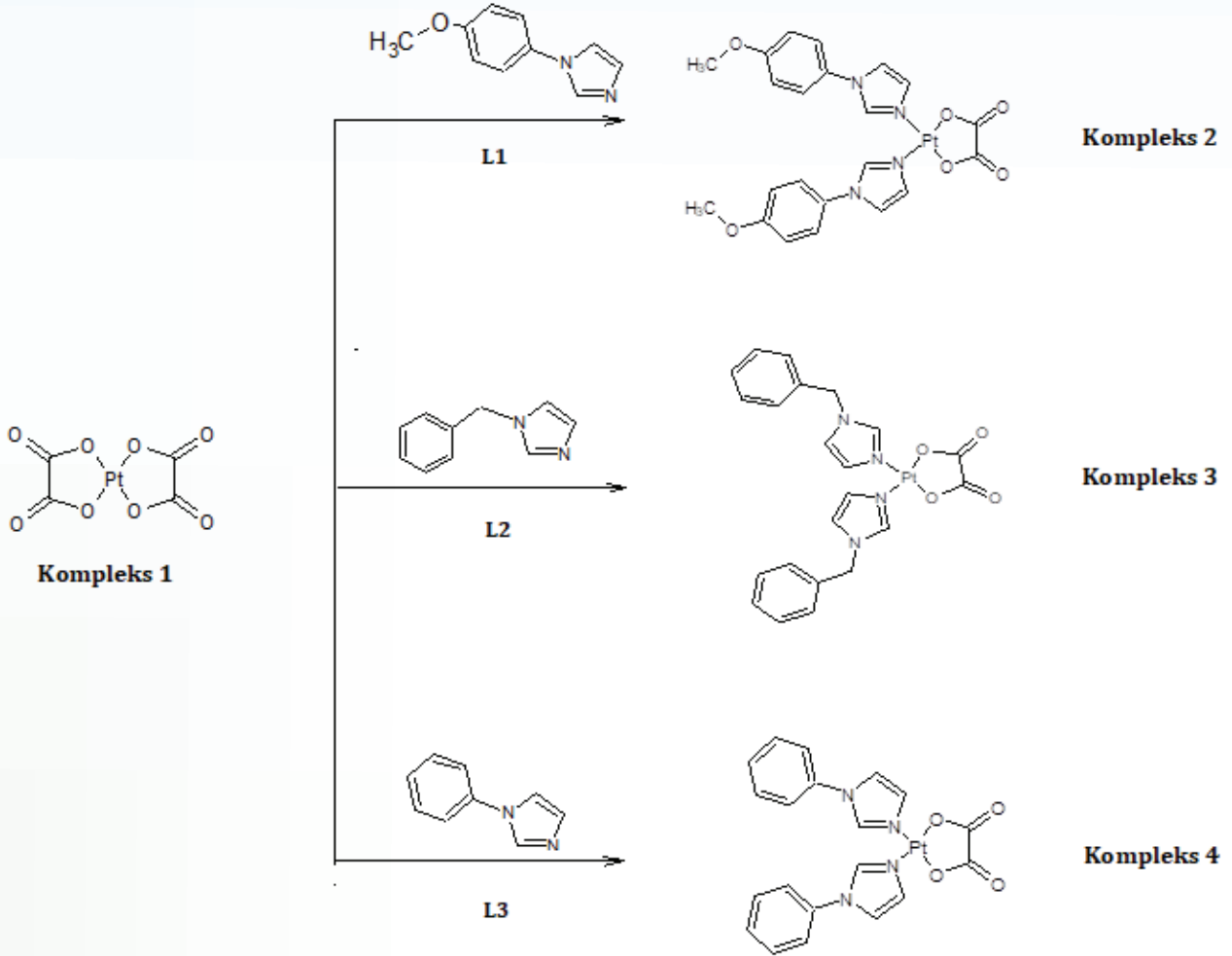
Yapılan literatür taramaları ve çalışma grubumuzun daha önceki araştırma sonuçları [23-26] göz önüne alınarak bu tez çalışmasında dikarboksilat ayrılan ligandına ve 1-süstitüimidazol taşıyıcısına ligandına sahip orijinal üç adet platin(II) kompleksi bileşik tasarlanarak sentezlenmiştir. Taşıyıcı ligand olarak kullanılan 1-(4-metoksifenil)imidazol (L1), 1-benzilimidazol (L2) veya 1-fenilimidazol (L3) organizmanın tanıdığı enzim ve proteinlerin yapısında bulunmaktadır. Sentez edilen orijinal **Kompleks 2-4**'in kimyasal yapısı elementel analiz, FT-IR ve ¹H-NMR spektrumları ile aydınlatılmıştır.

Sentez çalışmalarında öncelikle K₂PtCl₄'in (10 mmol) 70°C'deki 40 ml sulu çözeltisine, potasyumoksalat monohidrat ilave edilerek literatüre kayıtlı olan Kompleks 1 sentezlenmiştir. Kompleks 1'in sentez şeması Şekil 1'de verilmiş olup yapısı IR verileri ve fiziksel özellikleri literatür verileri karşılaştırılarak aydınlatılmıştır [29]. Sarı renkli ve iğnecik kristal şeklinde olan Kompleks 1, 3559-3476 cm⁻¹ de yapısında bulunan H₂O moleküne ait OH gerilimleri ve 565 cm⁻¹ de Pt-O gerilimi IR spektrumunda gözlenmiştir. Elde edilen spektral veriler ve fiziksel özellikler literatür verileri ile uyumludur.

Şekil 1. Potasyum di(oksalo)platinum(II) dihidrat'ın sentez şeması.



L1-L3'ün izopropanol içindeki çözeltisine **Kompleks 1**'in sulu çözeltisinin ilavesi ile **Kompleks 2**, **Kompleks 3** ve **Kompleks 4** sentezlenmiştir. Komplekslerin sentez şeması Şekil 2'de verilmektedir.



Şekil 2 Kompleks 2-4'in sentez şeması.

Saf olarak elde edilen **Kompleks 2-4**'ün kimyasal yapılarını aydınlatmak için elementel analiz verilerinden, FT-IR ve ¹H NMR spektrumlarından yararlanılmıştır. Bu amaçla L1-L3'ün FT-IR ve ¹H NMR spektrumları ile **Kompleks 2-4**'in aynı şartlarda FT-IR ve ¹H NMR spektrumları alınmıştır. **Kompleks 2-4**'in kimyasal yapısı; kompleksleşme ile taşıyıcı ligandın yapısında bulunan karakteristik gruplara ait piklerdeki kayma değerleri ve değişiklikler belirlenmiştir. Elde edilen veriler komplekslerin elementel analiz verileri ile desteklenmiştir.

Elementel analiz verileri L1-L3'ün tek dişli ligand özelliği göstererek **Kompleks 1** ile 1:2 metal:ligand oranında reaksiyona girdiğini kanıtlamıştır. Tek dişli ligand özelliği gösteren L1-L3'ün, platin atomuna imidazol halkasındaki 3 numaralı piridin azotu üzerinden koordine kovalan bağ ile bağlanmıştır. N3 azotu olarak adlandırılan piridin azotunun ortaklanmamış elektron çiftleri ise halkalara bazik özellik kazandırır ve platin atomu ile kelat bağını oluşturur [18, 20, 27, 28].

Kompleks 2-4'in ^1H NMR spektrumları DMSO- d_6 içinde çözülerek alınmıştır. DMSO- d_6 'ya ait su piki δ 3.33 ppm civarında ve kullanılan DMSO- d_6 'nın en iyi şartlarda %99.9 oranında döteryum içermesi nedeniyle $\text{CD}_3\text{SOCD}_2\text{H}$ 'a ait δ 2.50 ppm de pikler görülmektedir.

Genel olarak, kompleksleşmeye bağlı olarak **Kompleks 2-4**'ün protonlarına ait pikler, **L1-L3**'e göre daha düşük alana kaymıştır. **L1**, **L2** ve **L3**'e ait 8.13, 7.33 ve 8.27 ppm de singlet olarak gözlenen imidazol halkasının 2 numaralı konumundaki protonlara ait pikler, Kompleks 2-4 için sırasıyla 9.08, 8.40, 8.90 ppm'de singlet olarak gözlemlenmiştir.

Ayrıca, ^{195}Pt izotopunun spin-kuant sayısının $\frac{1}{2}$ ve izotop bolluğunun %33 olması nedeniyle ^{195}Pt - ^1H spin-spin eşleşmesi sonucu piklerde yarılmaların olduğu görülmektedir. Kompleksleşmeye bağlı olarak ligandlara ait protonlara ait piklerin düşük alana kayması literatür verileriyle uyumludur [24-26, 32, 33].

Bu çalışmada sentez edilen oksalat ayrılan ligandına sahip **Kompleks 2-4**'ün 160, 80, 40, 20, 10, 5 ve 2.5 μM ve sislipatin ve oksaliplatinin 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.56 μM arasındaki azalan konsantrasyonları için sitotoksik aktiviteleri MCF-7 (meme kanseri) hücre hattına karşı MTT yöntemi ile test edilmiştir [26]. Ayrıca Özge Eryiğit'in tez çalışmasında [25] sentez edilen aynı taşıyıcı liganda sahip ancak ayrılan ligandı klor olan 3 adet komplekte sitotoksikite testinde karşılaştırma yapmak amacıyla testlerde kullanılmıştır. **Kompleks 2-4** ve $[\text{Pt}(\text{L1})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{L2})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{L3})_2\text{Cl}_2]$, sislipatin ve oksaliplatinin MCF-7 hücre hatlarına karşı IC_{50} değerleri Tablo 1'de verilmektedir.

IC_{50} değerlerine göre oksalat ayrılan ligandına sahip en etkili kompleks 1-fenilimidazol (L3) ligandına sahip **Kompleks 4**, 1-benzilimidazol (L2) ligandına sahip **Kompleks 3** ve 1-(4-metoksifenil)imidazol (L1) ligandına sahip **Kompleks 2** olarak sıralanmaktadır. Bu sıralama klor ayrılan ligandına sahip komplekslerde $[\text{Pt}(\text{L2})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{L3})_2\text{Cl}_2]$ ve $[\text{Pt}(\text{L1})_2\text{Cl}_2]$ olarak test edilmiştir. Klor ayrılan ligandına sahip kompleksler, oksalat ayrılan ligandına sahip komplekslerden daha aktif olarak bulunmuştur. Bu durum oksalat ayrılan ligandının, klor ayrılan ligandı ile karşılaştırıldığında platin atomu ile daha stabil bir bağ oluşturması ve reaktif türevlerin daha geç oluşacağı için sitotoksik etkinin de az olması ile açıklanabilir. [30, 34-35]. Test edilen komplekslerin IC_{50} değerleri sislipatin ve oksaliplatinin IC_{50} değerlerinden daha yüksek olarak bulunmuştur.

Tablo 1. Kompleks 2-4, $[\text{Pt}(\text{L1})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{L2})_2\text{Cl}_2]$, $[\text{Pt}(\text{L3})_2\text{Cl}_2]$, sislipatin ve oksaliplatinin MCF-7 (meme kanseri) hücre hattına karşı IC_{50} değeri (μM)

IC_{50} (μM)	
Kompleks 2 $[\text{Pt}(\text{L1})_2\text{Oksalat}]$	$[\text{Pt}(\text{L1})_2\text{Cl}_2]^*$
73.23	44.71
Kompleks 3 $[\text{Pt}(\text{L2})_2\text{Oksalat}]$	$[\text{Pt}(\text{L2})_2\text{Cl}_2]^*$
62.34	15.33
Kompleks 4 $[\text{Pt}(\text{L3})_2\text{Oksalat}]$	$[\text{Pt}(\text{L3})_2\text{Cl}_2]^*$
41.85	35.44
Sislipatin	Oksaliplatin
8.45	5.26

*Bu kompleksler Özge Eryiğit'in tez çalışmasında [25] sentezlenmiş ve bu tez çalışmasında sitotoksikite testine karşılaştırma yapabilmek için dâhil edilmiştir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, literatür verileri ve daha önce yaptığımız çalışmaların sonuçları değerlendirilerek cisplatin yapısındaki amanyok ligandları yerine vücudun tanıdığı 1-sübstitüimidazol heteroaromatik halka sistemleri ile değiştirilerek yeni oksalat ayrılan ligandına sahip üç adet yeni Pt(II) kompleksi (Kompleks 2-4) tasarlanarak sentezlenmiştir.

[Pt(L1)2(oksalat)], [Pt(L2)2(oksalat)] ve [Pt(L3)2(oksalat)] kapalı formüllerine sahip Kompleks 2-4, uygun ligand ve [Pt(oksalat)2].2H₂O kapalı formülüne sahip Kompleks 1'den hareketle sentez edilerek kimyasal yapıları aydınlatılmıştır.

Sentez edilen Kompleks 2-4 ve Özge Eryiğit'in tez çalışmasında sentezlediği [Pt(L1)2Cl₂], [Pt(L2)2Cl₂], Pt(L3)2Cl₂], kapalı formülüne sahip komplekslerin sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile MCF-7 (meme kanseri) hücre hattına karşı test edilmiştir. Cisplatin ve oksaliplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Test edilen kompleksler içinde IC₅₀ değerlerine göre Kompleks 4 > Kompleks 3 > Kompleks 2 en etkili kompleksler olarak belirlenmiştir. Aynı taşıyıcı liganda sahip ancak ayrılan ligandı oksalat veya klor olan komplekslerin IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında klor ayrılan ligandına sahip komplekslerin daha etkili ancak pozitif kontrolden ise daha az etkili olduğu test edilmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Peyrone M. Ueber die einwirkung von ammoniak auf platinchlorür. Eur J Org Chem.1845;55:205-213.
- [2] Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature. 1965;205:698-699.
- [3] Rosenberg B, Renshaw E, Vancamp L, Hartwick J, Drobink J. Platinum-induced filamentous growth in Escherichis coli. J Bacteriol. 1967;93(2):716-721.
- [4] Rosenberg B. Some biological effects of platinum compounds. Platinum Metals Rev. 1971;15(2):42-51.
- [5] Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin- DNA adducts. Chem Rev. 1999;99(9):2467-2498.
- [6] Sherman SE, Lippard SJ. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. Chem Rev. 1987;87(5):1153-1181.
- [7] Yu C, Wang Z, Sun Z, Zhang L, Zhang W, Xu Y ve diğerleri. Platinum-based combination therapy: Molecular rationale, current clinical uses, and future perspectives. J Med Chem. 2020;63(22):13397-13412.
- [8] Dos Santos NAG, Ferreira RS, Dos Santos AC. Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. Fd Chem Toxic. 2020;136:111079.
- [9] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. Bioorg Chem. 2019;88:102925.
- [10] Quintanilha JCF, Saavedra KF, Visacri MB, Moriel P, Salazar LA. Role of epigenetic mechanisms in cisplatin-induced toxicity. Critical Rev Oncol/Hematol. 2019;137:131-142.
- [11] Zhao L, Liu S, Liang D, Jiang T, Yan X, Zhao S ve diğerleri. Resensitization of cisplatin resistance ovarian cancer cells to cisplatin through pretreatment with low-dose fraction radiation. Cancer Med. 2019;8(5): 2442-2448.
- [12] Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: Targeted Pt (II) agents, nanoparticle delivery, and Pt (IV) prodrugs. Chem Rev. 2016;116(5):3436-3486.
- [13] Deo KM, Ang DL, McGhie B, Rajamanickam A, Dhiman A, Khoury A ve diğerleri. Platinum coordination compounds with potent anticancer activity. Coord Chem Rev. 2018;375:148-163.

- [14] Khoury A, Deo KM, Aldrich-Wright JR. Recent advances in platinum-based chemotherapeutics that exhibit inhibitory and targeted mechanisms of action. *J Inorg Biochem.* 2020;207:111070.
- [15] Calvert H. The clinical development of carboplatin-A personal perspective. *Inorg Chim Acta.* 2019;498:118987.
- [16] Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: Innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev.* 2003;23(5):633-655.
- [17] Zivkovic MD, Rajkovic S, Djuran MI. Reaction of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ with the N-acetylate dipeptide L-methionyl-L-histidine: selective platination of the histidine side chain by intramolecular migration of the platinum(II) complex. *Bioorg Chem.* 2008;(36):161-164.
- [18] Sundberg R, Martin RB. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. *Chem Rev.* 1974;(74):471.
- [19] Verma A, Joshi S, Singh D. Imidazole: Having versatile biological activities. *J Chem.* 2013;329412.
- [20] Szulmanowicz MS, Zawartka W, Gniewek A, Trzeciak AM. Structure, dynamics and catalytic activity of palladium (II) complexes with imidazole ligands. *Inorg Chim Acta.* 2010;363(15):4346-4354.
- [21] Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. Biological importance of imidazole nucleus in the new millennium. *Med Chem Res.* 2011;20(8):1119-1140.
- [22] Rulhania S, Kumar S, Nehra B, Gupta GD, Monga V. An insight into the medicinal perspective of synthetic analogs of imidazole. *J Mol Struct.* 2021;129982.
- [23] Gümüş F, İzgü F, Algül Ö. Synthesis and structural characterization of some 5(6)-substituted-2-hydroxymethylbenzimidazole derivatives and their platinum(II) complexes and determination of their in vitro antitumor activities by "rec-assay test". *Fabad J Pharm Sci.* 1996;(21):7-15.
- [24] Boğatarkan Ç, Utku S, Açık L. Synthesis, characterization and Pbr322 plasmid DNA interaction of platinum(II) comoplexes with imidazole and 2-phenylimidazole as carrier ligands. *Revue Roumaine de Chimie*, (60), 1, 59-64. by "rec-assay test". *Fabad J Pharm Sci.* 2015;(21):7-15.
- [25] Eryiğit Ö. Platin (II) kompleksi sentez ve biyolojik aktivitesi üzerinde çalışmalar, Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2019, Mersin.
- [26] Ertuğrul M. İmidazol türevi taşıyıcı liganda sahip platin kompleksleri üzerinde çalışmalar, Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2019, Mersin.
- [27] Manocha P, Wakode SR, Kaur A, Anand K, Kumar H. A review: Imidazole synthesis and its biological activities. *Int J Pharm Sci Res.* 2016;1(7):12-16.
- [28] Grimmett MR. Advances in imidazole chemistry. *J Heterocycl Chem.* 1970;(12):103-183.
- [29] Starha P, Zdenek T, Igor P. Platinum(II) oxalato complexes with adenine-based carrier ligands showing significant in vitro antitumor activity. *J Inorg Biochem.* 2010;104:639-647.
- [30] Bai L, Gao C, Liu Q, Yu C, Zhang Z, Cai L ve diğerleri. Research progress in modern structure of platinum complexes. *Eur J Med Chem.* 2017;140:349-382.

[31] International Standard, Biological evaluation of medical devices- Part 5 Test for in vitro cytotoxicity. 15 Haziran 2021 tarihinde <http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf> adresinden erişildi.

[32] Ranninger CN, Zamora F, Martinez-Cruz LA, Isea R, Masaguer JR. Synthesis and NMR structural analysis of several ortho palladated complexes of substituted benzoimidazole, -oxazole and -thiazole and study of two polymorphic crystals. J Organometal Chem. 1996;(518):29-36.

[33] Albinati A, Arz C, Pregosin PS. Synthesis and X- -amino ethers stabilized via metal complexation. Inorg Chem. 1988;(27):2015-2016.

[34] Zhao J, Gou S, Liu F. Potent anticancer activity and possible low toxicity of platinum (II) complexes with functionalized 1,1 Cyclobutanedicarboxylate as a leaving ligand. Chem Eur J. 2014; 20(46):15216-15225.

[35] Bergamo A, Dyson PJ, Sava G. The mechanism of tumour cell death by metal-based anticancer drugs is not only a matter of DNA interactions. Coord Chem Rev. 2018;360:17-33.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019-1-TP2-3150 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Emine Merve ERTUĞRUL¹, Nebahat Aytuna ÇERÇİ², Betül AYDIN³, Leyla AÇIK³, Semra UTKU¹

¹ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 33169 Mersin.

² Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, 71450 Kırıkkale.

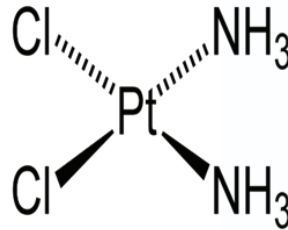
³ Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 06500 Ankara.

(e-posta: merveertl92@gmail.com)

GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, metastaz yaparak vücudun farklı hücrelerine yayılması ile karakterize olan ayrıca kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada ikinci ölüm nedeni olan bir hastalık grubudur [1]. Kanserli hastaların tedavisinde kullanılan kemoterapik ilaçlar, radyoterapi ve cerrahi terapi ile birlikte veya tek başına uygulanmaktadır. Kemoterapötik tedavide amaç tümörün büyümesini ve metastaz yapmasını engellemek hatta tümüyle ortadan kaldırılmak için sitotoksik etki sağlamaktır [2,3]. Görülme sıklığı, çeşitliliği ve ölüm oranı giderek artan bir hastalık olan kanserin tedavi edilmesi için araştırmacılar yeni kemoterapötik ilaçlar geliştirmek için yoğun çalışmalar sürdürmektedir [4].

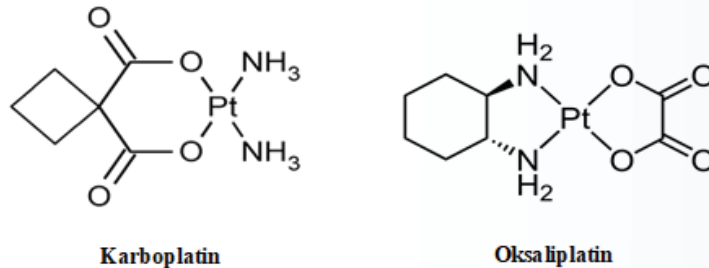
Kanser tedavisinde kullanılan ilk platin kompleksi bileşik olan sisplatin (cis-diammindikloroplatin(II)), 1844 yılında Peyrone tarafından sentezlenmiştir (Şekil 1.) [5]. Rosenberg ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada antikanser etkisi tesadüfen keşfedilmiştir [6]. Bu keşiften yaklaşık 15 yıl sonra Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından kanser tedavisinde klinikte kullanılmak üzere onay almıştır [7].



Şekil 1 Sisplatin

Sisplatin, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, testis, over, mesane, prostat, serviks ve küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri gibi pek çok malign kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir Pt(II) kompleksidir [8]. Böbrek hasarı, sağırılık, bulantı, kusma ve periferik nöropati gibi toksik yan etkiler ve direnç gelişimi sisplatinin klinikte kullanımını kısıtlayan iki önemli problemdir [9]. Ayrıca bazı kanser türleri sisplatine doğrudan veya ilk kullanımdan sonra kazanılmış direnç göstermektedir [10]. Bu nedenle, yan etkileri en aza indirilmiş, sisplatine karşı direnç gelişmiş hücrelerde etki gösteren ve terapötik etkinliği yüksek platin kompleksleri sentezlenmiş ve klinikte kullanılmaya başlanmıştır [11,12].

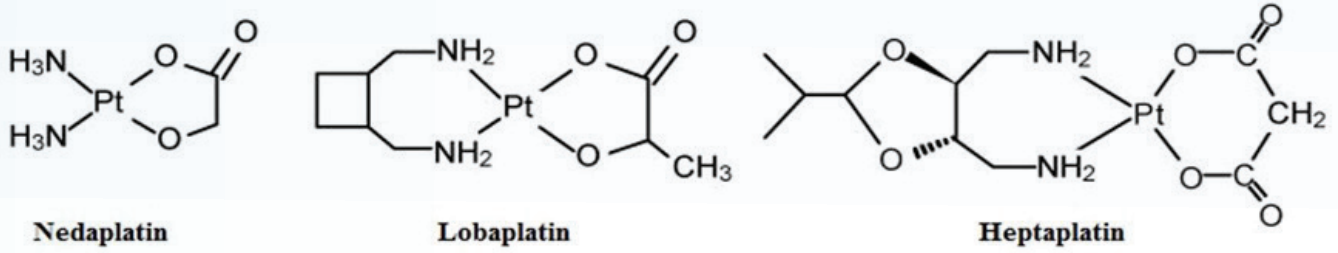
Terapötik etkinliği DNA'ya bağlanma yeteneğine bağlı olan sisplatinin yapısında yer alan taşıyıcı amonyak ligandlarının, heterosiklik amin grupları ile yer değiştirilmesi ile ikinci kuşak Pt(II) kompleksi karboplatin (cis-diammin-(1,1-siklobütandikarboksilatoplatin(II)) sentezlenmiştir (Şekil 2.). Karboplatin, sisplatinin etki gösterdiği kanser türlerine karşı etkilidir ancak daha az yan etkilere sahiptir. Bu durum sisplatinin yapısında yer alan ayrılan klor ligandlarının 1,1-siklobütandikarboksilat ligandı ile değiştirilmesi sonucunda reaktif türevlerin daha geç oluşmasına bağlanmıştır [13,14].



Şekil 2 Klinikte kullanılan 2. ve 3. kuşak Platin(II) kompleksleri

Ayrıca, sisplatin yapısındaki taşıyıcı amonyak ligandlarının 1,2-diaminosikloheksan ve ayrılan klor ligandlarının oksalat grubu ile yer değiştirmesiyle sentez edilen oksaliplatin (cis-[[1,2-sikloheksandiamin-N,N'-oksalatoplatinum(II)]) kolorektal kanser tedavisi için 2002 yılında klinikte kullanıma girmiştir. Oksaliplatinin, sisplatin ve karboplatinin (Şekil 2.) etki göstermediği kolorektal kanser türüne karşı etki göstermesi taşıyıcı ligandının farklılığına ve hücre içine alımda farklı mekanizmaların etkili olduğu görüşü ile açıklanmıştır. Aynı zamanda oksaliplatinin yan etkilerinin sisplatine göre daha az olması, karboplatin kompleksinde olduğu gibi taşıdığı ayrılabilen dikarboksilat ligandından dolayı reaktif metabolitlerinin daha geç oluşması ile açıklanmıştır [15,16].

Sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin tüm dünyada kanser hastalığının tedavisinde kullanılırken, nedaplatin küçük hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş, boyun ve özofagus kanseri tedavisi için Japonya'da, lobaplatin ise Çin'de onay almıştır. Ayrıca heptaplatin, metastatik meme kanseri, kronik miyeloid lösemi ve küçük hücreli akciğer kanseri tedavisi ve mide kanseri tedavisi için Kore'de klinikte kullanılmaktadır (Şekil 3.) [17].

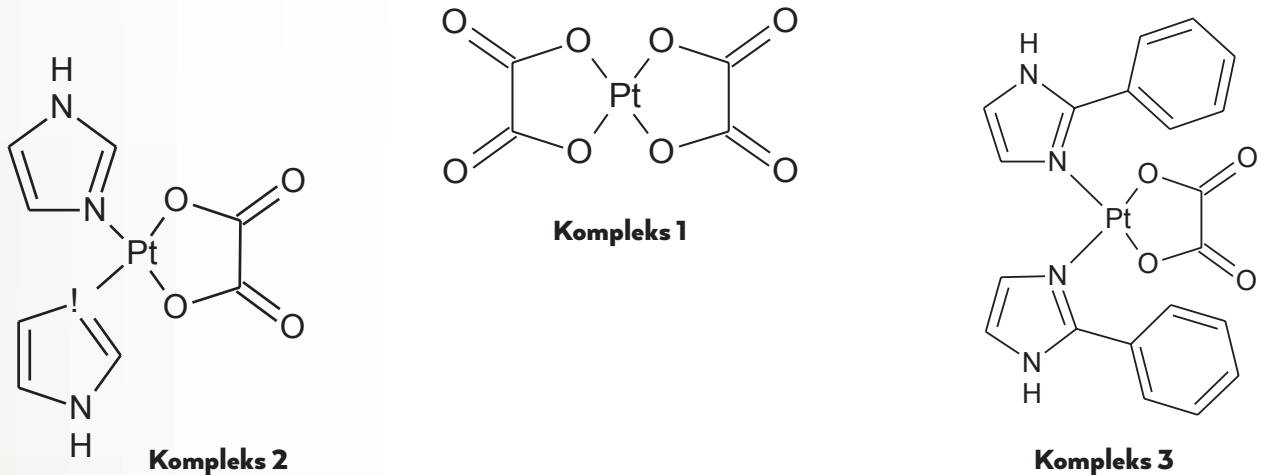


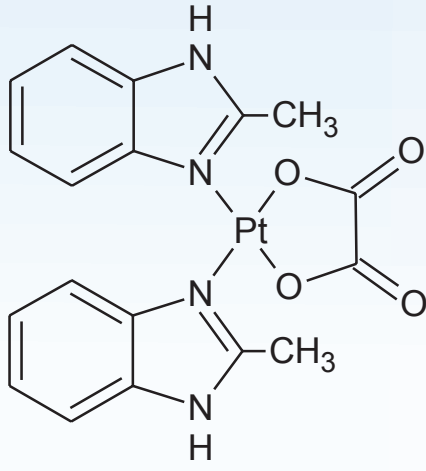
Şekil 3 Kanser tedavisinde bölgesel olarak kullanılan platin(II) kompleksleri.

İmidazol ve benzimidazol, değişik farmakolojik aktivite gösteren biyoaktif heteroaromatik bileşiklerdir. Biyolojik olarak önemli olan histamin ve histidin amino asiti, demir-hem sistemi, çeşitli metalloproteinler ve vitamin B12 türevlerinin yapısında bulunmaktadır [18,19]. Ayrıca canlılarda metal bağlanma bölgelerinde histidin amino asit parçası metal bağlayıcı birçok enzimin aktif merkez bölgesini oluşturmaktadır [20,21].

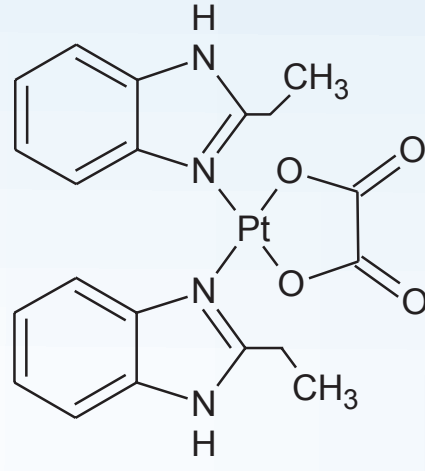
İmidazol halka sistemi, antimikrobiyal, antidepresan, antitumor, antihistaminik [22] ve benzimidazol halka sistemi ise antiparazitik, antikonvülsan, analjezik, antihistaminik, anti-fungal, antihipertansif, antiviral, antikanser ve antienflamatuar etkiye sahip oldukları çok uzun zamandan beri bilinmektedir [23,24]. Ayrıca biyolojik sistemin tanıdığı bir heteroaromatik halka sistemi olan imidazol ve benzimidazol, çeşitli geçiş metalleri için ligand özelliği taşımaktadırlar. Düşük toksisite, yüksek stabilite, metaller ile güçlü bağlanma, elektronik ve sterik özellikleri nedeni ile her iki heteroaromatik halka medisinal kimyacılar için önem taşımaktadır [24-29].

Yapılan literatür taramaları ve grubumuz tarafından yürütülen çalışmaların sonuçlarına göre ayrılan klor ligandının, oksalat grubu ile yer değiştirilmesi ile yan etkilerin ve imidazol veya benzimidazol heteroaromatik halkaların amonyak ile değiştirilmesi ile direnç gelişiminin azalacağı düşüncesiyle dört adet yeni Pt(II) kompleksi (**Kompleks 2-5**), **Kompleks 1**'den hareketle bu tez çalışmasında tasarlanarak sentezlenmiştir (Şekil 1.4).





Kompleks 4



Kompleks 5

Şekil 4 Tez çalışmasında sentez edilen Pt(II) kompleksleri

2-süstitüimidazol veya 2-süstitübenzimidazol ligandı taşıyan Kompleks 2-5'in sentez ve yapıların aydınlatılmasının ardından fare fibroblast hücreleri (L929), küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücreleri (H1299) ve insan kolon adenokarsinom (Caco-2) hücrelerine karşı in vitro sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile test edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Çalışmada kullanılan çözücüler teknik veya analitik niteliktedir (Merck veya Aldrich). Sentez başlangıç maddeleri olarak imidazol, 2-fenilimidazol, potasyum tetrakloroplataınat, potasyum oksalat monohidrat, 1,2-fenilendiamin, asetik asit, propiyonik asit, sodyum bikarbonat ve solvan olarak etanol, metanol, kloroform, izopropanal, eter ve distile su kullanıldı.

İnce tabaka kromatografisi (İTK) çalışmalarında Kieselgel 60 F254 ile 0.2 mm kalınlığında kaplanmış hazır alüminyum plaklar kullanıldı. Lekelerin belirlenmesi amacıyla UV lambası ve dragendorff belirteci kullanıldı.

L929 (Fare fibroblast, An2 Mouse C3; Şap Enstitüsü), H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri; Şap Enstitüsü) ve Caco-2 (An1/ İnsan adeno karsinomu; Şap Enstitüsü) hücre hatları sitotoksisite testlerinde kullanılmıştır.

Sitotoksisite deneyinde kimyasal madde ve malzeme olarak DMSO (Amresco/200-664-3), PBS (Bioshop/PBS415.1), izopropanol (Sigma Aldrich 67-63-0), L-glutamin (Wisent Bioproducts/ 609-065-EL), fetal sığır serumu (Biological Industres, USA/04-007-13), Tripsin/EDTA (Biological Industres, USA/03-053-1B), Dulbecco's modified Eagle medium hücre besiyeri (DMEM, Biological Industres, USA/01-050-1A), EMEM hücre besi yeri (Lonza, BE12-611F), %1 Penisilin/streptomisin (Penisilin 10000 units/mL Streptomisin 10mg/mL/Biological Industres, USA /03-031-1C), 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (SPL Lfe Science), karbondioksitli inkübatör (Binder), mikropleyt okuyucu (Biotek- PowerWave XS2) kullanılmıştır.

Yöntem

Sentez

Taşıyıcı Ligand 2-sübstitüebenzimidazollerin Genel Sentez Yöntemi (Phillips Yöntemi [30])

0.1 mol 1,2-fenilendiamin ile sentezlenmek istenen benzimidazol türevine göre seçilen 0.15 mol asetik asit veya propiyonik asit 100 mL 5 N hidroklorik asit, geri çeviren soğutucu altında 10 saat süreyle magnetik karıştırıcı ısıtıcı ile ısıtılmasıyla Phillips yöntemiyle sentez edildi. Reaksiyonun tamamlanması İTK ile izlendi. Reaksiyon karışımı bir gece oda ısısında bekletildi. İTK çalışmalarında hazır plaklar, kloroform: metanol (80:20) ve kloroform: metanol (90:10) çözücü sisteminde kullanıldı, lekelerin belirlenmesinde UV ışığı ve Dragendorff belirteci kullanıldı. Nötralizasyon sırasında buz banyosu içine alınan reaksiyon karışımına sodyum bikarbonat ilave edilerek ligandlar bazı halinde çöktürüldü. Oluşan çökelek süzülüp, turnusol kağıdı ile nötr reaksiyon verinceye kadar buzlu su ile yıkandı. Su-etanol kullanılarak kristalizasyon yapıldı. Kristal halindeki ligandlar süzülerek alındı.

Potasyum di(oksالات)platinat(II)dihidrat [$K_2[Pt(oksالات)_2].2H_2O$ Sentezi (Kompleks 1)

5 mmol potasyumtetrakloroplatinat'ın 70°C'deki 20 ml su içerisindeki çözeltisine, 25 mmol potasyumoksalat monohidrat ilave edilerek 70°C'de 3 gün süreyle ısıtılarak karıştırıldı [32]. Reaksiyon ısı kapatıldıktan sonra 1 gün buzdolabında bekletildi. Çöken bileşik süzülüp, sırasıyla sıcak su (70°C), oda sıcaklığındaki su ve soğuk su (4-5°C) ile yıkandı. Oluşan çökelek suda kristallendirildi. Oluşan kristaller süzülerek kurutuldu.

Oksalato-di-(nonsübstitüe/2-sübstitüe-imidazol/2-sübstitüebenzimidazol)platin(II) Komplekslerinin Genel Sentez Yöntemi (Kompleks 2, 3, 4 ve 5)

Sentezlenmek istenilen komplekse göre seçilen 1.8 mmol ligandın (L1-L4) 50-60°C'de 10 ml etanol/isopropanol içerisindeki çözeltisine, 1 mmol $K_2[Pt(oksالات)_2].2H_2O$ 'in (Kompleks 1)'in 10 ml sulu çözeltisi yaklaşık 30 dakika süre ile damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı 2 gün oda ısısında daha sonra 50-60°C'de 2-3 gün karıştırıldı. Reaksiyon karışımının uygun aralıklarda alınan İTK ile kompleksleşme reaksiyonu takip edildi. Reaksiyonun tamamlandığının tespit edilmesinden sonra karışım 1 gün buzdolabında bekletildi ve oluşan çökelek süzülerek ayrıldı. Çökelek sırasıyla sıcak su (70°C), soğuk su (4-5°C), sıcak etanol (50-70°C), soğuk etanol (4-5°C) ve eter ile birkaç defa yıkanarak temizlendi.

Sitotoksik Aktivite Çalışması

Kompleks 2-5 ve pozitif kontrol olarak siplatin ve oksaliplatinin sitotoksik etkisini test etmek için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı [31].

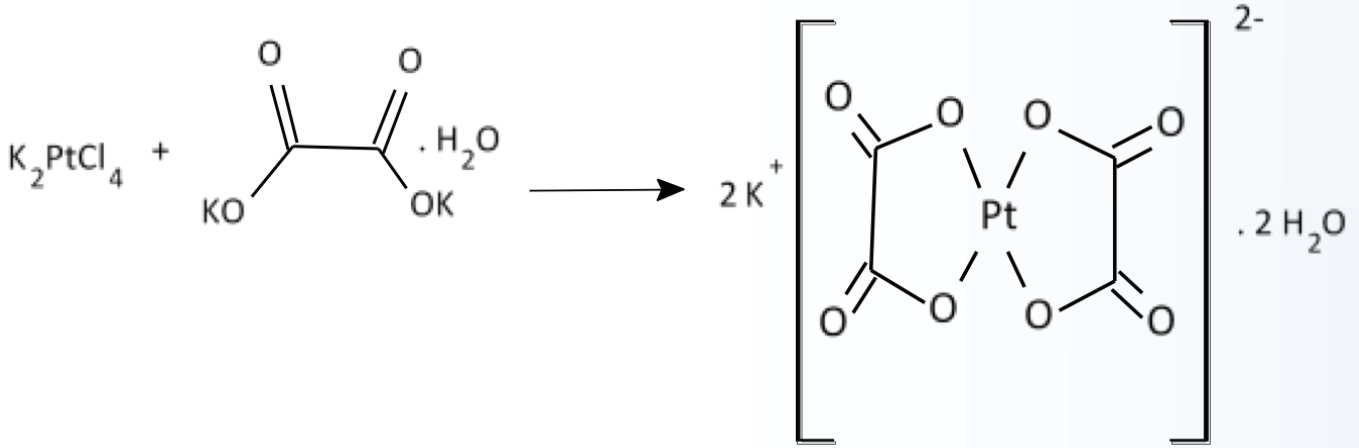
L929, Caco-2 ve H1299 hücreleri içerisinde %10 fetal sığır serumu, 4 µM glutaminli 100 IU/mL penisilin/streptomisin içeren DMEM sıvı besiyerinde ve Caco hücreleri ise %10 fetal sığır serumu, 4 µM glutaminli 100 IU/mL penisilin/streptomisin içeren EMEM besiyerinde inkübe edildi. 96 kuyucuklu hücre kültür pleytlerine her bir kuyucuğa 1.0×10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Test edilecek kompleksler %10'luk DMSO'da çözülerek 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 olmak üzere 7 farklı konsantrasyonu (160, 80, 40, 20, 10, 5 ve 2.5 µM) hücreler üzerine uygulandı. 24 saat 37 °C %5 CO₂'de inkübatörde inkübe edildi. Numunelere ait tüm konsantrasyonlar 3'er tekrarlı olarak uygulandı. %10'luk DMSO çözücü kontrolü olarak; 100 µM konsantrasyondan başlamak üzere 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ve 1.5 µM sisplatin ve oksaliplatin pozitif kontrol olarak ve kontrol (kör) olarak sadece besiyeri kullanıldı. 48 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 50 µl MTT (1 mg/mL) çözeltisi ilave edildi. 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 100 µl izopropanol eklenerek, hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu plate'in absorbans değerleri mikroplate okuyucuda 570 nm'de okutuldu. Kontrol (Kör) grupları baz alınarak % canlılık değerleri hesaplandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sisplatin ve karboplatin, testis ve yumurtalık kanserlerinde oksaliplatin ise kolorektal kanser tedavisinde başarı ile tüm dünyada kullanılan platin(II) kompleksleridir. Klinik kullanımda ilk tercih edilen antikanser ilaçlar olmasına rağmen nefrotoksisite ve ototoksisite gibi kümülatif toksisitelerinin bulunması ve doğal veya tedaviye bağlı direnç gelişimi klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu dezavantajlar, araştırmacıları daha etkili ve daha az yan etki ve direnç gelişmiş kanser hücrelerinde etki göstermesi beklenen alternatif platin kompleksi geliştirme çabalarına yönlendirmiştir [32].

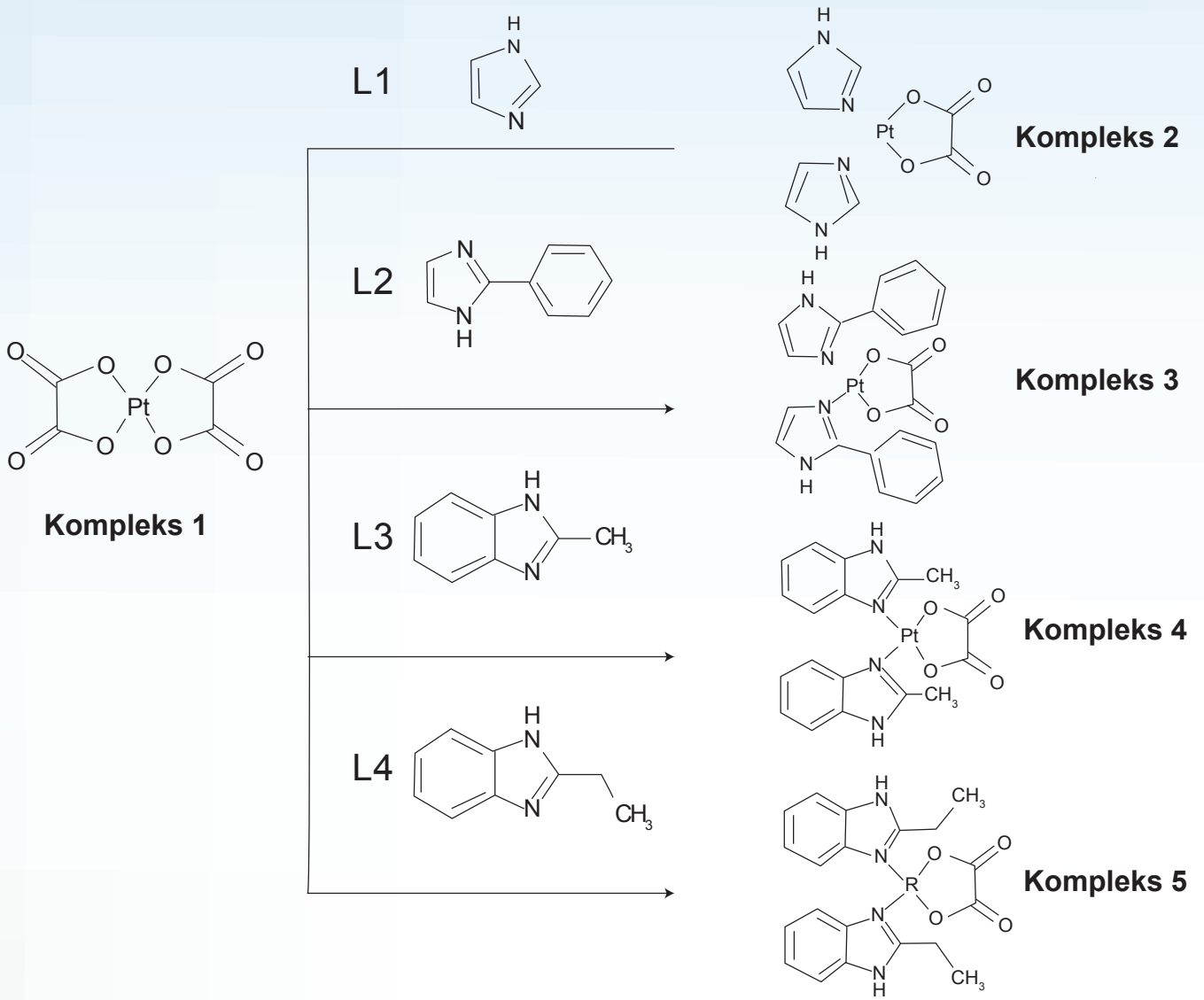
Yapılan literatür taramaları ve çalışma grubumuzun daha önceki araştırma sonuçları [27-28] göz önüne alınarak bu tez çalışmasında dikarboksilat ayrılan ligandına sahip orijinal dört adet platin(II) kompleksi bileşik tasarlanarak sentezlenmiştir. Taşıyıcı ligand olarak, organizmanın tanıdığı ve DNA yapısında bulunan bazlara biyoizoster olarak benzeyen, imidazol (L1), 2-fenilimidazol (L2), 2-metilbenzimidazol (L3) ve 2-etilbenzimidazol (L4) kullanılmıştır. Sentez edilen orijinal **Kompleks 2-5**'in kimyasal yapısı elementel analiz, FT-IR ve ¹H-NMR spektrumları ile aydınlatılmıştır.

K₂PtCl₄'ün (10 mmol) 70°C'deki 40 ml sulu çözeltisine, potasyumoksalat monohidrat ilave edilerek literatüre kayıtlı olan **Kompleks 1** sentezlenmiştir. **Kompleks 1**'in sentez şeması Şekil 5.1'de verilmiş olup yapısı IR verileri ve fiziksel özellikleri literatür verileri karşılaştırılarak aydınlatılmıştır [33]. Sarı renkli ve iğnecik kristal şeklinde olan **Kompleks 1**, 3559-3476 cm⁻¹ de yapısında bulunan H₂O meleküne ait OH gerilimleri ve 565 cm⁻¹ de Pt-O gerilimi IR spektrumunda gözlenmiştir. Elde edilen spektral veriler ve fiziksel özellikler literatür verileri ile uyumludur.



Şekil 5 Potasyum di(oksalato)platinum(II) dihidrat'ın sentez şeması

L1-L4'ün etanol/isopropanol içindeki çözeltisine **Kompleks 1**'in sulu çözeltisinin ilavesi ile **Kompleks 2**, **Kompleks 3**, **Kompleks 4** ve **Kompleks 5** sentezlenmiştir (Şekil 6.).



Şekil 6 Kompleks 2-5'in sentez şeması

Kompleks 2-5'in kimyasal yapılarını aydınlatmak için elementel analiz verilerinden, FT-IR ve ^1H NMR spektrumlarından yararlanılmıştır. Yapı aydınlatma çalışmalarında L1 ve L2 ayrıca Phillips yöntemi ile sentezlenen L3 ve L4'ün FT-IR ve ^1H NMR spektrumları, **Kompleks 2-5**'in aynı şartlarda alınan FT-IR ve ^1H NMR spektrumları karşılaştırılarak incelenmiştir. **Kompleks 2-5**'in kimyasal yapısı; kompleksleşme ile taşıyıcı ligandın yapısında bulunan karakteristik gruplara ait piklerdeki kayma ve değişiklikler belirlenerek ve komplekslerin elementel analiz verileri ile desteklenmiştir.

Kompleks 2-5'e ait elementel analiz verileri L1-L4'ün tek dişli ligand özelliği göstererek **Kompleks 1** ile 1:2 metal:ligand oranında reaksiyona girdiğini kanıtlamıştır. Tek dişli ligand özelliği gösteren L1-L4'ün, platin atomuna piridin azotu üzerinden koordine kovalan bağ ile bağlanmıştır. İmidazol ve benzimidazol halka sisteminde N1 azotu olarak adlandırılan pirol azot atomunun ortaklanmamış elektron çiftleri aromatikliği sağlamak için halka ile delokalize olur. N3 azotu olarak adlandırılan piridin azotunun ortaklanmamış elektron çiftleri ise halkalara bazik özellik kazandırır ve platin atomu ile kelat bağını oluşturur [29, 34, 35].

Genel olarak, kompleksleşmeye bağlı olarak **Kompleks 2-5**'in aromatik ve alifatik protonlarına ait pikler, L1-L4'e göre daha düşük alana kaymıştır. L1 ligandına ait 7.69 (s, 1H) ve 7.05 (s, 2H) protonları, **Kompleks 2**'nin ^1H NMR spektrumunda 8.06 (s, 2H), 7.32 (s, 2H) ve 6.93 (s, 2H) olarak tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında sentez edilen oksalat ayrılan ligandına sahip **Kompleks 2-5**'in sitotoksik aktiviteleri H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri), Caco-2 (insan adenokarsinom) ve L929 (fare fibroblast) hücre hatlarına karşı MTT yöntemi ile test edilmiştir. **Kompleks 2-5**'in 160-2.5 μM , sisplatin ve oksaliplatinin 100-1.5 μM arasındaki azalan konsantrasyonlarının test edilen hücre hatlarına karşı sitotoksik etki değerleri Tablo 4.1 ve IC_{50} değerleri Tablo 4.2'de verilmektedir.

IC₅₀ değerlerine göre 2-etilbenzimidazol ligandına sahip **Kompleks 5** H1299 ve Caco-2 hücre hattına karşı ve 2-fenilimidazol ligandına sahip **Kompleks 3** ise L-929 hücre hattına karşı sırasıyla 101.24, 270.36 ve 139.49 µM konsantrasyonlarda en aktif kompleksler olarak bulunmuştur.

L1 ve L2 taşıyıcı ligandına sahip **Kompleks 2** ve **Kompleks 3** ile L3 ve L4 taşıyıcı ligandına sahip **Kompleks 4** ve **Kompleks 5** kendi aralarında IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında 2 numaralı konumda süstitüsyon olması veya süstitüsyon büyüklüğünün artması sitotoksik etkiyi artırmıştır. H1299 ve Caco-2 hücre hatlarına karşı 2-etilbenzimidazole sahip Kompleks 5 diğer kompleksler ile karşılaştırıldığında en etkili kompleks olarak bulunmuştur. Genel olarak 2-süstitübenzimidazol ligandına sahip kompleksler daha etkili bulunmuşlardır.

MTT test sonuçlarına göre test edilen komplekslerin IC₅₀ değerleri sisplatin ve oksaliplatin ile karşılaştırıldığında daha az etkili olduğu görülmektedir (Tablo 1.). Dikarboksilat ayrılan ligandı taşıyan Pt(II) kompleksleri sentezlenerek farklı hücre hatlarına karşı sitotoksik etkileri araştırmacılar tarafından test edilmiştir. Bu çalışmalarda taşıyıcı ligandların taşıdığı süstitüentlere göre hücre içerisine alımda farklılıklar gözlemlendiği bildirilmektedir. Hacimli süstitüentlerin getirilmesi ile sitotoksik etkinin arttığı bildirilmektedir. Bu tez çalışmasında sentezlediğimiz komplekslerin 2 numaralı konumlarında etil ve fenil süstitüenti taşıyan **Kompleks 3** ve **Kompleks 5** etkili bileşikler olarak test edilmiştir. Elde edilen veriler literatür ile uyumludur [36,37].

Tablo 1. Kompleks 2-5, sisplatin ve oksaliplatinin L929 (fare fibroblast) ve H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) ve Caco-2 (insan adenokarsinom) hücre hatlarında IC₅₀ değeri (µM).

Kompleks No	IC ₅₀ (µM)		
	H1299	Caco-2	L-929
2 [Pt(L1) ₂ oksalat]	168.84 ± 9.87	281.25 ± 4.37	192.90 ± 5.03
3 [Pt(L2) ₂ oksalat]	132.31 ± 8.89	273.75 ± 5.79	139.49 ± 6.14
4 [Pt(L3) ₂ oksalat]	110.48 ± 5.42	286.95 ± 7.14	157.78 ± 3.67
5 [Pt(L4) ₂ oksalat]	101.24 ± 6.47	270.36 ± 9.94	145.43 ± 7.48
Sisplatin	50.97 ± 7.55	64.51 ± 14.32	63.66 ± 9.37
Oksaliplatin	27.21 ± 12.78	53.58 ± 6.47	57.04 ± 5.36

SONUÇLAR

Tez çalışmamızda, literatür verileri ve daha önce yaptığımız çalışmaların sonuçları değerlendirilerek imidazol (L1), 2-fenilimidazol (L2), 2-metilbenzimidazol (L3) ve 2-etilbenzimidazol (L4) oksaliplatin ve sispaltin komplekslerindeki 1,2-diaminosikloheksan ve amanyok ligandları yerine vücudun tanıdığı iki ayrı heteroaromatik halka sistemi olarak seçilmiştir. Sispaltinde görülen yan etkilerin, karboplatin ve oksaliplatinde daha az görülmesi nedeni ile ayrılan ligand olarak oksalat seçilerek dört adet yeni Pt(II) kompleksi (**Kompleks 2-5**) tasarlanarak sentezlenmiştir.

[Pt(L1)₂(oksalat)], 0.5H₂O, [Pt(L2)(oksalat)], [Pt(L3)₂(oksalat)], [Pt(L4)₂(oksalat)]. H₂O kapalı formüllerine sahip **Kompleks 2-5** uygun ligand ve [Pt(oksalat)₂].2H₂O kapalı formülüne sahip **Kompleks 1**'den hareketle sentez edilerek kimyasal yapıları aydınlatılmıştır.

Sentez edilen komplekslerin sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile H1299 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri), Caco-2 (İnsan adenokarsinom) ve L929 (fare fibroblast) hücre hatlarına karşı test edilmiştir Sispaltin ve oksaliplatin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Test edilen kompleksler içerisinde 2-etilbenzimidazol ve 2-fenilimidazol taşıyıcı ligandına sahip Kompleks 5 ve 3 sırasıyla H1299 (101.24, 132.31 µM), Caco-2 (270.36 ve 273.75 µM) ve L929 (145.43 ve 139.49 µM) karşı en aktif kompleks olarak bulunmuştur.

KAYNAKÇA

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clinic*. 2021; 71(3): 209-249.
- [2] Kayaalp SO. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 1998;1(8):1007-1072
- [3] Gilman A, Goodman LS. *Chemotherapy of Neoplastic Diseases. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1991;8:1240-1306.
- [4] Diamond E, Molina AM, Carbonaro M, Akhtar NH, Giannakakou P, Tagawa ST, Nanus DM. Cytotoxic chemotherapy in the treatment of advanced renal cell carcinoma in the era of targeted therapy. *Critical Rev Oncol/Hematol*. 2015;96:518-526.
- [5] Peyrone M. Über die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorid. *Annalen der Chemie und Pharmacie und Pharmacie*. 1844;L1:1-29.
- [6] Rosenberg BVAN, Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965;(205):698-699.
- [7] Reed E. Cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin, in: B.A. Chabner, D.L. Longo (Eds.), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*. 4th edition; Principles and Practice, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia. 2006;332-343.
- [8] Wang D, Lippard SJ. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-20.
- [9] Dugbartey GJ, Peppone LJ, Graaf IAM. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicol*. 2016;371:58-66.
- [10] Amble L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmaceutical Res*. 2016;106: 27-36.
- [11] Fanelli M, Formica M, Fusi V, Giorgi L, Micheloni M. New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coord Chem Rev*. 2016;310:41-79.
- [12] Zhang J, Liu D, Li Y, Sun J, Wang L, Zang A. Status of non-classical mononuclear platinum anticancer drug development. *Mini Rev Med Chem*. 2009;9:1357-1366.

- [13] Ho GY, Woodward N, Coward JIG. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Critical Rev Oncol/Hemat.* 2016;102:37-46.
- [14] Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RHJ, Wiemer EAC. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat.* 2011;14:22-34.
- [15] Perego P, Robert J. Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer Chemother and Pharmacol.* 2016;77(1):5-18.
- [16] Saeed A. Kinetic aspects of platinum anticancer agents. *Polyhedron.* 2017;138:109-127.
- [17] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug Author links open overlay panel. *Bioorg Chem.* 2019;88:102925.
- [18] Iakovidis A, Hadjiliadis N. Complexes compound of platinum(II) and (IV) with amino acids, peptides and their derivatives. *Coord Chem Rev.* 1994;135/136:17-63.
- [19] Sundberg R, Martin RB. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. *Chem Rev.* 1974;74: 471.
- [20] Zivkovic MD, Rajkovic S, Djuran MI. Reaction of [Pt(Gly-Gly-N,N',O)]⁻ with the N-acetylate dipeptide L-methionyl-L-histidine: selective platination of the histidine side chain by intramolecular migration of the platinum (II) complex. *Bioorg Chem.* 2008;36:161-164.
- [21] Szulmanowicz MS, Zawartka W, Gniewek A, Trzeciak AM. Structure, Dynamics and catalytic activity of palladium (II) complexes with imidazole ligands. *Inorg Chim Acta.* 2010;363:4346-4354.
- [22] Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. Biological importance of imidazole nucleus in the new millennium. *Med Chem Res.* 2011;20:1119-1140.
- [23] Boğatarkan Ç. İmidazol Türevi Platin Komplekslerinin Sentezlenmesi ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2014, Mersin.
- [24] Salahuddin Shaharyar M, Mazumder A. Benzimidazoles: A biologically active compounds Author links open overlay panel. *Arabian J Chem.* 2017;10:157-173.
- [25] Nzeyimana A. Benzimidazol Türevi Platin Komplekslerinin Sentezlenmesi ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2016, Mersin.
- [26] Imran A, Mohammad NL, Haasan YA. Imidazoles as potential anticancer agents. *Med Chem Commun* 2017;8:1742-1773.
- [27] Gümüş F, İzgü F, Algül Ö. Synthesis and structural characterization of some 5(6)-substituted-2-hydroxymethylbenzimidazole derivatives and their platinum (II) complexes and determination of their in vitro antitumor activities by "rec-assay test". *Fabad J Pharm Sci.* 1996;(21):7-15.
- [28] Utku S, Eryiğit Ö. Platin (II) Kompleksi Sentez ve Biyolojik Aktivitesi Üzerinde Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2019, Mersin.
- [29] Grimmett MR. Advances in imidazole chemistry. *Heterocycl Chem.* 1970;(12):103-183.
- [30] Phillips MA. The Formation of 2-Substituted Benzimidazole. *J Chem Soc.* 1928;23932399.
- [31] International Standard, Biological evaluation of medical devices- Part 5 Test for in vitro cytotoxicity, <http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf> (15.04.2019).

[32] Mansouri-Torshizi H, Zareian-Jahromi S, Ghahghaei A, Shahraki S, Khosravi F, Majd MH. Palladium(II) complexes of biorelevant ligands. Synthesis, structures, cytotoxicity and rich DNA/ HSA interaction studies. J Biomol Struct Dynamic. 2018;36:2787-2806.

[33] Starha P, Zdenek T, Igor P. Platinum(II) oxalato complexes with adenine-based carrier ligands showing significant in vitro antitumor activity. Inorg Biochem. 2010;104:639-647.

[34] Manocha P, Wakode SR, Kaur A, Anand K, Kumar H. A review: Imidazole synthesis and its biological activities. Int J Pharm Sci Res. 2016;1(7):12-16.

[35] Wright JB. The chemistry of benzimidazoles. Chem Rev. 1951;48(3):397-541.

[36] Spingler B, Whittington DA, Lippard SJ. Å Crystal Structure of an Oxaliplatin 1,2-d(GpG) Intrastrand Cross-Link in a DNA Dodecamer Duplex. Inorg Chem. 2001;40:5596-5602

[37] Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. Metallomics. 2009;1(4):280-91.

TEŞEKKÜR

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2018-1-TP2-2783 numaralı proje ile desteklenmiştir.

PLATİN(II) KOMPLEKSLERİNİN SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

P13

Özge ERYİĞİT¹, Nebahat Aytuna ÇERÇİ², Betül AYDIN³, Leyla AÇIK³, Semra UTKU¹

¹Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 33169 Mersin.

²Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, 71450 Kırıkkale.

³Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 06500 Ankara.

(e-posta: omdn33@gmail.com)

GİRİŞ

Anormal bir biçimde çoğalan hücrenin kaynağına, tipine ve oluştuğu organa göre kanserin çok çeşitli türleri vardır. Sağlıklı hücrelerde bölünme ve çoğalma kontrollü bir şekilde gerçekleşirken bazı hücrelerde genlerde oluşan mutasyon nedeniyle anormal bölünme ve çoğalma gözlenmektedir. Bu kontrolsüz çoğalmalar sonucunda doku ve organlarda tümör adı verilen kitleler meydana gelmektedir [1].

Kanser hastalarının tedavisinde çeşitli yöntemler uygulanır. Bunlardan biri olan kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak, hatta tümör hücrelerini yok etmektir. Ancak hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların terapötik indekslerinin dar olmasından dolayı toksik etkileri çok fazladır. Özellikle bölünerek çoğalma özelliği fazla olan kan hücreleri ve gastrointestinal sistem organ hücrelerine ve çok kanlanan organ hücrelerine yan etkileri fazladır [1].

Kanser tedavisinde kullanılan platin içeren koordinasyon bileşiği olan sisplatin (cis-diamminodikloroplatin(II)), ilk kez 1844 yılında Michael Peyrone tarafından sentezlenmiştir [2]. Rosenberg ve ark. [3] tarafından 1965 yılında yapılan bir çalışmada, elektriksel alanın yaşayan hücreler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla periyodik sistemin VIII B grubu geçiş metallerinin, E. coli'nin hücre gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmış ve platin elektrotta oluşan maddenin yapısının cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] olduğu ve E. Coli'nin hücre bölünmesini inhibe ettiği saptanmıştır. 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan ilk platin kompleksi olan sisplatin, testis ve ovaryum kanserlerine karşı etkili bir kemoterapötik ilaç olarak kullanılmaya başlanmıştır [4-6].

Sisplatinin, kanser tedavisinde tek başına kullanılmasının yanında radyoterapi ve diğer kemoterapötikler ile birlikte de kullanılmaktadır. Erken teşhis edilmiş testis kanserinin tedavisinde yaklaşık %90-95 tedavi başarısı sağlayan sisplatin, başta ovaryum kanseri olmak üzere diğer solid tümörlerin tedavisinde de kullanılan antikanser ilaçtır [7, 8].

Sisplatin kullanılan hastalarda toksik etkilerin görülmesi ve bazı kanser türlerinin sisplatine karşı doğal direnç geliştirmiş olması ile bazı kanser türlerinde de ilk kullanımdan sonra direnç gelişmesi araştırmacıları yeni platin kompleksleri geliştirmeye yönlendirmiştir [9, 10]. Araştırmacıların yeni tasarladıkları platin komplekslerinin, sisplatine karşı rezistans gelişen kanser türlerine karşı etkili olması beklenmektedir. Ayrıca sisplatin kullanan hastalarda görülen nefrotoksisite, kemik iliği depresyonu, mide bulantısı, kusma, periferik nöropati, sağırılık, ani nöbetler ve körlük gibi yan etkilerin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır [11].

Sisplatin intravenöz olarak klinikte kullanılmaktadır. Vücuda alındıktan sonra oluşan reaktif türevleri başlıca DNA'nın guanin bazının yedi numaralı azot atomuna bağlanarak antikanser etki gösterdiği bilinmektedir [12]. Terapötik etkinliği DNA'ya bağlanma yeteneğine bağlı olan sisplatinin yapısında yer alan taşıyıcı amonyak ligandları peptid, glukozamin veya heterosiklik amin grupları ile yer değiştirilerek yeni Pt(II) kompleksleri sentezlenmiştir [13, 14]. Komplekslerin, taşıyıcı ligandlarının organizma tarafından tanınan ve yapısında barındırdığı doğal maddeler olması nedeniyle, hücreler tarafından tanınması sayesinde daha etkili oldukları gözlenmektedir [15].

İmidazol heteroaromatik halka sistemi biyolojik sistemde histamin ve histidin amino asiti, çeşitli metalloproteinler, demir-hem sistemi ve vitamin B12 türevlerinin yapısında bulunmaktadır [16]. Ayrıca biyolojik sistemlerin en önemli metal bağlanma bölgelerinde yer alan histidin amino asit parçası, birçok enzimin aktif merkez bölgesini oluşturmaktadır [14, 17]. Düşük toksisite, yüksek stabilite, metaller ile güçlü bağlanma, elektronik ve sterik özellikleri nedeni ile imidazol halkası medikal kimyacılar için önem taşımaktadır [18]. İnsan vücudunun tanıdığı biyolojik olarak aktif olan heterosiklikimidazol halkasının değişik farmakolojik aktiviteleri bulunan ilaçlar günümüzde tedavide kullanılmaktadır [19, 20].

Bu çalışmada cisplatin yapısındaki amonyak ligandlarının, organizmanın tanıdığı ve ligand özelliği gösteren 1-süstitüimidazol taşıyıcı ligandına sahip kapalı formülü $[PtL_2Cl_2]$ veya $[PtL_2I_2]$ olan (L=1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol, 1-benzil-1H-imidazol veya 1-fenil-1H-imidazol) olan orijinal altı adet Pt(II) kompleksi tasarlanarak sentezlenmiştir. Sentez edilen Kompleks 1-6'nın kimyasal yapısı elementel analiz, Fourier Transform İnfrared (FT-IR) ve 1H Nükleer Magnetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ile aydınlatılmıştır.

Komplekslerin, DNA ile etkileşimlerinin agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılarak pBR322 plazmid DNA iplikçığı ile etkileşmesi ve BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz kesim enzimleriyle bağlanma bölgesinin yeri tespit edilmiştir. Ayrıca, fare fibroblast hücreleri (L929), adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreleri (A549) ve insan kolon adenokarsinom (CaCo-2) hücrelerine karşı sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile test edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Sentez çalışmalarında kullanılan ligandlar ve çözücüler analitik niteliktedir (Merck veya Aldrich). Platin(II) komplekslerinin sentezinde; 1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol, 1-benzil-1H-imidazol, 1-fenil-1H-imidazol, potasyum tetrakloroplatinat, potasyum iyodür, etanol, metanol, kloroform, eter, hidroklorik asit ve distile su kullanıldı.

Sisplatin, pBR322 plasmit DNA, BamHI ve HindIII endonükleaz enzimleri agaroz ve etidyum bromür Sigma'dan temin edilmiştir. Tris asetat (TAE) tamponu (0.05 M tris bazı, 0.05 M glacial asetik asit, 1 mM EDTA, pH:8), yükleme tamponu (% 40 sukroz, % 0.025 bromfenol mavisi, % 0.25 ksilensiyanol), etidyum bromür (0.5 $\mu g/ml$), tris çözeltisi (500 mM tris, pH: 8.0), EDTA tamponu (500 mM EDTA (etilendiamin-tetra asetik disodyum tuzu, 5M NaOH, pH: 8.0), TE tamponu (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA pH:7.4) agaroz jel elektroforez çalışmasında kullanılmıştır.

L929 (Fare fibroblast, An2 Mouse C3; Şap Enstitüsü), A549 (küçük hücreli akciğer kanseri, ATCC CCL185) ve CaCo-2 (An1/İnsan adenokarsinomu; Şap Enstitüsü) hücre hatları kullanılmıştır. Sitotoksisite deneyinde kimyasal madde ve malzeme olarak DMSO (Amresco/200-664-3), PBS (Bioshop/PBS415.1), izopropanol (Sigma Aldrich 67-63-O), L-glutamin (Wisent Bioproducts/609-065-EL), fetal sığır serumu (Biological Industres, USA/04-007-13), Tripsin/EDTA (Biological Industres, USA/03-053-1B), Dulbecco's modified Eagle medium hücre besi yeri (DMEM, Biological Industres, USA/01-050-1A), EMEM hücre besi yeri (Lonza, BE12-611F), %1 Penisilin/streptomisin (Penisilin 10000 units/mL Streptomisin 10mg/mL/Biological Industres, USA /03-031-1C), 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti (SPL Lfe Science), karbondioksitli inkübatör (Binder), mikroyok okuyucu (Biotek- PowerWave XS2) kullanılmıştır.

Yöntem

Sentez

Dikloro-di(1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol)Platin(II) (Kompleks 1), dikloro-di(1-benzil-1H-imidazol)Platin(II) (Kompleks 3) ve dikloro-di(1-fenil-1H-imidazol)Platin(II) (Kompleks 5) Komplekslerinin Sentezi

1.5 mmol taşıyıcı ligand 1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol, 1-benzil-1H-imidazol veya 1-fenil-1H-imidazol 5 mL 0.5 N HCl içerisinde ve 0.8 mmol potasyum tetrakloroplatinat 2 mL 0.5 N HCl içerisinde çözüldü. Taşıyıcı ligand çözeltisi potasyum tetrakloroplatinat üzerine 30 dakikada damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı ilk gün oda ısısında, daha sonra su banyosu içinde 40-50°C'ye kadar ısıtılarak 5-7 gün magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. İTK kontrolleri ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldıktan sonra oluşan çökelek süzülerek ayrıldı. Bu çökelek sırayla soğuk distile su, soğuk etanol ve eter ile yıkanarak temizlendi ve vakum etüvünde kurutuldu. İTK çalışmalarında kullanılan hazır plaklar, kloroform:metanol (80:20) ve kloroform:metanol (90:10) sistemlerinde sürüklendi, lekelerin belirlenmesinde UV ışığı ve dragendorff belirteci kullanıldı.

Diiodo-di(1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol)Platin(II) (Kompleks 2), diiodo-di(1-benzil-1H-imidazol)Platin(II) (Kompleks 4) ve diiodo-di(1-fenil-1H-imidazol)Platin(II) (Kompleks 6) Komplekslerinin Sentezi

2.4 mmol potasyum iyodür ve 0.6 mmol potasyum tetrakloroplatinatın 10 mL suda çözülerek hazırlanan çözeltisininin 30 dakika oda ısısında daha sonra 60°C'lik su banyosunda 45 dakika boyunca ısıtılması ile potasyum tetraiyodat bileşiği elde edildi.

Oluşan potasyum tetraiyodat bileşiği üzerine 1 mL etanolde çözülmüş 1 mmol taşıyıcı-ligand olarak 1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol, 1-benzil-1H-imidazol veya 1-fenil-1H-imidazol, 30 dakikada damla damla ilave edildi. Reaksiyon karışımı su banyosu içinde 40°C'ye kadar ısıtılarak 2 gün magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. İTK kontrolleri ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı ve oluşan çökelek süzülerek ayrıldı. Bu çökelek sırayla soğuk distile su, soğuk etanol ve eter ile yıkanarak temizlendi ve vakum etüvünde kurutuldu. İTK çalışmalarında hazır plaklar, kloroform:metanol (80:20) ve (90:10) solvan sisteminde sürüklendi. Lekelerin belirlenmesinde UV ışığı ve dragendorff belirteci kullanıldı.

Agaroz Jel Elektroforez Çalışması

Sentezlenen **Kompleks 1-6** ve sisplatinin, pBR322 plazmid DNA ile etkileşimleri, BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi agaroz jel elektroforez yöntemi ile araştırılmıştır [21]. Toz haldeki agaroz %1 (w/v) konsantrasyonda olacak şekilde TAE tampon çözeltisi ile karıştırılıp kaynatıldıktan sonra tanka dökülmüştür. Çözücü olarak dimetilformamit (DMF) kullanılmıştır. DMF ile platin (II) komplekslerinin zamanla ligand değişim reaksiyonu verebilme ihtimaline karşı, bileşiklerin stok çözeltileri kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerde çözücü olarak kullanılan DMF oranı % 0.1'i geçmemiştir. **Kompleks 1-6** ve sisplatinin 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM konsantrasyonda olacak şekilde DMF/TE içerisinde hazırlanan farklı derişimlerdeki çözeltisi pBR322 plazmid DNA (0.5µg/ml) ile 37°C'de 24 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kompleks-DNA çözeltisi ve yükleme tampon ile birlikte %1'lik agaroz jel üzerindeki kuyucuklara uygulanmıştır. Elektroforez işlemi TAE tampon çözeltisinde 70 V'da 2 saat süre ile doğru akımda yürütülmüştür. Kontrol olarak ise kompleks ile muamele edilmemiş pBR322 plazmit DNA'sı jeldeki birinci kuyucuğa ilave edilmiştir. Süre sonunda jel etidium bromür içerisinde birkaç dakika boyanarak kısa dalga boylu UV ışığı altında BioDocAnalyze (BioDoc Analyzer, Biometra) görüntüleme cihazında görüntülemiş ve bilgisayar ortamında fotoğrafları alınmış ve TIFF olarak kaydedilmiştir.

Kompleks 1-6 ve sisplatinin plazmid DNA'da guanin-guanin (G/G) ve/veya adenin-adenin(A/A) bazlarına olan afiniteleri BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzimleri ile belirlenmiştir. BamHI ve HindIII enzimleri ile restriksiyon endonükleaz reaksiyonu yapılırken, 24 saat inkübasyona bırakılmış bileşik-DNA karışımından 8 µl alınarak 1 µl enzim (0.1 U), 1 µl tampon (10X) ile karıştırılıp 1 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra %1'lik agaroz jele yüklenmiştir ve elektroforez işlemi TAE içerisinde 70V akım ile 1 saat gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrasında jel etidyum bromür (0.5 µg/mL) ile boyanarak BioDocAnalyze jel görüntüleme cihazı ile ultraviyole ışık altında görüntülenmiş ve görüntüler TIFF formatında kaydedilmiştir.

Sitotoksik Aktivite Çalışması

Kompleks 1-6 ve siplatinin sitotoksik etkisini test etmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür (MTT) yöntemi kullanıldı. MTT testi ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde yapıldı [22].

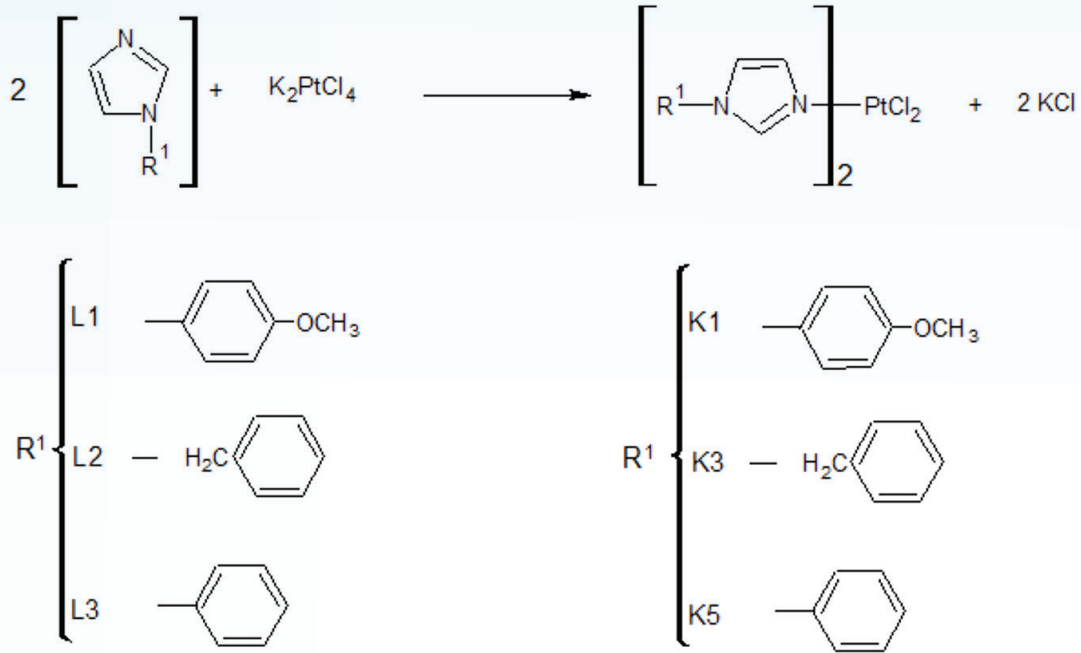
L929 ve A549 hücreleri içerisinde %10 fetal siğir serumu, 4 µM glutaminli 100 IU/mL penisilin/streptomisin içeren DMEM sıvı besi yerinde ve CaCo hücreleri ise %10 fetal siğir serumu, 4 µM glutaminli 100 IU/mL penisilin/streptomisin içeren EMEM besiyerinde inkübe edildi. 96 kuyucuklu hücre kültür pleytlerine her bir kuyucuğa 1.0 x 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Test edilecek kompleksler %10'luk DMSO'da çözümlenerek 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 olmak üzere 5 farklı konsantrasyonu (160, 80, 40, 20 ve 10 µM) hücreler üzerine uygulandı. 24 saat 37 °C %5 CO₂'de inkübatörde inkübe edildi. Numunelere ait tüm konsantrasyonlar 3'er tekrarlı olarak uygulandı. %10'luk DMSO çözücü kontrolü olarak; 100 µM konsantrasyondan başlamak üzere 50 µM, 25 µM, 12,5 µM ve 6,25 µM sisplatin karşılaştırma kontrolü olarak kullanıldı. Kontrol (kör) olarak sadece besiyeri kullanıldı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 50 µl MTT (1 mg/mL) çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 2 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 100 µl izopropanol eklenerek, hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu plate'in absorbans değerleri mikropalte okuyucuda 570 nm'de okutuldu.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Sisplatin yapısındaki taşıyıcı amonyak ligandlarının heterosiklik amin gruplarıyla değiştirilmesiyle sentezlenen platin(II) komplekslerinin antikanser aktivitesinin değişeceği veya rezistans kazanmış kanser hücrelerinde etkili olabileceği literatür taramalarında gösterilmektedir [18-20]. Yapılan literatür taramaları ve çalışma grubumuzun daha önceki araştırma sonuçları [23-45] göz önüne alınarak bu tez çalışmasında orijinal altı adet platin(II) kompleksi bileşik tasarlanarak sentezlenmiştir.

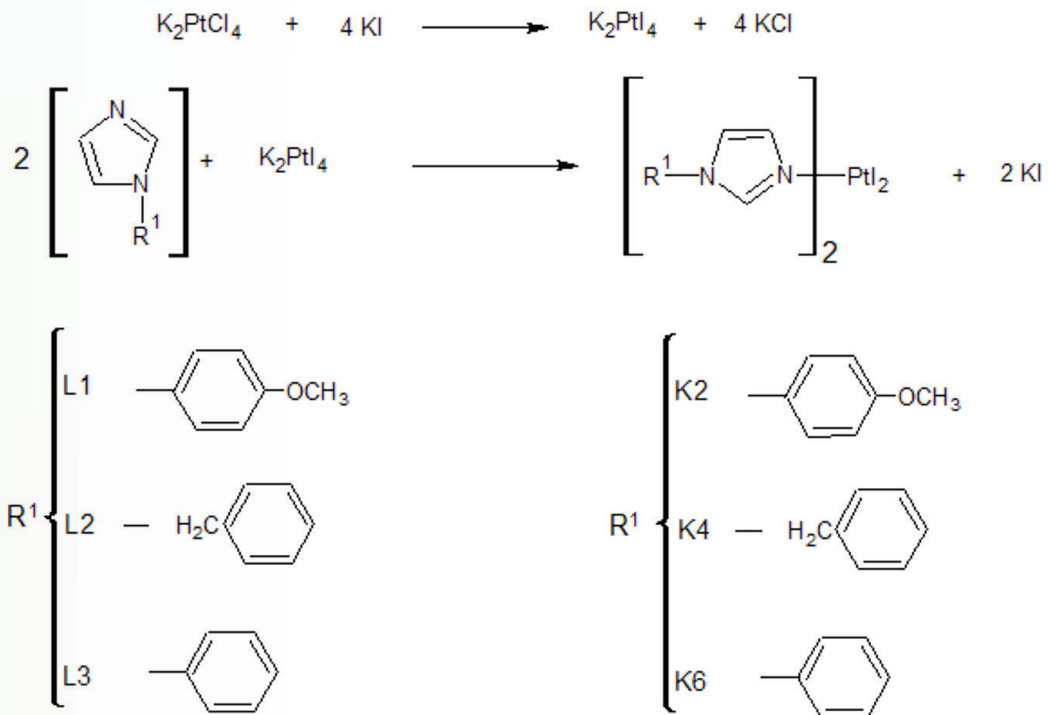
Taşıyıcı ligand olarak; 1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol (L1), 1-benzil-1H-imidazol (L2) ve 1-fenil-1H-imidazol (L3) ve ayrılan ligand olarak klor ve iyot kullanılmıştır. Sentez edilen orijinal Kompleks 1-6'nın yapısı elemental analiz, FT-IR ve 1H-NMR spektrumları ile aydınlatılmıştır.

Sentezlenmek istenilen komplekse göre 0.5 N HCl içerisinde çözülmüş potasyum tetrakloroplataınatın üzerine sırasıyla L1, L2 veya L3'ün 0.5 N HCl içerisinde çözülmüş çözeltilerinin ilavesi ile **Kompleks 1, 3 ve 5** sentez edilmiştir. **Kompleks 1, 3 ve 5**'in sentez şeması Şekil 1'de verilmektedir.



Şekil 1 Kompleks 1, 3 ve 5'in sentez şeması

Kompleks 2, Kompleks 4 ve Kompleks 6, potasyum iyodür ve potasyum tetrakloroplataınatın reaksiyonu ile elde edilen potasyum tetraiyodoplataınat üzerine sırasıyla L1, L2 veya L3 taşıyıcı ligandların etanol içerisindeki çözeltisinin ilavesiyle sentezlenmiş Pt(II) komplekslerdir. **Kompleks 2, 4 ve 6**'nın sentez şeması Şekil 2'de verilmektedir.



Şekil 2 Kompleks 2, 4 ve 6'nın sentez şeması

Sentez edilen **Kompleks 1-6**'nın kimyasal yapılarını aydınlatmak için elementel analiz verilerinden, FT-IR ve ¹H-NMR spektrumlarından yararlanılmıştır. Yapı aydınlatma çalışmalarında taşıyıcı ligandlar ve sentezlenen Pt(II) komplekslerinin, aynı şartlarda alınan FT-IR ve ¹H-NMR spektrumları karşılaştırılarak incelenmiştir. **Kompleks 1-6**'nın yapısı, kompleksleşme ile taşıyıcı-ligandın yapısında bulunan karakteristik gruplara ait piklerdeki kayma ve değişiklikler, taşıyıcı ligandın spektrumları ile kıyaslanarak ve komplekslerin elementel analiz verileri ile desteklenerek belirlenmiştir.

Elementel analiz verileri L1-L3'ün tek dişli ligand özelliği göstererek potasyum tetrakloroplatinat veya potasyum tetraiyodoplatinat ile 1:2 metal:ligand oranında reaksiyona girdiğini kanıtlamıştır. Tek dişli ligand özelliği gösteren imidazol halka sisteminin, 1-süstitüimidazol ligandına N3 atomu üzerinden bağlanmıştır.

Ligand özelliği gösteren imidazol halka sisteminin, 3 numaralı konumdaki azotun taşıdığı ortaklanmamış elektron çifti nedeni ile ligand özelliği gösterdiği ve platin atomuna koordine kovalen bağ ile bağlanarak platin(II) kompleksi olarak yeni kompleksler vereceği bilinmektedir [14-17].

Kare düzlem yapıya sahip Pt(II) kompleksleri, platin metali üzerinde yer alan aynı tür ligandların birbirine olan konumlarına göre cis veya trans izomer oluşturmak üzere kompleksler oluştururlar. cis-Dikloro-Pt(II) komplekslerinin iki adet Pt-Cl titreşim bandı vermesi beklenir. Ancak, iki bandın enerjileri arasındaki farkın küçük olması durumunda ikinci bant omuz şeklinde görünür veya bu bölgede tek bir bant gözlenir [46,47]. Bu çalışmada sentez edilen komplekslerin potasyum tetrakloroplatinattan hareketle elde edilmesi nedeniyle kinetik trans-etkisi teorisine göre cis yapıda olması beklenir [48]. Bu tez çalışmasında sentez edilen komplekslerin FT-IR spektrumları, Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Enstitüsünde kullanılan Perkin Elmer Spectrum FT-IR/NIR Spektrometresinde alınmıştır. Kullanılan cihaz 4000-600 cm⁻¹ aralığında ölçüm yaptığı için Pt-Cl ve Pt-I bandları gözlemlenememiştir.

Sisplatinin klinikte kullanılmaya başlamasının ardından daha az toksik etkileri bulunan platin kompleksleri sentez etme çalışmaları için bazı kimyasal gereklilikler öne sürülmüştür. Platin(II) komplekslerinin yapısında cis pozisyonda iki adet ayrılan ligand ve iki adet taşıyıcı ligandın koordinasyon bileşiminin yapısını oluşturması gerekmektedir. Ayrılan ligand olarak klor yanında iyot, oksalat ve malonat gibi dikarboksilat ligandlarının bulunduğu komplekslerin sentezlendiği literatürde bildirilmektedir [49]. Bu tez çalışmasında klor ve iyot ayrılan ligandlarını sahip orijinal platin (II) kompleksleri sentezlenmiştir.

Kompleks 1-6 diğer organik çözücülerde çözünmediği için ¹H-NMR spektrumları DMSO-d₆ içinde çözülerek alınmıştır. DMSO-d₆ platin türevi komplekslerin yapısında bulunan platin atomuna bağlı klor veya iyot atomu ile yer değiştirecek güçte ligand özelliği olması nedeniyle, zamana bağlı olarak kompleksin yapısını bozduğu göz önünde bulundurularak, bileşiklerin DMSO-d₆ içerisindeki çözeltilerinin, spektrumların alınmasına başlanmadan hemen önce hazırlanması sağlanmıştır. [50, 51].

Platin komplekslerinin kare düzlem yapıya sahip olmaları nedeniyle taşıyıcı ligandı aynı olan [PtL₂Cl₂] ve [PtL₂L₂] yapısındaki komplekslerde platin atomuna bağlı olan iki ligandın çevresi de aynı olacaktır [52, 53]. Bu nedenle, Pt-N bağı etrafında serbest dönüşün engellenmediği durumlarda FT-IR ve ¹H-NMR spektrumlarında aynı taşıyıcı liganda sahip komplekslerin taşıdığı her iki liganda ait piklerinin farklı olması beklenemez.

Genel olarak, kompleksleşmeye bağlı olarak aromatik ve alifatik protonlara ait piklerin ligandlara göre daha düşük alana kaymalarının gözlenmesinin yanında, ¹⁹⁵Pt izotopunun spin-kuant sayısının ½ ve izotop bolluğunun %33 olması nedeniyle ¹⁹⁵Pt-¹H spin-spin eşleşmesi sonucu piklerde yarımaların olduğu görülmektedir.

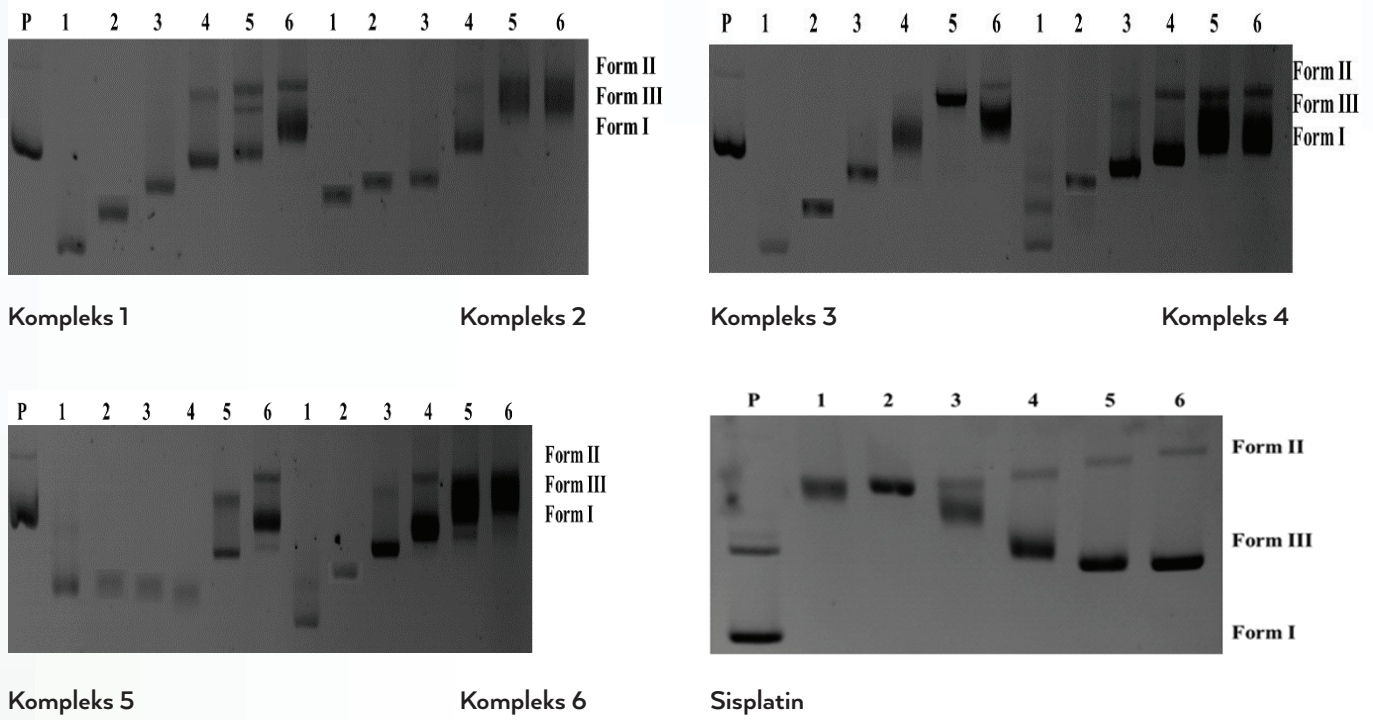
L1, L2 ve L3'e ait imidazol halkasının 2 numaralı konumdaki proton piki 8.13, 7.73 ve 8.27'de görülmektedir. Klor ve iyot ayrılan ligandına sahip aynı taşıyıcı liganda sahip olan Kompleks 1 ve 2'de 8.64 ve 8.86 ppm; Kompleks 3 ve 4'de 8.26 ve 8.37-8.32 ppm; Kompleks 5 ve 6'da ise 8.79-8.72 ve 8.98 ppm' de gözlenmiştir. Kompleksleşmeye bağlı olarak imidazol halkasının 2 numaralı konumundaki protona ait pikin düşük alana kayması diğer aromatik ve alifatik protonlarda da gözlemlenmektedir. Bu durumda literatür verileriyle uyumludur [54-57].

Çözücü olarak kullanılan DMSO-d₆ içerisindeki suya ait δ 3.33 ppm civarında ve kullanılan DMSO-d₆'nın en iyi şartlarda %99.9 oranında döteryum içermesi nedeniyle CD₃SOCD₂H'a ait δ 2.50 ppm de pikler görülmektedir.

Elektroforez işlemi sonucunda pBR322 plazmid DNA'da form I (süper sarmal form), form II (açık dairesel form) ve form III (doğrusal form) olmak üzere üç farklı biçim gözlenmektedir. En yaygın bulunan form süpersarmal form I olup, form II ve form III kimyasal ve fiziksel değişim sonucunda oluşmaktadır. Optimize olmuş koşullarda genellikle form I diğerlerine göre daha hızlı hareket eder ve daha yoğun olarak gözlemlenir [58]. Plazmid DNA'nın iplikçiklerine bağlanma veya kesim sonucu, süper sarmal form gevşeyerek daha yavaş hareket eden form II oluşur. Her iki iplikçik de kesilirse, form I ve form II arasında hareket eden form III meydana gelmektedir [59].

Platin bileşikler DNA'ya kovalan bağlanarak konformasyonda değişikliklere sebep olur. Bu değişikliklerden biri DNA sarmalının çözülmesidir. Süpersarmal form I pBR322 plazmit DNA negatif süpersarmal form I'den form II'ye sonrada pozitif form I'e dönüşür. Bu değişiklik jel üzerinde DNA'nın hareketliliğinde değişimine yol açar [60].

Kompleks 1-6 ve sisplatinin 100-3.125 μM arasında azalan konsantrasyonlarda pBR322 plazmit DNA ile etkileşimi Şekil 3'de görülmektedir. pBR322 plazmit DNA'nın Kompleks 1-6 ve sisplatin ile etkileşime girdiğinde genel olarak hem etkileşime giren (Çizgi 1-6) ve hem de etkileşime girmeyen (P) çizgilerinde form I ve form II plazmid DNA gözlenmiştir.

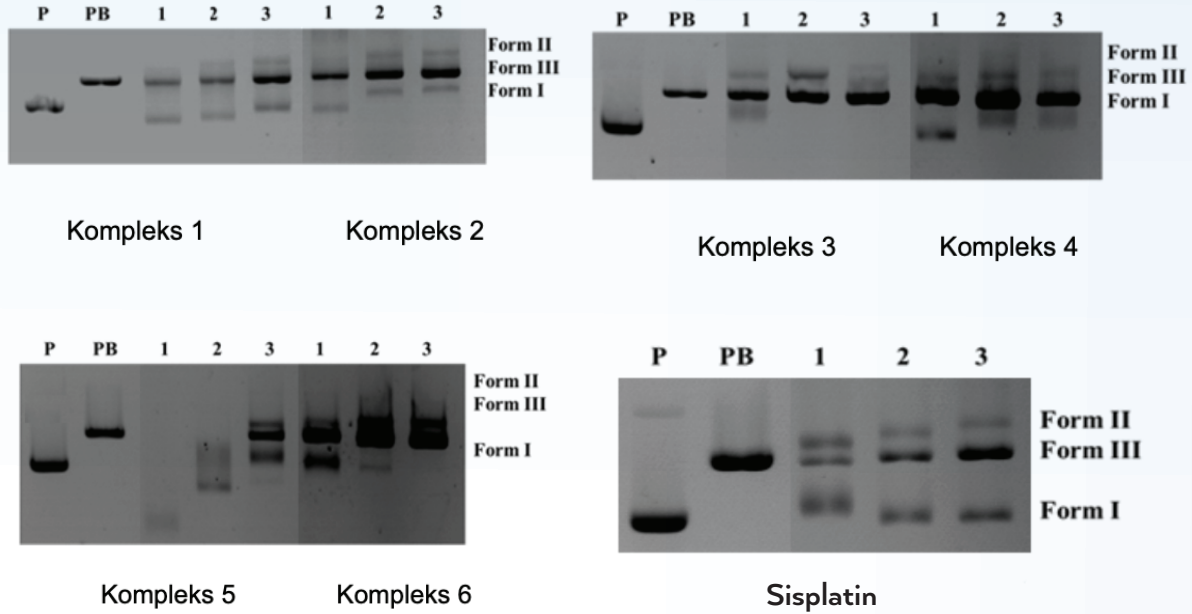


Şekil 3. Kompleks 1-6 ve sisplatinin azalan konsantrasyonda pBR322 plazmit DNA ile etkileşimi. Sisplatin ve Kompleks 1-6 için hazırlanan konsantrasyonlar (μM) sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 için 100, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 μM 'dir. P ise Plazmid DNA'dır. Form I: süpersarmal form; form II: açık halkasal form; form III: doğrusal form.

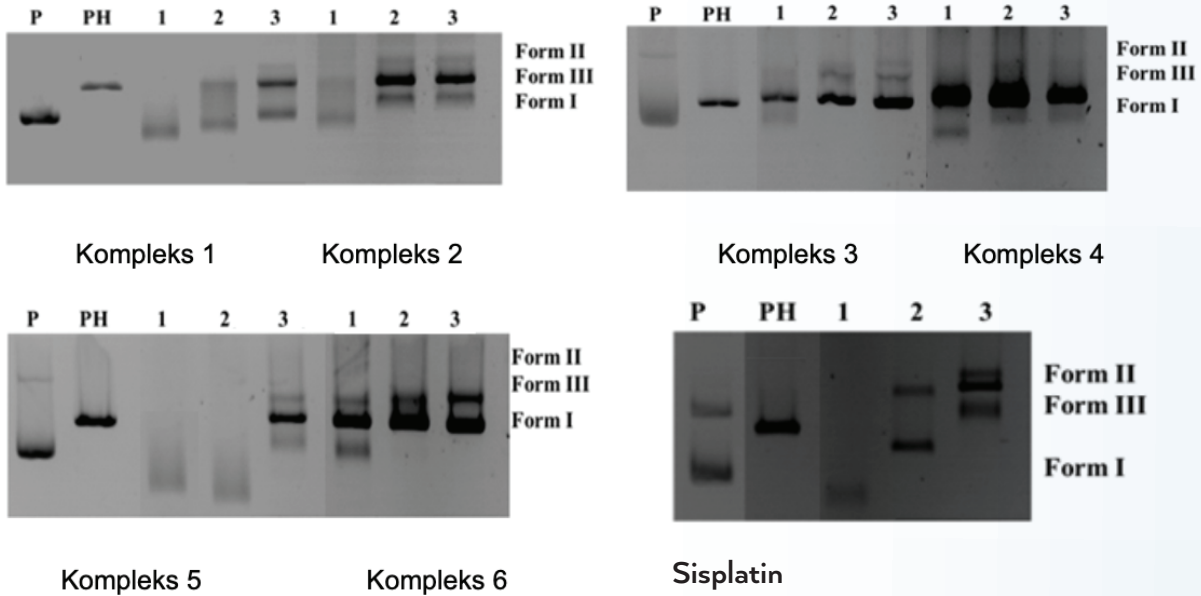
Kompleks 1, 2 ve 6'nın 3.1 μM (şerit 6) form I ve form II bantları arasındaki ayırım en az iken 12.5 ve 6.25 μM (şerit 4 ve 5)'de ayırım artmaktadır. Komplekslerin 100-25 μM konsantrasyonlarda (şerit 1-3) form II'nin form I'e dönüştüğü gösteren hafif bir koelozansband gözlenmiştir. Test edilen komplekslerin konsantrasyonu yükseldikçe, form I plazmid DNA'nın mobilitesi, özellikle **Kompleks 1, 3 ve 6**'da belirgin olarak artmıştır. **Kompleks 4 ve 5**'in, 100 μM (şerit 1) en yüksek konsantrasyonda doğrusal DNA içeren DNA'ya en az zarar verdiği tespit edilmiştir. Sisplatinin 12.5, 6.25 ve 3.1 μM (şerit 4-6) konsantrasyonlarda form I ve form II arasında ayırım en fazla iken 50 μM (şerit 2) konsantrasyonda koelozans nokta tespit edilmiştir.

Sisplatin DNA'ya bağlanarak sitotoksik etki gösterir ve tercihen 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG) zincir içi çapraz bağlanma ve çok az miktarda oluşan 1,3-d(GpXpG) zincir içi çapraz bağlanma DNA'nın yapısında konformasyonel değişiklikler meydana getirir. **Kompleks 1-6** hakkında daha fazla bilgi edinebilmek için guanin-guanin (GG) ve/veya adenin-adenin (AA) bölgelerinden hangisine afinite gösterdiğini tespit etmek için BamHI ve HindIII enzimleri ile kesim yapılmıştır. BamHI ve HindIII enzimleri sırasıyla 5'-G/GATCC-3' ve 5'/AGCTT-3' bölgelerini tanır ve 5'GG ve 5'AA bölgesinden hidroliz eder. Sonuçta form I ve form II DNA'dan doğrusal form III DNA'ya dönüşür.

BamHI ve HindIII ile inkübe edilmiş Kompleks-plazmid DNA ve sisplatinin- plazmid DNA'nın 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M konsantrasyonlarına karşılık gelen elektroforetogramlar Şekil 4. ve Şekil 5'de verilmektedir. Kompleks 1-6 ve sisplatinin artan konsantrasyonlarında BamHI ve HindIII enzimi ile hidrolizinin önlenmesi, DNA'daki 5'GG ve/veya 5'AA nükleotitlerine bağlandığı fikrini desteklemektedir.



Şekil 4. Kompleks 1-6 ve sisplatinin azalan konsantrastonda pBR322 plasmid DNA ile inkübasyonundan sonra BamHI ile kesimi. Sisplatin ve Kompleks 1-6 için hazırlanan konsantrasyonlar (μ M) sırasıyla 1, 2 ve 3 ve için 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M. P: kontrol plasmid DNA; P/B: kontrol plasmid DNA'nın BamHI ile kesimi. Form I: süpersarmal form; form II: açık halkasal form; form III: doğrusal form.



Şekil 5. Kompleks 1-6 ve sisplatinin azalan konsantrastonda pBR322 plasmid DNA ile inkübasyonundan sonra HindIII ile kesimi. Sisplatin ve Kompleks 1-6 için hazırlanan konsantrasyonlar (μ M) sırasıyla 1, 2 ve 3 için 12.5, 6.25 ve 3.125 μ M. P: kontrol plasmid DNA; P/B: kontrol plasmid DNA'nın HindIII ile kesimi. Form I: süpersarmal form; form II: açık halkasal form; form III: doğrusal form.

Bu çalışmada, sentez edilen **Kompleks 1-6**'nın sitotoksik aktiviteleri L929 (fare fibroblast) ve A549 (küçük hücreli akciğer kanseri) ve CaCo-2 (İnsan adenokarsinom) hücre hatlarına karşı MTT yöntemi ile test edilmiştir. **Kompleks 1-6**'nın 160-10 µM ve sislipatinin 100-6.25 µM arasındaki azalan konsantrasyonlarının test edilen hücre hatlarına karşı IC₅₀ değerleri Tablo 1'de verilmektedir. IC₅₀ değerlerine göre 1-fenil-1H-imidazol ligandına sahip **Kompleks 5** A549 ve L929 hücre hattına karşı ve **Kompleks 6** CaCo-2 hücre hattına karşı sırasıyla 81.29, 52.08 ve 56.54 olarak en aktif kompleksler olarak bulunmuştur. Bu kompleksler standart bileşik olarak kullanılan sislipatininden daha etkilidirler. CaCo-2 hücre hattına karşı Kompleks 5 ve 6 hariç, klorlu komplekslerin, iyotlu komplekslerden tüm hücre hatlarında daha aktif olduğu tespit edilmiştir. MTT test sonuçlarına göre test edilen komplekslerin IC₅₀ değerleri sislipatin ile karşılaştırıldığında daha etkili veya yakın etkili olduğu görülmektedir.

Tablo 1. Kompleks 1-6 ve sislipatinin L929 (fare fibroblast) ve A549 (küçük hücreli akciğer kanseri) ve CaCo-2 (insan adenokarsinom) hücre hatları karşı IC₅₀ değeri (µM).

Kompleks No	IC ₅₀ (µM)		
	A549	CaCo-2	L-929
1 [Pt(L1) ₂ Cl ₂]	82.71	80.47	57.61
2 [Pt(L1) ₂ I ₂]	148.04	100.64	82.14
3 [Pt(L2) ₂ Cl ₂]	92.54	78.72	53.76
4 [Pt(L2) ₂ I ₂]	120.02	79.69	58.60
5 [Pt(L2) ₂ Cl ₂]	81.29	72.24	52.08
6 [Pt(L3)2I2]	122.16	56.54	78.66
Sisplatin	115.89	59.29	61.66

Test edilmiş komplekslerden iyot içeren komplekslere göre, ayrılabilen klor ligandı içeren bileşiklerin daha aktif oldukları belirlenmiştir. Sislipatin aktif iken onun iyot türevi inaktif olması, sulu çözeltide Pt-I bağının, Pt-Cl bağından daha dayanıklı olmasından dolayı reaktif türevin oluşmasının daha güç olmasıyla açıklanmıştır [61, 62]. Basola ve ark. [63] yaptığı bir çalışmada ayrılan ligandların göreceli reaktivite sırası NO₃->Cl->Br-> I->SCN-> NO₂-olarak belirtilmiştir. Sonraki araştırmalarda Pt-I bağının hidrolizinin çok uzun süre aldığı ancak kompleksin DNA yerine kükürt içeren sistein ve glutatyon ile etkileştiği ve sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir [64, 65]. Sislipatine alternatif ve farklı bir etki mekanizmasıyla bağlanması bakımından son yıllarda iyot taşıyan Pt(II) ve Pt(IV) komplekslerin de sentezlendiği literatürde gözlenmektedir [61-69].

Platin iyodo kompleksleri uzun yıllardır dünya çapında kullanılan platin bazlı antikanser ilaçlar (sisplatin, karboplatin ve oksaliplatin) da dahil olmak üzere çeşitli platin komplekslerinin sentetik ara ürünleri olarak kabul edilmektedir. Platin iyodo kompleksleri bu nedenle uzun zaman yeni platin bazlı metaloterapötiklerin geliştirilmesi için göz ardı edilmiştir. Son zamanlarda, birkaç araştırma ekibi iyot ayrılan ligandına sahip, umut verici kimyasal, fiziksel ve özellikle biyolojik özellikleri olan çeşitli platin kompleksleri geliştirmiştir. Özellikle, bir dizi platin iyodo kompleksi, kloro analoglarına göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmektedir. Ayrıca, iyodokompleksinin etki mekanizmasının kloro analoglarına göre farklı olduğu görülmektedir [70]. Bu tez çalışmada sentezlenen iyot ayrılan ligandına sahip **Kompleks 2, 4 ve 6**'nın kloro ayrılan ligandına sahip **Kompleks 1, 3 ve 5**'den farklı aktivite sonucu göstermeleri bu bilgileri doğrulamaktadır.

SONUÇLAR

Çalışma grubumuzun daha önce yaptığı çalışma verilerinin değerlendirilmesiyle tasarlanan, 1-(4-metoksifenil)-1H-imidazol, 1-benzil-1H-imidazol ve 1-fenil-1H-imidazol taşıyıcı-ligandlarına sahip Kompleks 1-6 sentezlenerek yapıları aydınlatılmıştır.

pBr322 Plasmid DNA ile etkileşim ve ardından BamHI ve HindIII restriksiyon endonükleaz enzim ile kesimi sonucunda komplekslerin DNA'nın sisplatin gibi 5'GG ve/veya 5'AA nükleotitlerine bağlandığı tespit edilmiştir. Sentez edilen kompleksler içerisinde 1-fenil-1H-imidazol taşıyıcı ligandına sahip kapalı formülü $[Pt(L_3)_2Cl_2]$ **Kompleks 5**'in A549 (küçük hücreli akciğer kanseri) ve L929 (fare fibroblast) en etkili kompleks olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 11.baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.Şti; 2005:317-335.
- [2] Peyrone M. Über die einwirkung des ammoniaks auf platinchlorid. Annalen der Shemie und Pharmacie und Pharmacie. 1844;L1:1-29.
- [3] Rosenberg B, VAN, Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature. 1965;205:698-699.
- [4] Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. Chem. Rev. 1999;99(9),2467-2498.
- [5] Bai L, Gao C, Liu Q, Yu C, Zhang Z, Cai L, Yang B, Qian Y, Yang J, Liao X. Research progress in modern structure of platinum complexes. Eur J Med Chem. 2017;140:349-382.
- [6] Güney S, Güney N, Sönmez NC, Ergenekon E. Risk-adapted management for patients with clinical stage 1 non-seminomatous germ cell tumour of the testis. Med Oncol. 2009; 26(2):136-142.
- [7] Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. Mutation Res. 2001;478(1):1-21.
- [8] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. Eur J Pharm. 2014;740:364-378.
- [9] Amble L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. Pharmaceutical Res. 2016; 106:27-36.
- [10] Dugbartey GJ, Peppone LJ, Graaf IAM. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. Toxicol. 2016; 371:58-66.
- [11] Fanelli M, Formica M, Fusi V, Giorgi L, Micheloni M. New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. Coord Chem Rev. 2016;310:41-79.
- [12] Wexselblatt E, Yavin E, Gibson D. Cellular interactions of platinum drugs. Inorg Chim Acta. 2012;393:75-83.
- [13] Živković MD, Rajković S, Glišić BD, Drašković NS, Djuran MI. Hydrolysis of the amide bond in histidine- and methionine-containing dipeptides promoted by pyrazine and pyridazine palladium(II)-aqua dimers: Comparative study with platinum (II) analogues. Bioorg Chem. 2017;72:190-198.
- [14] Zivkovic MD, Rajkovic S, Djuran MI. Reaction of $[Pt(Gly-Gly-N,N',O)]^-$ with the N-acetylate dipeptide L-methionyl-L-histidine: selective platination of the histidine side chain by intramolecular migration of the platinum (II) complex. Bioorg Chem. 2008;36(3):161-164.
- [15] Trudu F, Amato F, Vanhara P, Pivetta T, Pena-Mendez E M, Havel J. Coordination compounds in cancer: past, present, perspectives. J Appl Biomed. 2015;13:79-103.
- [16] Sundberg R, Martin RB. Interactions of histidine and other imidazole derivatives with transition metal ions in chemical and biological systems. Chem Rev. 1974;74:471.

- [17] Szulmanowicz MS, Zawartka W, Gniewek A, Trzeciak AM. Structure, Dynamics and catalytic activity of palladium (II) complexes with imidazole ligands. *Inorg Chim Acta*. 2010;363(15):4346-4354.
- [18] Narasimhan B, Sharma D, Kumar P. Biological importance of imidazole nucleus in the new millennium. *Med Chem Res*. 2011;20:1119-1140.
- [19] Fan YL, Jin XH, Huang ZP, Yu HF, Zeng ZG, Gao T, Feng LS. Recent advances of imidazole-containing derivatives as anti-tubercular agents. *Eur J Med Chem*. 2018;150:347-365.
- [20] Cossa G, Gatti L, Zunino F, Perego P. Strategies to improve the efficacy of platinum compounds. *Curr Med Chem*. 2009;16:2355-65.
- [21] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York :Cold Spring Harbor; 1989.
- [22] International Standard, Biological evaluation of medical devices- Part 5 Test for in vitro cytotoxicity, <http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>
- [23] Gümüş F, İzgü F, Algül Ö. Synthesis and structural characterization of some 5(6)-substituted-2-hydroxymethylbenzimidazole derivatives and their platinum (II) complexes and determination of their in vitro antitumor activities by "rec-assay test". *Fabad J Pharm Sci*. 1996;21(1):7-15.
- [24] Gümüş F, Algül Ö. DNA Binding studies with cis-dichlorobis (5(6)-non/chlorosubstituted-2-hydroxymethyl-benzimidazole) platinum (II) complexes. *J Inorg Biochem*. 1997;68(1):71-74.
- [25] Gümüş F, Demirci A B, Özden T, Eroğlu H, Diril N. Synthesis, characterization and mutagenicity of new cis-[Pt(2-substitutedbenzimidazole)2Cl₂] complexes. *Die Pharmazie*. 2003;58(5):303-307.
- [26] Gümüş F, Pamuk I, Özden T, Yıldız S, Diril N, Öksüzöğlü E, Gür S, Özkul A. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic, mutagenic and antimicrobial activity of platinum (II) complexes with the substituted benzimidazole ligands. *J Inorg Biochem*. 2003;94(3):255-262.
- [27] Gümüş F, Algül Ö, Eren G, Eroğlu H, Diril N, Gür S, Özkul A. Synthesis, cytotoxic activity on MCF-7 cell line and mutagenic activity of platinum(II) complexes with 2-substituted benzimidazole ligands. *Eur J Med Chem*. 2003;38(5):473-480.
- [28] Gökçe M, Utku S, Gür S, Özkul A, Gümüş F. Synthesis, in vitro cytotoxic and antiviral activity of cis-[Pt(R(-) and S(+)-2-Hydroxybenzylbenzimidazole)2Cl₂] complexes. *Eur J Med Chem*. 2005;40(2):135-141.
- [29] Algül Ö, Özçelik B, Abbasoğlu U, Gümüş F. Synthesis, characterization and genotoxicity of platinum (II) complexes with substituted benzimidazole ligands. *Turk J Chem*. 2005;29:607-615.
- [30] Utku S, Gümüş F, Gür S, Özkul A. Synthesis and cytotoxic activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes with 2-hydroxymethylbenzimidazole or 5(6)-chloro-2-hydroxymethylbenzimidazole ligands against MCF-7 and HeLa cell lines. *Turk J Chem*. 2007;31(4):503-514.
- [31] Utku S, Gümüş F, Karaoğlu T, Özkul A. Cytotoxic activity of platinum(II) and platinum (IV) complexes bearing 5(6)-non/chlorosubstituted-2-hydroxymethyl benzimidazole ligands against Hep-2 cell line. *J Fac Pharm Ankara*. 2007;36:21-30.
- [32] Utku S, Karaoğlu T, Gümüş F. In vitro cytotoxic activities of platinum (II) and platinum (IV) complexes bearing benzimidazole ligands. *Fabad J Pharm Sci*. 2008;33:16-21.
- [33] Gümüş F, Eren G, Açık L, Çelebi A, Öztürk F, Yılmaz Ş, Sağkan R I, Gür S, Özkul A, Elmalı A, Elerman Y. Synthesis, cytotoxicity and DNA interaction of new cisplatin analogues containing substitutedbenzimidazole ligands. *J Med Chem*. 2009;52(5):1345-1357.
- [34] Utku S, Topal M, Döğen A, Serin MS. Synthesis, characterization, antibacterial and antifungal evaluation of some new platinum (II) complexes of 2-phenylbenzimidazole ligands. *Turk J Chem*. 2010;34(3):427-436.

- [35] Utku S, Gümüş F, Tezcan S, Serin MS, Ozkul A. Synthesis, characterization, cytotoxicity and DNA binding of some new platinum(II) and platinum(IV) complexes with benzimidazole ligands. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2010;25(4):502-508.
- [36] Eren G, Gümüş F, Yılmaz Ş. In vitro cytotoxic activities of platinum (II) complexes containing 2-acetoxymethyl and 2-(2'-hydroxyethyl) benzimidazole ligands. *Fabad J Pharm Sci*. 2011;36(2):69-73.
- [37] Özçelik A B, Utku S, Gümüş F, Çelebi Keskin A, Açık L, Yılmaz Ş, Özgüngör A. Cytotoxicity and DNA interactions of some platinum(II) complexes with substituted benzimidazole ligands. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2012;27(3):413-418.
- [39] Utku S, Özçelik AB, Gümüş F, Yılmaz Ş, Arsoy T, Açık L, Çelebi KA. Synthesis, in vitro cytotoxic activity and DNA interactions of new dicarboxylatoplatinum(II) complexes with 2-hydroxymethylbenzimidazole as carrier ligands. *J Pharmacy Pharmacol*. 2014;66:1593-1605.
- [40] Boğatarkan Ç, Utku S, Açık L. Synthesis, characterization and Pbr322 plasmid DNA interaction of platinum(II) complexes with imidazole and 2-phenylimidazole as carrier ligands. *Rev Roum Chim*. 2015;60(1): 59-64.
- [41] Özçelik A B, Gümüş F, Sağkan RI, Musabak U. Synthesis of platinum (II) complexes of 2-cycloalkyl-substituted benzimidazoles and their cytotoxic effects. *J Biosciences*. 2015;70(9-10):243-250.
- [42] Nzeyimana A, Utku S, Açık L, Çelebi Keskin A. Synthesis, Characterization and DNA Interaction of Novel Platinum(II) Complexes Containing Substituted Benzimidazole Ligands. *Rev Roum Chim*. 2017;62(3):227-236.
- [43] Eren G, Yılmaz S, Gümüş F. In Vitro Cytotoxic Activities of Platinum (II) Complex with 1- Methyl-2-(3'-hydroxypropyl) benzimidazole and 2-(3'-Hydroxypropyl)benzimidazolium Hexa- and Tetrachloroplatinate Salts. *Lett Drug Design Discovery*. 2018;15(1):65-69.
- [44] Gozelle M, Suloglu AK, Selmanoglu G, Ramazanoglu L, Acik L, Gumus F. Studies on the synthesis, characterization, cytotoxic activities and plasmid DNA binding of platinum (II) complexes having 2- substituted benzimidazole ligands. *Polyhedron*. 2019;161(1): 298-308.
- [45] Eren G, Emerce E, Acik L, Aydin B, Gumus F. A novel Trans- Pt(II) complex bearing 2- acetoxymethylbenzimidazole as a non-leaving ligand (trans- [Pt(AMBI)(2)Cl₂]): Synthesis, antiproliferative activity, DNA interaction and molecular docking studies compared with its cis isomer (cis-[Pt(AMBI)(2)Cl₂]). *J Mol Struct*. 2019;1184:512-518.
- [46] Amo-ochoa P, Gonzalez V M, Perez J M, Masaguer J R, Alonso C, Navarroranniger N. Cytotoxicity, DNA binding and reactivity against nucleosides of platinum (II) and (IV) spermine compounds. *J Inorg Biochem*. 1996;64(4):287-299.
- [47] Kammermeier T, Wiegrebe W. 1H-NMR and FT-IR-spectroscopic data of 1,3- diphenylpropane-1,3-diamines and their Pt(II) complexes: Stereochemical assignments and binding mode of the non-amine ligands. *Archiv der Pharmazie*. 1994;327:697-707.
- [48] Gündüz T. Koordinasyon Kimyası. Ankara: Bilge Yayıncılık; 1994.
- [49] Perego P, Robert J. Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 77(1):5-18.
- [50] Kritzenberger J, Bernhardt G, Gust R, Pistor P, Schonenberger H, Yersin H. Dichlorobis(cycloalkylamine) platinum(II) complexes structure activity relationship on the human MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Monatsh Chem*. 1993;124(5):587-604.
- [51] Winterfield K, Lampke H, Franzke H. Synthese von 3,4-dioxo-2-aza-chinolizidin und seinem 2-methyl-derivat. *Liebigs Annalen der Chemie*. 1965;685(1):181-186.
- [52] Sams J R, Tsin T B. Studies of spin crossover in some tris[2-(2'-pyridyl)benzimidazole]iron(II) complexes. *J Chem Soc, Dalton Transactions*. 1976;0:488-496.
- [53] Reeder KA, Dose EV, Wilson LJ. Solution state spin-equilibrium properties of the tris[2-(2'-pyridyl)benzimidazole]iron(II) and tris[2-(2'-pyridyl)benzimidazole] iron(II) cations. *Inorg Chem*. 1978;17(4):1071-1075.

- [54] Robinson SD, Shaw BL. Cyclopentadienyltrimethyl platinum(IV). *Zeith Naturforche*. 1963;188: 507.
- [55] Ranninger CN, Zamora F, Martinez-Cruz LA, Isea R, Masaguer JR. Synthesis and NMR structural analysis of several ortho palladated complexes of substituted benzoimidazole, -oxazole and -thiazole and study of two polymorphic crystals. *J Organomet Chem*. 1996;518:29-36.
- [56] Albinati A, Arz C, Pregosin PS. Synthesis and X-amino ethers stabilized via metal complexation. *Inorg Chem*. 1988; 27:2015-2016.
- [57] Boğatarkan Ç. İmidazol Türevi Platin Komplekslerinin Sentezlenmesi ve Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2014, Mersin.
- [58] Zhu G, Myint M, Ang WH, Song L, Lippard SJ. Monofunctional platinum-DNA adducts are strong inhibitors of transcription and substrates for nucleotide excision repair in live mammalian cells. *Cancer Res*. 2012;72(3):790-800.
- [59] Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1291-1295.
- [60] Navarro M, Cisneros-Fajardo EJ, Fernandez-Mestre M, Arrieché D, Marchan E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. *J Inorg Biochem*. 2003;97(4):364-369.
- [61] Helling RB, Goodman HM. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*. 1974;14(5):1235-44.
- [62] Kratochwil N, Ivanov AI, Patriarca M, Parkinson JA, Gouldsworthy AM, Murdoch PS, Sadler PJ. Surprising reactions of iodo Pt(IV) and Pt(II) complexes with human albumin: detection of cys34 sulfenic acid. *J Chem Soc*. 1999;121(36):8193-8203.
- [63] Basolo F, Gray HB, Pearson RG. Mechanism of substitution reactions of complexes ions. XVII.1 Rates of reaction of platinum (II) and palladium (II) complexes with pyridine. *J Am Chem Soc*. 1960;82(16):4200-4203.
- [64] Berger I, Nazarov AA, Hartinger CG, Groessl M, Valiahdi SM, Jakupec MA, Keppler BK. A glucose derivative as natural alternative to the cyclohexane-1,2-diamine ligand in the anticancer drug oxaliplatin? *Chem Med Chem*. 2007;2(4):505-514.
- [65] Messori L, Cubo L, Gabbiani C, Alvarez-Valdes A, Michelucci E, Pieraccini G, Rios-Luci C, Leon LG, Padron JM, Navarro-Runniger C, Casini A, Quiroga AG. Reactivity and biological properties of a series of cytotoxic Pt(II) (amine)₂ complexes, either cis or trans configured. *Inorg Chem*. 2012;51(3):1717-1726.
- [66] Talman EG, Brüning W, Reedijk J, Spek AL, Veldman N. Crystal and molecular structures of asymmetric cis- and trans-platinum (II/V) compounds and their reactions with DNA fragments. *Inorg Chem*. 1997;36(5):854-861.
- [67] Messori L, Casini A, Gabbiani C, Michelucci E, Cubo L, Rios-Luci C, Padron JM, Navarro-Runniger C, Quiroga AG. Cytotoxic profile and peculiar reactivity with biomolecules of a novel "rule-breaker"iodidoplatinum (II) complex. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(8):381-385.
- [68] Parro T, Medrano MA, Cubo L, Munoz-Galván S, Carnero A, Navarro-Runniger C, Quiroga AG. These generation of iodido complexes: trans-[Pt(II) (amino) (amine)] bearing different aliphatic amines. *J Inorg Biochem*. 2013;127:182-187.
- [69] Savic A, Filipovic L, Arandelovic S, Dojcinovic B, Radulovic S, Sabo TJ, Grguric-Sipka. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum (II) iodido complexes. *Eur J Med Chem*. 2014;82:72-384.
- [70] Starha P, Vanco J, Travnické Z. Platinum iodido complexes: A comprehensive overview of anticancer activity and mechanisms of action. *Coord Chem Rev*. 2019; 380:103-135.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016-2-TP2-1524 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BENZİMİDAZOL TÜREVİ ÖNCÜ BİLEŞİĞİNİN İN VIVO ANALJEZİK VE ANTIİNFLAMATUVAR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

P14

Yusuf KAPTANOĞLU¹, Zehra Tuğçe GÜR MAZ², Nur Banu BAL¹, Erden BANOĞLU², Mecit Orhan ULUDAĞ¹

¹ Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

² Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara.

(e-posta: uludag@gazi.edu.tr)

GİRİŞ

Günümüzde en sık görülen ve klinik tıbbın çözmeye çalıştığı başlıca sorunlar arasında ağrı ve enflamasyon gelir. Steroid olmayan antiinflamatuvlar ilaçlar (NSAİİ'ler), romatoid artrit gibi ağrı ve kronik inflamatuvlar rahatsızlıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [1]. Ağrı oluşum mekanizmasında etkili prostaglandinlerin ve enflamasyon yolaklarında rolü olan lökotrienlerin daha etkili şekilde inhibe edilebilmesi ve olası yan etkileri azaltabilmek için yeni geliştirilecek moleküllerin optimize edilmesi klinik açıdan çok önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın amacı; yeni bir ağrı kesici ve antiinflamatuvlar ilaç adayı olabileceği düşüncesiyle Fakültemiz Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenerek yapı aktiviteleri araştırılan benzimidazol türevi öncü bileşiğinin analjezik ve antiinflamatuvlar aktivitelerini in-vivo olarak göstermektir. Ekibimiz tarafından daha önce yapılan çalışmalarımızda benzimidazol türevi öncü bir bileşiğinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için uygun amin türevinin İbuprofen (İBU) ile amitleştirme reaksiyonu ardından benzimidazol halkası kapatılmıştır. Elde edilen 5-karbometoksi türevinin hidrazin hidrat ile reaksiyonu sonucu karbohidrazit türevi elde edilmiştir. Karbohidrazit türevinin karbondisülfür ile reaksiyonu ile final bileşik elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiğinin sentez yolları daha önce grubumuz tarafından yayımlanmıştır [2-5]. Bileşiğinin FLAP, mPGES-1, 5-LO ve LTC4S'ı sırasıyla 0.05, 0.42, 0.6 ve 6.19 mikromolar IC50 değerleri ile inhibe ettiği in-vitro olarak gösterilmiştir. Elde edilen bu bileşiğinin farmakolojik aktivitelerinin in-vivo olarak da gösterilmesi bu çalışmada amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; sentezi ve in-vitro çalışmaları tamamlanmış olan benzimidazol türevi bileşiğinin BALB-C farelerde in-vivo antiinflamatuvlar ve analjezik aktiviteleri (10, 30 ve 100 mg/kg dozlarda) referans olarak İBU (100 mg/kg) kullanılarak test edilmiştir. Antiinflamatuvlar aktivite tayini karagenin ile oluşturulan pençe ödemi testi, analjezik aktivite tayini ise intra peritoneal (i.p.) asetik asit ile oluşturulan kıvrınma testi ile gerçekleştirilmiştir [6].

Deneylerde toplam 78 adet Balb-C (25±5 gr) albino erkek fare kullanılmıştır. Rastgele seçilen farelerden antiinflamatuvlar aktivite tayini için 6 grup (n=7), analjezik aktivite tayini için ise rastgele seçilen farelerden 6 grup (n=6) oluşturulmuştur.

Antiinflamatuvlar etkinliğin değerlendirilmesinde; fareler standart laboratuvar koşulları altında (25±2 C sıcaklık, 55±5 relatif nem, 12 saat aydınlık/karanlık döngü) polipropilen kafesler içerisinde muhafaza edilerek standart diyet ve su ile ad libitum beslenmiştir. Her farenin sağ pençesine intraplantar olarak taze hazırlanan karagenin süspansiyonu (25 µl/pençe, %1 a/h) enjekte edilmiştir. Her farenin kendi kontrolü için sol arka pençesine intraplantar olarak aynı hacimde SF enjekte edilmiştir. Sağ ve sol pençe arasındaki hacim farkı "ödem" olarak alınmıştır. Bileşiğinin etkin dozunu bulmak için karageninden 30 dk önce üç farklı dozda (10, 30 ve 100 mg/kg) subkutan (sc) olarak uygulanmıştır. Karagenin uygulamasından önce ve takiben 0, 90, 180, 270 ve 360. dakikalarda kompas (mikrometre) ile pençede oluşan ödem hacmi ölçülmüştür.

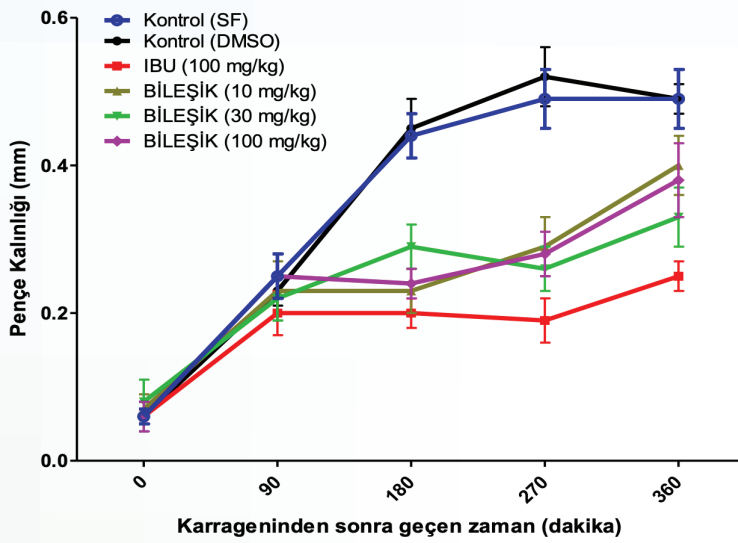
Analjezik aktivite ölçmek amacı ile; İlk defa Okun ve arkadaşları tarafından 1963'de tanımlanan ve J. Pharmacol. Exp. Ther. (139, 107-114) dergisinde yayınlanan kimyasal aljezi metodu (kıvrınma; writhing) modifiye edilerek kullanılmıştır. Farelerde aljezi oluşturmak amacı ile asetik asit (%0.8 [v/v] 10 ml/kg) i.p. olarak uygulanmıştır. Kontrol ve deney gruplarına madde uygulamasından 30 dakika sonra asetik asit uygulanmıştır. Asetik asit enjeksiyonundan 3 dakika sonra 15 dakika süre ile kıvrınma sayıları gözlenerek kaydedilmiştir.

Bileşimin gastrointestinal toksisite testi için, analjezik aktivitelerin test edildiği deney hayvanları ilaç uygulanmasını takiben 4 saat sonra yüksek doz anestezi altında ötenazi yapılarak midesi çıkartılıp ışık mikroskobu altında gastrointestinal lezyonların (kanama odakları sayısı ve çapları) incelenmiştir. Sonuçlar referans bileşikle kıyaslanmış, mide hasarı daha önce yaptığımız çalışmalardaki teknik ile [6] tespit edilmiştir.

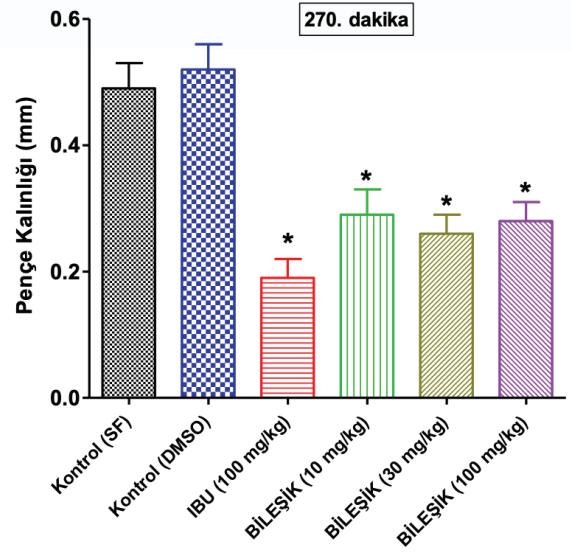
İstatistiksel yöntem olarak iki grubun karşılaştırılmalarında Student t testi, gruplar arası farkın anlamlılığında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc Bonferroni kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Deneylerde kontrol grubu olarak hem SF hem de bileşimin çözücüsü olarak kullanılan DMSO test edilmiştir. Farelerde pençe ödeminin zamana bağlı değişimi incelendiğinde; SF ve DMSO grupları arasında anlamlı fark bulunmamış olup pençe ödeminin 180-360. dakikalarda plato oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 1). Ödem formasyonunun ikinci fazını gösteren 270. dakika sonuçları incelendiğinde; Aday bileşimin her üç dozunda da antiödematöz etkisinin referans madde İBU ya benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 1 Karragenin ile indüklenen pençe ödeminin zamana bağlı değişimi. (Ortalama±SH, n=6-7).

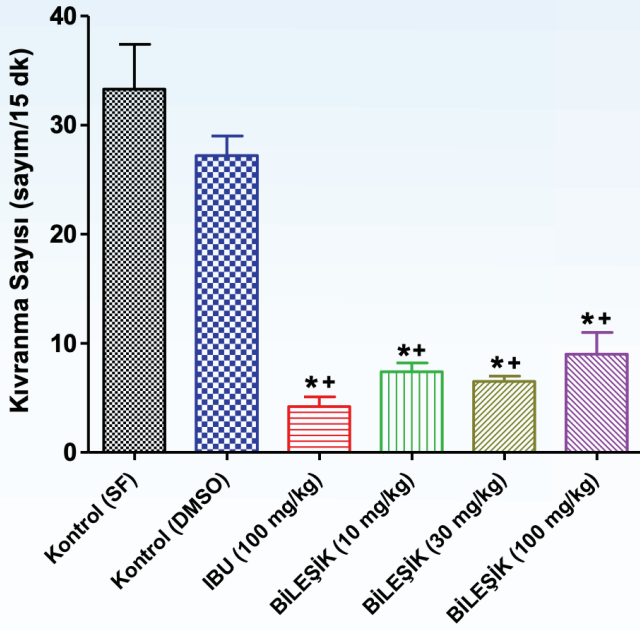


Şekil 1 Karragenin enjeksiyonundan sonra 270. dakikada fare pençe ödem kalınlıkları (Ortalama±SH, n=6-7). *Kontrol (SF)'den farklı, (p<0.05).

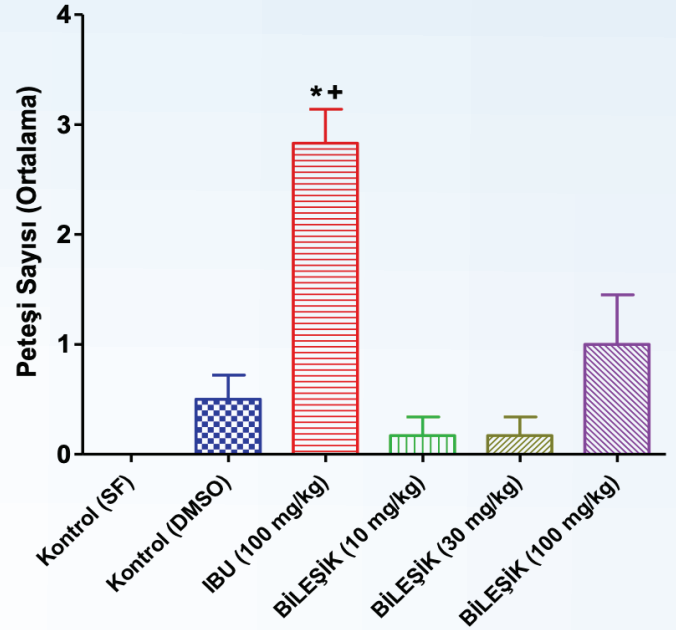
Kıvrınma modeli ile farelerde aday bileşimin antinösetif aktivitesi incelendiğinde; bileşimin üç farklı dozunda da referans madde İBU'nun etkisine benzer analjezik etki gözlenmiştir. Bu etki kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı bulunmuştur (Şekil 3).

Pençe deneyinden sonra 24 saat izlenen farelerde bileşimin akut toksik etkisi ve ölüm gözlenmemiştir. Bileşimin analjezi deneyinden 4 saat sonra farelerin midesinde ülseratif etki gözlendiğinde İBU nun en fazla ülseratif etkiye sahip olduğu, bileşimin tüm dozlarında ise daha az ülseratif etki olduğu gözlenmiştir (Şekil 4).

Tüm çalışma sonuçları değerlendirildiğinde farmakolojik aktiviteleri araştırılan benzimidazol türevi öncü bileşimin analjezik ve antienflamatuvar etkinliğe sahip olduğu ve bu etki referans maddesi İBU ile karşılaştırıldığında benzer potansiyele sahip olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca bileşimin akut toksik etkisinin olmadığı ve fare midelerinde kanama odağı yapma eğilimlerinin İBU'dan daha az olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 1 Kıvrınma Sayıları (Ortalama±SH, n=6-7).
*Kontrol (SF)'den farklı, +Kontrol (DMSO)'dan farklı, (p<0.05).



Şekil 1 Midede Peteşi Sayıları (Ortalama±SH, n=6).
*Kontrol (SF)'den farklı, +Kontrol (DMSO)'dan farklı (p<0.05).

SONUÇLAR

Bu çalışma sonuçları değerlendirildiğinde Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenerek yapı aktiviteleri araştırılan benzimidazol türevi öncü bileşiğin analjezik ve antiinflamatuvar aktivitelerini in-vivo olarak gösterilmiş ve söz konusu bileşiğin yan etkisi daha az yeni bir ağrı kesici ve antiinflamatuvar ilaç adayı olabileceği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. J. Arthritis Res. 2000, 2, 379-385.
- [2] Gür Z.T., Çalışkan B., Garscha U., Olgaç A., Schubert U., Gerstmeier J., Werz O., Banoglu E. Identification of multi-target inhibitors of leukotriene and prostaglandin E2 biosynthesis by structural tuning of the FLAP inhibitor BRP-7. European Journal of Medicinal Chemistry 150 (2018) 876-899.
- [3] Pergola C, Gerstmeier J, Mönch B, Çalışkan B, Luderer S, Weinigel C, Barz D, Maczewsky J, Pace S, Rossi A, Sautebin L, Banoglu E, Werz O. The novel benzimidazole derivative BRP-7 inhibits leukotriene biosynthesis in vitro and in vivo by targeting 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP). Br J Pharmacol. 171(12), 3051-64, 2014.
- [4] Banoglu E, Çalışkan B., Luderer S, Eren G., Özkan Y., Altenhofen W., Weinigel C., Barz D., Gerstmeier J., Pergola C., Werz O. Identification of novel benzimidazole derivatives as inhibitors of leukotriene biosynthesis by virtual screening targeting 5-lipoxygenase-activating protein. Bioorg. Med. Chem. 20(12), 3728-3741, 2012.
- [5] Banoglu E., Çelikoğlu E., Wolker S., Olgaç A., Gerstmeier J., Garscha U., Çalışkan B., Carotti A, Macchiarulo A, Werz O. 4,5-Diarylisoxazol-3-carboxylic acids: A new class of leukotriene biosynthesis inhibitors potentially targeting 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP). Eur J Med Chem. 113, 10, 2016.
- [6] Uludağ O., Ergün Ç. B., Alkan A., Ercan N., Özkan Y., Banoğlu E., Stable ester and amide conjugates of some NSAIDs as analgesic and antiinflammatory compounds with improved biological activity. Turk. J. Chem., 35: 1-13, 2011.

TEŞEKKÜR

Çalışmaya verdiği destek ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Burcu Çalışkan'a teşekkür ederiz.

SÜLFONİL-TİYOSEMİKARBAZİT TAŞIYAN KÜÇÜK MOLEKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE TAYİNİ

P15

Esmâ ÖZCAN¹, Ufuk İNCE², Şengül Dilem DOĞAN¹, Muhammed İhsan HAN^{3*}

¹ Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, 38280, Kayseri.

² Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38280, Kayseri.

^{3*} Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 38280, Kayseri.

(e-posta: hanihsan@erciyes.edu.tr)

GİRİŞ

Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve küf dâhil mikropların gelişimini engelleyen, bunlara direnç gösteren ve bunlara karşı koruyan maddeler olarak tanımlanır. Günümüzde gıda maddelerinden ilaç sanayisine kadar geniş bir alanda antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. Medisinal kimya açısından antimikrobiyal moleküllere olan ilgi son yıllarda oldukça artmıştır. Bakteri, virüs ve mantarlar tıpta kullanılan mevcut antimikrobiyal ilaçlara direnç geliştirdikleri için yeni moleküllerin sentezi ve kullanıma sunulması büyük önem arz etmektedir. Sülfonil tiyosemikarbazitler, bir tane sülfonil grubu, üç adet serbest amin ve tiyokarbonil yapısı taşımaktadır. Sülfonil tiyosemikarbazitlerin antibakteriyel, antimikobakteriyel, antikanser gibi çeşitli farmakolojik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir [1-4].

GEREÇ VE YÖNTEM

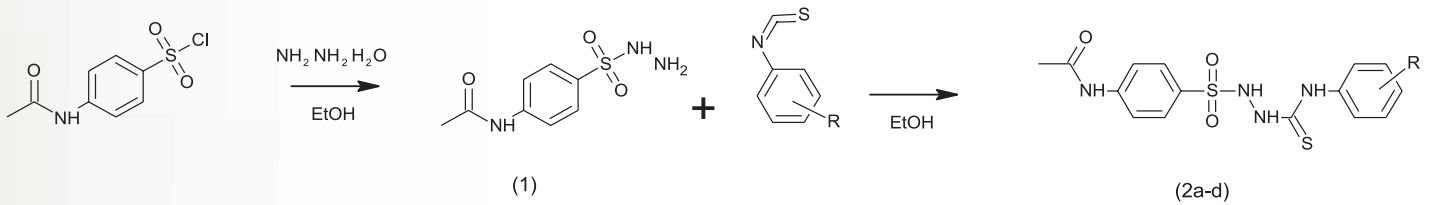
Gereç

Kimyasal maddeler ve çözücülerin tamamı Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından tedarik edilmiştir (N-Asetilsulfanilil klorür, hidrazin-hidrat (%80), etanol, tetrahidrofuran, 2-metoksifenil izotiyosiyanat, 4-metoksifenil izotiyosiyanat, fenil izotiyosiyanat, etil izotiyosiyanat) ¹H-NMR ve ¹³C-NMR analizleri Erciyes Üniversitesi, Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

Yöntem

Sentez

Bu çalışmada, başlangıç maddesi olarak N-asetilsulfanilil klorür kullanılmıştır. Buz banyosu içerisinde reaksiyon balonuna önce 2 mL tetrahidrofuran ve hidrazin-hidrat eklenir (0.011 mol). N-asetil sulfanilil klorür (0,01 mol) 1 mL tetrahidrofuran ve 1 mL diklorometan içerisinde çözülür ve hidrazin-hidrat çözeltisinin üzerine eklenir. Buz banyosunda başlatılan reaksiyon oda sıcaklığına gelene kadar karıştırılır. Karışımın üzerine birkaç mL su eklenir. Çöken ürün süzülüp kurutulur (1). Elde edilen N-asetilsulfanilil hidraziti çeşitli izotiyosiyanatlarla etanolik ortamda ısıtılmasıyla sonuç ürünleri sentezlenir (2a-d) (Şekil 1). Elde edilen bileşiklerin saflıkları İTK yöntemiyle tespit edilmiştir. FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR teknikleri ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır [4].



Şekil 1 Bileşik (2a-d)'nin sentez metodu.

Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Çalışmamızda sentezlenen dört bileşik, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Gram-pozitif bakteri), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negatif bakteri) ve *Candida albicans* ATCC 10231'e (maya mantarı) karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edilmiştir. Bu kapsamda, bakteriler için Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M100-S28 protokolüne [5] ve mantar için ise CLSI M27-A3 protokolüne [6] göre deneyler gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin olası antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin belirlenmesi için bakterilere Mueller Hinton Broth (MHB) ve mantarlara RPMI-1640 besiyerleri kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yöntem kısmında sentezi anlatılan moleküllerin karakterizasyon çalışmalarında FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-NMR teknikleri kullanılmıştır. Bileşiğe ait N-H gerilme bantları 3246-3190 cm⁻¹ aralığında, C=O gerilme bantları 1680-1676 cm⁻¹ aralığında, S=O bantları 1090-1073 cm⁻¹ aralığında, C=S gerilme bantları 1280-1296 cm⁻¹ aralığında tanımlanmıştır. ¹H-NMR sonuçlarına göre tiyosemikarbazite ait -NH protonları 9.36-9.54, 9.43-9.79, 10.30-10.55 ppm aralığında tespit edilmiştir. ¹³C-NMR sonuçlarına göre C=O ve C=S karbonları bileşikler için tanımlayıcı olmuştur. C=O ve C=S karbonları 169.43-171.14 ppm aralığında tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite çalışmaları sonucu elde edilen bulgular **Tablo 1**'de verilmiştir. Bileşiklerin MİK değerleri referans ilaçlarla (antibakteriyeller: ampisilin, gentamisin ve vankomisin; antifungal: flukonazol) karşılaştırılmıştır. *S. aureus* ATCC 29213 standart suşu üzerine en düşük MİK değerini veren bileşik 128 µg/mL ile Bileşik 2a olmuştur. Bunun haricindeki diğer bileşikler 256 µg/mL değerinde MİK göstermiştir. *E. coli* ATCC 25922 standart suşu üzerine ise tüm bileşikler 128 µg/mL MİK değerini göstermiştir. *C. albicans* ATCC 10231 standart suşuna test edilen bileşiklerin tamamı 256 µg/mL seviyesinde bir MİK değerini göstermiştir.

BİLEŞİKLER	MİKROORGANİZMALAR				
	S. aureus		E. coli		C. albicans
2a	128		128		256
2b	256		128		256
2c	256		128		256
2d	256		128		-
Ampisilin	2		16		-
Gentamisin	1		1		-
Vankomisin	1		-		1
Flukonazol	-		-		-

Tablo 1 Sentezlenen bileşiklere (2a-d) ait MİK değerleri.

SONUÇLAR

Yapılan çalışmada dört adet bileşik sentezlenmiş olup sentezlenen bu bileşiklerin karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri sonucu bileşiklerin orta düzeyde aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Sadece Bileşik 2a hem *S. aureus* ATCC 29213 ve *E. coli* ATCC 25922 suşlarına karşı 128 MİK değerinde aktivite göstermiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Cheptea C, Sunel V, Popovici C, Dumitrascu I, Dimitriu DG, Dorohoi DO. Synthesis and quantum mechanical characterization of three new 1-(5-nitrobenzimidazole-2'-yl-sulfonyl-acetyl)- 4-arylthiosemicarbazide with biological potential. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1-9.
- [2] Popovici C, Pavel CM, Sunel V, Cheptea C, Dimitriu DG, Dorohoi DO, David D, Closca V, Popa M. Optimized Synthesis of New Thiosemicarbazide Derivatives with Tuberculostatic Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 12139.
- [3] Lima LM, Ormelli CB, Fraga CAM, Miranda ALP, Barreiroa EJ. New Antithrombotic Aryl-sulfonylthiosemicarbazide Derivatives Synthesized from Natural Safrole. *J. Braz. Chem. Soc.* 1999;10, 5: 421-428.
- [4] Şenkardes S, Han İ, Hancer H, Abbak M, Cevik Ö, Kucukguzel ŞG. Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel sulfonylthiosemicarbazides. *Phosphorus, sulfur, and silicon and the related elements* 2019; 194, 12: 1164-1170.
- [5] Wayne, PA. Clinical and L.S. Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [6] Wayne, P. Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3 and Supplement S, 2008. 3: p. 6-12.

POTANSİYEL α -GLUKOZİDAZ İNHİBİTÖRÜ BAZI KİNOKSALİN-HİDRAZON TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

P16

Melike YAVUZ¹, Şirin UYSAL², Zeynep SOYER²

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 35100 İzmir.

² Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

(e-posta: sirin.uyosal@ege.edu.tr)

GİRİŞ

Diyabet, dünyada yaygın olarak görülen ve insidansı her geçen gün hızla artış gösteren kronik metabolik bir hastalıktır. Hastalığın seyirinde, insülin sekresyonundaki eksiklik ve/veya dokulardaki insülin direncinden kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize klinik bir tablo görülmektedir [1]. Hipergliseminin etkin bir şekilde kontrol altına alınamaması durumunda, yaşam kalitesi ciddi oranda bozulmakta ve ölümcül komplikasyonlar meydana gelmektedir. Yüksek görülme sıklığı, ölümcül komplikasyonları ve ülkelere mali yük oluşturmaları nedeniyle, diyabetin etkin bir şekilde tedavi edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [2].

Diyabet tedavisinde kan glukoz düzeyinin yükselmesini önlemek amacıyla farklı etki mekanizmalarına sahip insülin dışı oral antidiyabetik ilaçlar kullanılmaktadır [3]. Diyabet hastalarında görülen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların postprandiyal hiperglisemi ile ilişkili olduğu bilinmektedir [4]. Bu nedenle, diyabet tedavisinde yüksek tokluk kan şekeri düzeyini (postprandiyal hiperglisemiyi) kontrol edilmesinde α -glukozidaz enziminin inhibisyonu etkili bir strateji olarak kabul edilmektedir [5].

Günümüzde akarboz, vogliboz ve miglitol olmak üzere sadece üç adet α -glukozidaz inhibitörü bileşik tedavide kullanılmaktadır. Mevcut ilaçların orta derecede etkinliğe sahip olmaları, gastrointestinal yan etkiler sergilemeleri ve yüksek üretim maliyeti gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle daha güvenilir ve daha etkili terapötik profile sahip yeni α -glukozidaz inhibitörü ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [6]. Bu amaçla, farklı heterosiklik yapıya sahip bileşikler üzerinde yürütülen birçok araştırma mevcut olup kinoksalin heterosiklik çekirdeğini taşıyan bileşikler de bunlar arasında yer almaktadır. Ayrıca hidrazon işlevsel grubu taşıyan türevler de araştırılan bileşikler arasında bulunmaktadır [7].

Bu bilgilerden hareketle çalışmamızda, potansiyel α -glukozidaz inhibitörü kinoksalin çekirdeği taşıyan toplam 3 adet kinoksalin-hidrazon türevi bileşiğin sentezlenmesi, yapılarının spektral analiz yöntemleriyle karakterizasyonu ve α -glukozidaz enzim inhibisyonlarının in vitro tayini amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Sentez çalışmaları

Sentez çalışmalarında kullanılan o-fenilendiamin, p-nitrobenzaldehit, hidrazin hidrat ve p-hidroksibenzaldehit Merck firmasından; okzalik asit Atabay firmasından; o-nitrobenzaldehit ise Fluka firmasından temin edilmiştir. Solvan olarak kullanılan aseton, etanol, metanol, hekzan, kloroform, etil asetat, diklorometan sırasıyla İsolab, Merck, Sigma Aldrich ve VWR firmalarından temin edilmiş olup, tamamı analitik saflıktadır.

Enzim inhibisyon çalışmaları

Final bileşiklerin α -glukozidaz enzim inhibisyon çalışmalarında kullanılan tampon çözeltinin hazırlanmasında faydalanılan "Sığır Serum Albumini" Sigma Aldrich firmasından, sodyum azid Amresco firmasından ve milipor filtre Merck firmasından temin edildi. α -Glukozidaz enzimi *Saccharomyces cerevisiae* kaynaklı olup Sigma Aldrich firmasından, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid bileşiği TCI firmasından ve referans bileşik akarboz ise Acros firmasından satın alındı. Tampon pH ölçümü Hanna marka pH metre cihazı ile spektrofotometrik ölçümler ise Thermo firmasından temin edilen 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılarak Varioskan marka mikrolaka okuyucu cihazda gerçekleştirildi. % İnhibisyon değerlerinin hesaplanmasında Microsoft Excell programından yararlanıldı.

Yöntem

Sentez

Tasarlanan final bileşiklerin (M1, M2, M3) sentezi, üç basamaklı sentez prosedürüne göre gerçekleştirildi. İlk basamakta o-fenilendiamin, okzalik asit dihidrat ve 4N HCl ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyon sonunda kinoksalin-2,3-dion bileşiği elde edildi [8]. Bir sonraki basamakta bu ara ürün ve hidrazin hidrat bileşiği reaksiyona sokularak oluşturulan 3-hidrazinilkinoksalin-2-on türevi absölu etanolden kristallendirildi [9] Son basamakta ise, 3-hidrazinilkinoksalin-2-on ve uygun sübstitübenzaldehytler final bileşikleri oluşturmak üzere reaksiyona tabi tutuldu. Reaksiyonun bitişi İ.T.K. ile tespit edildikten sonra katı bakiye su ile yıkanıp, etanolden kristallendirilerek final bileşikler saf halde elde edildi [10].

Enzim inhibisyon çalışmaları

Kuyucuklara test bileşiklerinin azalan konsantrasyonlardaki çözeltilerinden 30 μ l ve enzimin tampondaki 71.4 mU/ml'lik çözeltisinden 70 μ l eklendikten sonra 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından substratın tampon içerisinde hazırlanmış 2.5 mM'lık çözeltisinden her bir kuyucuğa 50'şer μ l eklenerek 405 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla 21 kez spektrofotometrik ölçüm alındı. Standart olarak DMSO (total hacmin %10'u), referans olarak akarboz bileşiği kullanıldı ve ölçümler üç kez tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerleri, standart ve her bir test bileşiği konsantrasyonu için zamana karşı grafiğe geçirildi ve elde edilen lineer doğruların eğimleri belirlendi ($r^2 > 0.99$). % İnhibisyon değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı [11,12].

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Standart doğrusunun eğimi} - \text{Test bileşiği doğrusunun eğimi}}{\text{Standart doğrusunun eğimi}} \times 100$$

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, daha güvenli ve daha etkili α -glukozidaz inhibitörü ilaçlara ihtiyaç duyulması nedeniyle, α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği bilinen kinoksalin heterosiklik halkası ve hidrazon farmakoforik yapılarını içeren 3 adet kinoksalinon-hidrazon türevi bileşiğin sentezi gerçekleştirildi. Bileşiklerin tasarımında kinoksalin-2(1H)-on yapısı alınıp 3 konumuna sübstitü benzenhidrazin grubu eklendi. Benzen halkasının farklı konumlarına elektron çekici özellikteki nitro ve elektron verici özellikteki hidroksil sübstitüentleri eklenerek bu sübstitüentlerinin cinsinin ve konumunun aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi hedeflendi. Yapıları IR ve ¹H NMR spektral analizleriyle teyit edilen bileşiklerin in vitro biyolojik aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak tespit edildi.

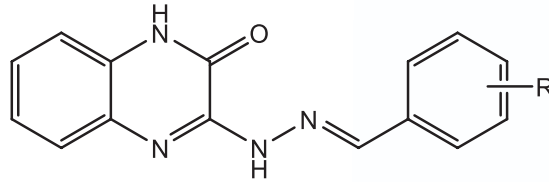
Sentez çalışmalarına ait bulgu ve tartışma

Bu çalışmada tasarlanan M1, M2 ve M3 kodlu hedef bileşikler (Şekil 1) üç basamaklı sentez yöntemi ile sentezlenmiş ve yapıları IR ve ¹H NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak teyit edilmiştir.

Final bileşiklerimizin IR spektrumları incelendiğinde, bileşiklerin yapısında bulunan N-H, C=O ve hidrazon gruplarına ait karakteristik bantlar tespit edilmiş olup literatür ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca, M1 ve M2 kodlu final bileşiklerine ait -NO₂ asimetric ve simetric gerilme bantları ve M3 kodlu final bileşiğinin yapısında yer alan O-H ve N-H gerilme bantları beklenen değerlerde gözlenmiştir. Bileşiklerin yapısında yer alan alifatik ve aromatik gruplara ait titreşim bantları da literatürde bildirilen değerlerle uyumlu beklenen dalga sayılarında gözlenmiştir [13].

Sentezini gerçekleştirdiğimiz final bileşiklerimizin oluştuğunu destekleyen en önemli bulgular bileşiklerin DMSO-d₆ çözücüsü kullanılarak alınan ¹H NMR spektrumlarından elde edilmiştir. Bileşiklerin ¹H NMR spektrumları incelendiğinde, beklenen kimyasal kayma değerlerine ve proton sayılarına uygun rezonans sinyalleri gözlenmiştir [14].

Final bileşiklerinin spektrumları incelendiğinde, final bileşiklerinin tümünde bulunan kinoksalin-2-on ortak yapısına ait N-H sinyalleri tüm bileşikler için bir protonluk geniş bir singlet sinyal olarak gözlenmiştir. Final bileşiklerine ait diğer bir ortak yapı hidrazon grubuna ait N-H protonudur. Bu protona ait sinyaller de bir protona karşılık gelen singlet sinyaller şeklinde tespit edilmiştir. Benziliden yapısına ait =C-H protonu ise beklenen kimyasal kayma değerinde birer protonluk entegrasyonda singlet sinyaller olarak izlenmiştir. Final bileşiklerde kinoksalin-2-on halkasına ait aromatik protonlardan biri M1, M2 ve M3 bileşiklerinde sırasıyla dublet-triplet; dublet ve multipler sinyal şeklinde izlenmiştir. Her üç bileşikte de kinoksalin halkasına ait geriye kalan diğer protonlar ise üç protonluk multipler sinyaller olarak gözlenmiştir. Bileşiklerin yapısında yer alan benzen halkasına ait protonlar ise; taşıdıkları süstitüentin cinsi ve konumu ile uyumlu olarak beklenen kimyasal kayma değerlerinde ve proton sayılarına uygun rezonans sinyalleri şeklinde gözlenmiştir. M2 ve M3 bileşiklerinin yapısında yer alan p-NO₂ ve p-OH süstitüe fenil halkalarına ait eşdeğer aromatik protonlar, p-disüstitüe sistemlerden beklendiği gibi iki proton değerinde dublet sinyaller olarak gözlenmiştir. Elde edilen tüm spektral veriler literatürle uyumlu olup sentezlenen bileşiklerin yapılarını teyit eder nitelikte bulunmuştur.



R=2-NO₂ (M1), 4-NO₂ (M2), 4-OH (M3)

Şekil 1 Hedef Bileşiklerin Kimyasal Yapısı

Enzim inhibisyon çalışmaları

Sentezlenen final bileşiklerinin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak in vitro olarak tayin edilmiş olup sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur. Aktivite sonuçları, bu grup bileşiklerin referans bileşik akarbozla karşılaştırıldığında belirgin α -glukozidaz inhibitör aktivite taşıdığını göstermektedir. Çalışmamızda, üç bileşiğin çalışılabilirdiği en yüksek konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Bu % inhibisyon değerleri, aynı konsantrasyondaki akarboz referans bileşiğinin % inhibisyon değerleri ile karşılaştırıldığında, bileşiklerin akarboz'dan daha yüksek % inhibisyon değerine sahip oldukları görülmüştür.

Aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; benzen halkasının para pozisyonunda nitro süstitüenti taşıyan M2 kodlu bileşiğin orto konumunda aynı süstitüenti taşıyan M1 kodlu bileşiğe göre daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. M2 kodlu bileşik aynı zamanda diğer üç bileşik arasında en aktif bileşik olarak tespit edilmiştir. M2 ve M3 kodlu bileşiklerin biyolojik aktivite sonuçları mukayese edildiğinde ise, benzen halkasının para konumunda -OH grubu taşıyan M3 kodlu bileşiğin aynı konumda nitro grubu taşıyan M2 kodlu bileşikten daha düşük inhibisyon gösterdiği görülmektedir. Buna göre elektron çeken nitro grubunun para pozisyonuna girişi ile optimum aktivite elde edildiği söylenebilir.

Biyolojik aktivite sonuçlarına göre, sentezlediğimiz kinoksalinon-hidrazon türevi bileşiklerin hepsi α -glukozidaz enzimine karşı değişen oranda referans bileşik akarboz'dan daha yüksek inhibisyon göstermiştir.

Tablo 6 Final bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri

Bileşik Kodu	%İnhibisyon (50 μ M)	%İnhibisyon (25 μ M)
M 1	26.25	10.85
M 2	46.47	37.80
M 3	29.86	14.23
Akarboz	11.40	8.60

SONUÇLAR

Bu çalışmada potansiyel α -glukozidaz inhibitörü kinoksalinon-hidrazon türevi üç adet bileşiğin tasarımı, sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Final bileşikler toplamda üç basamaktan oluşan sentez yönteminden hareketle elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapı teyitlerinde IR ve ¹H NMR spektroskopik yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak in vitro olarak tayin edilmiştir. Biyolojik aktivite çalışma sonuçlarından elde edilen % inhibisyon değerlerine bakıldığında; final bileşiklerin tamamı referans bileşik akarboz'dan daha yüksek α -glukozidaz inhibitör aktivite göstermiştir. Bu bileşiklerin arasında benzen halkasının para konumunda NO₂ süstitüenti taşıyan M2 kodlu bileşik, en aktif bileşik olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamız kapsamında tasarımı ve sentezi gerçekleştirilen kinoksalin-2-on-hidrazon türevi bileşiklerin akarboz bileşiğinden daha yüksek aktivite göstermesi, bu genel yapıya sahip bileşiklerin türevlendirilip tasarlanması ve potansiyel α -glukozidaz inhibitörü bileşiklerin keşfine yönelik yeni projelerin planlanması açısından umut verici bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. Role of self-care in management of diabetes mellitus. J Diabetes Metab Disord. 2013; 12(14):1-5.
- [2] Stein SA, Lamos EM, Davis SN. A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. Expert Opin. Drug Saf. 2013; 12: 153-175.
- [3] Gourgari E, Wilhelm EE, Hassanzadeh H, et al. A comprehensive review of the FDA-approved labels of diabetes drugs: indications, safety, and emerging cardiovascular safety data. J Diabetes Complications. 2017; 31(12):1719-1727.
- [4] Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. Molecules 2020; 25(1987):1-20.
- [5] Ghani U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for the potential development into oral anti-diabetic drugs: finding needle in the haystack, Eur. J. Med. Chem. 2015;103:133-162.
- [6] Simone MI, Wood A, Campkin D, Kiefel MJ, Houston TA. Recent results from non-basic glycosidase inhibitors: How structural diversity can inform general strategies for improving inhibition potency. Eur. J. Med. Chem. 2022; 235:114282.

[7] Settypalli T, Chunduri VR, Maddineni AK, Begari N, Allagadda R, Kotha P, Chippada AR. Design, synthesis, in silico docking studies and biological evaluation of novel quinoxaline-hydrazide hydrazone-1,2,3-triazole hybrids as α -glucosidase inhibitors and antioxidants. *New J. Chem.* 2019; 43(38):15435-15452.

[8] Bouanane Z, Bounekhel M, Elkollı M, Takfaoui A. A New Solvent for the Reaction of Chlorination of Hydroxyquinoxaline Derivatives With Vilsmeier Reagent. *Rev. Roum. Chim.* 2011; 62(12); 903-906.

[9] Ajani OO, Obafemi CA, Ikpo CO, Ogunniran KO, Nwinyi OC. Microwave-assisted synthesis and antibacterial activity of some pyrazol-1-ylquinoxalin-2(1H)-one derivatives. *Chem of Het. Comp.* 2009; 45(11): 1370-1378.

[10] Galal SA, Abdelsamie AS, Soliman SM, Mortier J, Wolber G, Ali MM et al. Design, synthesis and structure-activity relationship of novel quinoxaline derivatives as cancer chemopreventive agent by inhibition of tyrosine kinase receptor. *Eur J of Med Chem.* 2013; 69; 115-124.

[11] Ranilla LG, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology.* 2010; 101(12); 4676-4689.

[12] Ayan EK, Soyer Z, Uysal S. Synthesis and Enzymological Characterization of Some 2- (Substitutedphenylamino)quinazolin-4(3H)-one Derivatives as Potent α -Glucosidase Inhibitors In vitro. *Lett in Drug Des and Discov.* 2021; 18: 1-10.

[13] Nakanishi, K., ve Solomon, P. H. *Infrared Absorption Spectroscopy.* 1977. San Francisco: Holden Day Inc.

[14] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrophotometric Identification of Organic Compounds.* 2005;8. Baskı. New York: John Wiley & Sons.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü (Proje No: TLP-2022-23646) tarafından desteklenmiştir.

POTANSİYEL α -GLUKOZİDAZ İNHİBİTÖRÜ BAZI FTALİMİT-SÜLFONAMİT TÜREVİ BİLEŞİKLERİN SENTEZ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

P17

Sümeyye YURT¹, Şirin UYSAL², Zeynep SOYER²

¹Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 35100 İzmir.

²Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

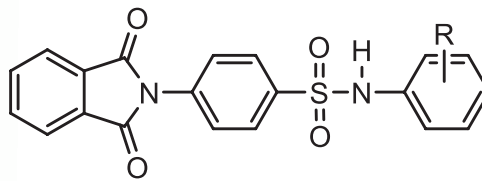
(e-posta: sirin.uyosal@ege.edu.tr)

GİRİŞ

Tip 2 diyabet, dünya üzerinde geniş bir popülasyonu etkileyen, insülin direnci veya insülin sekresyonundaki eksiklik nedeniyle oluşan hiperglisemi ile ilişkili ciddi komplikasyonlara neden olabilen kronik metabolik bir hastalıktır [1]. Yaşam kalitesini düşürmesi, ölümcül komplikasyonlara neden olması ve ülke ekonomilerine oluşturduğu mali yük nedeniyle, çağımızda diyabetin etkin bir şekilde tedavi edilme zorunluluğu ortaya çıkmıştır [2].

Hastalardaki tokluk sonrası oluşan yüksek kan glukoz düzeyinin (postprandial hiperglisemi) kontrol altına alınması, diyabetin erken tedavisi ve ölümcül komplikasyonların önlenmesi açısından primer hedefi oluşturmaktadır [3]. Bu amaçla kullanılan en etkili farmakolojik tedavi yaklaşımlarından biri karbonhidratların sindiriminde önemli bir görevi olan α -glukozidaz enziminin inhibisyonudur [4, 5]. Akarboz, miglitol ve vogliboz, günümüzde diyabet tedavisinde kullanılan α -glukozidaz inhibitörü ilaçlardır. Bu ilaçlar, hipoglisemiye neden olmaksızın postprandial hipergliseminin kontrolünü sağlamalarına rağmen düşük etkinlik göstermekte, şeker benzeri molekül yapısına sahip olmaları nedeniyle yüksek maliyetli sentez prosedürü gerektirmektedir [6]. Ayrıca, gastrointestinal yan etkilere ve uzun süreli kullanımda hepatotoksisiteye de neden olabilmektedir [7]. Sahip oldukları bu dezavantajlar nedeniyle daha etkili ve güvenli, aynı zamanda düşük maliyetle elde edilebilen yeni bileşiklerin keşfine yönelik araştırmalara devam edilmektedir. Bu doğrultuda farklı çekirdek yapısına sahip birçok bileşik sentezlenerek α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri rapor edilmiştir. Araştırılan bileşikler arasında ftalimit ve sülfonamit yapılarını taşıyan türevler de bulunmaktadır [8, 9, 10, 11, 12, 13].

Literatür verileri ışığında, çalışmamızda potansiyel α -glukozidaz inhibitörü üç adet yeni ftalimit-sülfonamit türevi bileşik tasarlanmış ve sentezlenmiştir (Şekil 1). Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR ve ¹H NMR spektroskopik yöntemleriyle teyit edilmiştir. Bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri spektrofotometrik yöntem kullanılarak in vitro olarak test edilmiştir. Biyolojik aktivite sonuçlarına göre, sentezlenen bileşiklerin referans bileşik akarboz'dan daha yüksek inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



R=3,5-OCH₃ (S1); 4-OH (S2); 2-OH (S3)

Şekil 1 Hedef bileşiklerin açık kimyasal yapısı

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Sentez çalışmaları

Sentez çalışmalarında kullanılan kimyasal maddelerden fosforpentaklorür, klorosülfonik asit ve 3,5-dimetoksianilin Acros firmasından; anilin, ftalik anhidrit, 2-aminofenol ve 4-aminofenol bileşikleri ise Merck firmasından temin edilmiştir. Kullanılan solvanların tamamı analitik saflıktadır.

Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Final bileşiklerin α -glukozidaz enzim inhibisyon çalışmalarında kullanılan tampon çözeltinin hazırlanmasında faydalanılan "Sığır Serum Albumini" Sigma Aldrich firmasından, sodyum azid Amresco firmasından ve milipor filtre Merck firmasından temin edildi. α -Glukozidaz enzimi Saccharomyces cerevisiae kaynaklı olup Sigma Aldrich firmasından, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid bileşiği TCI firmasından ve referans bileşik akarboz ise Acros firmasından satın alındı. Tampon pH ölçümü Hanna marka pH metre cihazı ile spektrofotometrik ölçümler ise Thermo firmasından temin edilen 96 kuyucuklu mikrolakalar kullanılarak Varioskan marka mikrolaka okuyucu cihazla gerçekleştirildi. % İnhibisyon değerlerinin hesaplanmasında Microsoft Excell programından yararlanıldı.

Yöntem

Sentez

Final bileşiklerimiz (S1, S2, S3) üç basamaklı sentez yöntemiyle literatürde belirtilen yöntemle göre hazırlandı. Buna göre ilk basamakta ftalimit bileşiği anilin ile tepkimeye sokularak N-fenilftalimit ara ürünü elde edildi. Daha sonra bu ara ürün klorosülfonik asit ve fosforpentaklorür ile tepkimeye sokularak 4-ftalimidobenzensülfonil klorür bileşiğine dönüştürüldü. Son basamakta ise bu bileşik uygun aminler (3,5-dimetoksianilin, 4-hidroksianilin, 2-hidroksianilin) ile reaksiyona sokularak final bileşikler elde edildi. S1 kodlu bileşik etanolden, S2 kodlu bileşik etanol-su (1:1) karışımından, S3 kodlu bileşik ise metanol-su (1:1) karışımından kristallendirildi [14].

Enzim inhibisyon çalışmaları

Çalışmalarda 100 mM NaCl içeren 50 mM konsantrasyonda fosfat tamponu (pH=6.8) kullanıldı. Tartımı yapılan test bileşikleri (S1, S2 ve S3), seri dilüsyonla azalan konsantrasyonlarda hazırlandı. Kuyucuklara test bileşiklerinin azalan konsantrasyonlardaki çözeltilerinden 30 μ l ve enzimin tampondaki 71.4 mU/ml'lik çözeltisinden 70 μ l eklendikten sonra 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından substratın tampon içerisinde hazırlanmış 2.5 mM'lık çözeltisinden her bir kuyucuğa 50'şer μ l eklenerek 405 nm dalga boyunda 30 saniye aralıklarla 21 kez spektrofotometrik ölçüm alındı. Standart olarak DMSO (total hacmin %10'u), referans olarak akarboz bileşiği kullanıldı ve ölçümler üç kez tekrarlandı. Ölçülen absorpsiyon değerleri, standart ve her bir test bileşiği konsantrasyonu için zamana karşı grafiğe geçirildi ve elde edilen lineer doğruların eğimleri belirlendi ($r^2 > 0.99$). % İnhibisyon değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı [15, 16]

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((\text{Standart doğrusunun eğimi} - \text{Test bileşiği doğrusunun eğimi}) / \text{Standart doğrusunun eğimi}) \times 100$$

BULGULAR VE TARTIŞMA

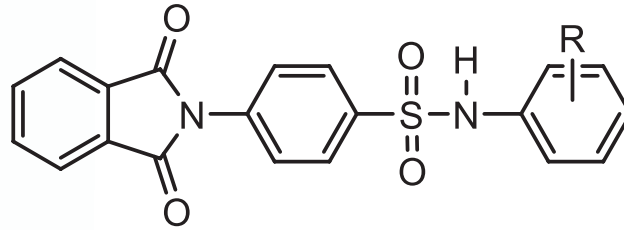
Çalışmamız kapsamında potansiyel α -glukozidaz inhibitörü üç adet ftalimit-sülfonamid türevi bileşik, α -glukozidaz inhibitör aktivite gösterdiği bildirilen ftalimit halkasının azot atomuna N-fenilbenzensülfonamid grubu eklenmesi tasarlanarak sentezlendi. Bileşiklerin sülfonamid azotuna bağlı fenil halkasının farklı konum/konumlarına elektron verici özellikteki metoksil ve hidroksil sübstitüentleri eklenerek sübstitüsyonun aktivite üzerindeki etkisinin ortaya çıkarılması hedeflendi. Sentezlenen bileşiklerin yapı teyitleri IR ve ¹H NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak yapıldıktan sonra biyolojik aktiviteleri in vitro olarak değerlendirildi.

Sentez çalışmaları

Bu çalışmada tasarlanan S1, S2 ve S3 kodlu hedef bileşikler (Şekil 1) üç basamaklı sentez yöntemi ile sentezlenmiş ve yapıları IR ve ¹H NMR spektroskopik yöntemleri kullanılarak teyit edilmiştir.

Final bileşiklerimizin IR spektrumları incelendiğinde bileşiklerin yapısında bulunan ftalimit halkası ve sülfonamid grubuna ait karakteristik bantlar tespit edildi. Sülfonamid azotuna bağlı fenil halkasının orto ve para konumlarında -OH sübstitüenti taşıyan S2 ve S3 kodlu bileşiklerin spektrumlarında ise hidroksil yapısına ait karakteristik O-H gerilme bantları beklenen dalga sayısında görüldü. Sentezi gerçekleştirilen final bileşiklerimizin oluştuğuna dair destekleyici en önemli bulgular bileşiklerin ¹H NMR spektrumlarından elde edildi. DMSO-d₆ çözücüsü kullanılarak alınmış ¹H NMR spektrumlarında beklenen proton sayılarına ve kimyasal kayma değerlerine uygun rezonans sinyalleri gözlemlendi [17, 18].

Final bileşiklerimizdeki ortak yapı ftalimit halkasına ait protonlar multiyet sinyaller olarak tespit edildi. Diğer bir ortak yapı olan sülfonamid azotuna bağlı N-H protonu birer protonluk entegrasyonda geniş singlet (bs) sinyaller olarak gözlemlendi. S1 kodlu bileşiğin spektrumunda, sülfonamid grubunun N-fenil halkasının 3-,5- konumunda bulunan -OCH₃ sübstitüentlerine ait protonlar literatürde bildirilen kimyasal kayma değerinde altı protonluk entegrasyonda singlet sinyal olarak izlendi. Yine, S2 ve S3 kodlu bileşiklerin spektrumlarında p-disübstitübenzen yapısından kaynaklanan ikişer protonluk sinyaller beklediği gibi dublet sinyaller halinde tespit edildi.



R=3,5-OCH₃ (S1); 4-OH (S2); 2-OH (S3)

Şekil 2 Sentezlenen final bileşiklerin açık kimyasal yapıları

Enzim inhibisyon çalışmaları

Test edilen bileşiklere ait in vitro α -glukozidaz inhibitör aktivite çalışmaları, spektrofotometrik yöntem kullanılarak yapılmış ve sonuçlar Tablo 1'de sunulmuştur. Bileşiklere ait sonuçlar, çalışılan en yüksek konsantrasyonlarda (50 ve 25 μ M) % inhibisyon değerleri şeklinde ifade edilmiştir. Final bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktivite sonuçları, bu genel yapıya sahip bileşiklerin referans bileşik akarbozla karşılaştırılabilir düzeyde α -glukozidaz inhibitör aktivite sergilediğini göstermektedir.

Aktivite sonuçları değerlendirildiğinde; benzen halkasının 3- ve 5- pozisyonunda -OCH₃ sübstitüenti taşıyan S1 kodlu bileşiğin, çalışılan her iki konsantrasyonda da en yüksek % inhibisyonu sergileyerek çalışılan türevler arasında en aktif bileşik olduğu tespit edilmiştir. S2 ve S3 kodlu bileşiklerin biyolojik aktivite sonuçları incelendiğinde ise, benzen halkasının para konumunda -OH grubu taşıyan S2 kodlu bileşiğin, orto konumunda aynı grubu taşıyan S3 kodlu bileşik ile benzer inhibisyon gösterdiği görülmüştür. Buna göre elektron veren -OH grubunun para/orto pozisyonuna girişi ile aktivitede değişiklik olmadığı söylenebilir.

Sonuç olarak, sentezlediğimiz ftalimit-sülfonamid türevi bileşiklerin hepsi α -glukozidaz enzimine karşı değişen oranda referans bileşik akarboz'dan daha yüksek inhibisyon göstermiştir.

Tablo 1 Final bileşiklerinin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri

Bileşik Kodu	%İnhibisyon (50 μ M)	%İnhibisyon (25 μ M)
S1	64.17	23.33
S2	19.80	11.95
S3	13.23	12.13
Akarboz	11.40	8.60

SONUÇLAR

Bu çalışmada, 4-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)-N-(süstitüe)benzensülfonamit genel yapısına sahip 3 adet potansiyel α -glukozidaz inhibitörü bileşiğin tasarımı, sentezi biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Final bileşiklerimiz üç basamaklı sentez prosedürüne göre hazırlanmış olup sentezlenen bileşiklerin yapı teyitleri, IR ve ¹H NMR spektroskopisi aracılığıyla yapılmıştır.

Bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteleri, spektrofotometrik yöntemle in vitro olarak tayin edilmiştir. α -Glukozidaz inhibitör aktivite sonuçlarına göre, 4-ftalimido-N-(süstitüefenil)benzensülfonamit türevi bileşiklerimizin tamamının çözündüğü en yüksek konsantrasyonlardaki (50 ve 25 μ M) % inhibisyon değerleri referans bileşik akarboz'un bu konsantrasyondaki % inhibisyon değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. 50 μ M konsantrasyonda en güçlü inhibitör aktivite gösteren bileşik sülfonamit azotuna bağlı fenil halkasında 3,5-dimetoksi süstitüenti taşıyan S1 kodlu bileşik olmuştur.

Çalışmamız kapsamında sentezlenen 4-ftalimido-N-(süstitüefenil)benzensülfonamit türevi bu yeni bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında, çalışmamızın ileride yeni potansiyel α -glukozidaz inhibitörü bileşiklerin tasarımında araştırmacılara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. Role of self-care in management of diabetes mellitus. J Diabetes Metab Disord. 2013; 12(14):1-5.
- [2] Stein SA, Lamos EM, Davis SN. A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. Expert Opin. Drug Saf. 2013; 12: 153-175.
- [3] Gourgari E, Wilhelm EE, Hassanzadeh H, et al. A comprehensive review of the FDA-approved labels of diabetes drugs: indications, safety, and emerging cardiovascular safety data. J Diabetes Complications. 2017; 31(12):1719-1727.
- [4] Artasensi A, Pedretti A, Vistoli G, Fumagalli L. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. Molecules 2020; 25(1987):1-20.
- [5] Ghani U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for the potential development into oral anti-diabetic drugs: finding needle in the haystack, Eur. J. Med. Chem. 2015;103:133-162.
- [6] Simone MI, Wood A, Campkin D, Kiefel MJ, Houston TA. Recent results from non-basic glycosidase inhibitors: How structural diversity can inform general strategies for improving inhibition potency. Eur. J. Med. Chem. 2022; 235:114282.

[7] Nakamura S, Takahira K, Tanabe G, Muraoka O, Nakanishi, I. Homology Modeling of Human Alpha-Glucosidase Catalytic Domains and SAR Study of Salacinol Derivatives. *Open J Med Chem*. 2012; 2; 50-60.

[8] Askarzadeh M, Azizian H, Adib M, Mohammadi-Khanaposhtani M, Mojtabavi S, Faramarzi SA, Sajjadi-Jazi SM, Larijani B, Hamedifar H, Mahdavi M. *Scientific Reports*. 2022;12;10569.

[9] Sherafati M, Mohammadi-Khanaposhtani M, Moradi S, Asgari MS, Najafabadipour N, Faramarzi MA, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel phthalimide-Schiff base-coumarin hybrids as potent α -glucosidase inhibitors. *Chemical Papers*. 2020; 74(12); 4379-4388.

[10] Jawed HA, Mohammed MH, Ismeal SH. Synthesis, Characterization and Alpha Glucosidase Inhibition Activity of New Phthalimide Derivatives. *Iraqi J of Pharm Sci*. 2018; 27(1); 100-108.

[11] Pascale R, Carocci A, Catalano A, Lentini G, Spagnoletta A, Cavalluzzi MM, et al. New N-(phenoxydecyl) phthalimide derivatives displaying potent inhibition activity towards α -glucosidase. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18(16); 5903-5914.

[12] Abbasi MA, Najm S, Rehman AU, Rasool S, Khan KM, Ashraf M, et al. Evaluation of sulfonamide derivatives of daganen chloride as lipoxigenase and α -glucosidase inhibitors. *Tropical J of Pharm Res*. 2015; 14(1); 47-54.

[13] Duan WD, Ca JY, Cai CY, Yang ZR, Cui JF, Lan T, et al. Xanthone Sulfonamide Derivatives-A Novel Series of α -Glucosidase Inhibitors with Different Inhibitory Types. *J of Molecular Struc*. 2022;1263; 133026.

[14] Soyer Z, Uysal S, Tarikoğulları A, Parlar S, Alptüzün V. Synthesis, Evaluation of Acetyl/Butyrylcholinesterase Inhibitory Activities and Molecular Modeling Study of Some 4-Phthalimidobenzenesulfonamide Derivatives. *J of Enz Inh Med Chem*. 2017; 32(1); 13-19.

[15] Ranilla LG, Kwon YI, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*. 2010; 101(12); 4676-4689.

[16] Ayan EK, Soyer Z, Uysal S. Synthesis and Enzymological Characterization of Some 2- (Substitutedphenylamino)quinazolin-4(3H)-one Derivatives as Potent α -Glucosidase Inhibitors In vitro. *Lett in Drug Des and Discov*: 2021; 18: 1-10.

[17] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrophotometric Identification of Organic Compounds*. 2005;8. Baskı. New York: John Wiley & Sons.

[18] Nakanishi, K., ve Solomon, P. H. *Infrared Absorption Spectroscopy*. 1977. San Francisco: Holden Day Inc.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü (Proje No: TLP-2022-23647) tarafından desteklenmiştir.

BENZAZOL TÜREVİ BAZI YENİ BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, P18 ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ VE MOLEKÜLER MODELLEME ÇALIŞMALARI

Gözde Yenice ÇAKMAK¹, Serap YILMAZ²

¹ Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 22030 Edirne.

² Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 22030 Edirne.

(e-posta: gozdeyenice@trakya.edu.tr)

GİRİŞ

Kanser, birçok farklı doku/hücreleri tutabilen sayısız endojen ve eksojen karsinojenik ajanları ve çeşitli etiyolojik mekanizmaları olan hastalıklar bütünüdür [1]. Başka bir deyişle, bir grup anormal hücrenin normal hücre bölünmesi kurallarına uymaksızın kontrolsüz büyümesidir [2].

Normal hücreler büyüme, başka hücelere farklılaşma ve ölüme sebep olan sinyallerle sürekli olarak kontrol edilmektedir. Ancak kanserli hücrelerde bu sinyallerden özerk bir şekilde kontrolsüz büyüme ve proliferasyon görülmektedir. Hücre genomunda değişiklikler veya mutasyonlar ile üretilen proteinlerle hücresel denge bozulur ve böylelikle kanser hücresi oluşumu tetiklenir. Proliferasyonun devamı ve yayılması fataldir. Kansere bağlı ölümlerde neredeyse %90'ında sebep; metastazdır [2].

Tüm dünyada kanser insidansı ve mortalitesi hızlı bir şekilde büyümektedir. 2005-2015 yılları arasında nüfus artışı ve yaşlanmasına bağlı olarak insidans %33 oranında artmıştır. 2015 yılında görülen 17,5 milyon kanser vakasından 8,7 milyonu ölümlü sonuçlanmıştır [3]. Buna bağlı olarak araştırmacıların kanser üzerine olan ilgileri artmış ve kontrolsüz hücre çoğalmasını engelleyecek yeni bileşiklerin keşfi üzerine yapılan çalışmalara yönelmişlerdir.

Benzazol halkaları (benzotiyazol, benzimidazol, benzoksazol, indol) özellikle DNA yapısında bulunan adenin ve guanin halkalarının biyoizosteri olarak kabul edildiğinden ve organizmadaki biyopolimerlerle kolay etkileşim sağlayabilmesinden dolayı antikanser bileşiklerin geliştirilmesinde öncü bir yapı olarak belirlenmiştir.

Yüksek lisans tezi kapsamında 2. konuma bağlı benzil grubunun para pozisyonuna bir amid zinciriyle bağlanan çeşitli aromatik halkaları taşıyan benzotiyazol türevi bileşiklerin sentezleri; sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve Kütle Spektroskopisi kullanılarak yapılarının aydınlatılması; A549 (İnsan akciğer karsinoma), MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma), PC-3 (İnsan prostat kanseri), HEP-3B (İnsan hepatoselüler karsinoma), HeLa (insan serviks kanseri), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma), K562 (İnsan kemik iliği kronik miyeloid lösemi), Raji (insan Burkitt lenfoma), NIH3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre hatları üzerinden antikanser aktivitelerinin incelenmesi; biyolojik aktivite sonuçları doğrultusunda ısı şoku proteini (Hsp90), siklin bağımlı kinaz-2 (CDK-2), Topoizomeraz-II, K-Ras ve K-Ras G12C proteinleri üzerinden moleküler doking tekniklerini kullanarak biyolojik etki mekanizmasının aydınlatılması ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda farmasötik ve medisinal kimya alanına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

a. Sentez Aşamasında Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-aminotiyofenol, 4-aminofenilasetik asit, polifosforik asit (PPA), tiyonil klorür, 2-tiyofen karboksilik asit, furan-2-karboksilik asit pirazin karboksilik asit, indol-2-karboksilik asit, 2-naftoik asit, benzofuran-2- karboksilik asit, 4-(4-metoksi fenil)-bütirik asit, 4-fenil bütirik asit, Hidrokinamik asit, 4-(4-metoksifenil) bütirik asit.

b. Sentez ve Yapı Aydınlatma Aşamasında Kullanılan Cihazlar

Sentez, saflaştırma ve yapı aydınlatma işlemlerinde, Camag UV çalışma kabini, Heidolph Hei-VAP Value Rotary Evaporatör, CEM Discover SP Mikrodalga cihazı, Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR Spektrometre, Waters 2695 Alliance Mikromass ZQ marka LC/MS spektrometre, Electrothermal 9100 erime noktası tayin cihazı kullanılmıştır.

c. Biyolojik Aktivite Tayininde Kullanılan Biyolojik ve Kimyasal Maddeler

Antikanser aktivitenin tayininde A549 (İnsan akciğer karsinoma hücre hattı), MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı), PC-3 (İnsan prostat kanseri hücre hattı), HEP-3B (İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı), HeLa (insan serviks kanseri hücre hattı), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma hücre dizisi), K562 (İnsan kemik iliği kronik miyeloid lösemi hücre hattı), Raji (insan Burkitt lenfoma hücre hattı), NIH3T3 (fare embriyo fibroblast hücre hattı) hücre hatları, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) (Sigma-Aldrich), DMSO (Sigma-Aldrich), izopropanol (Merck), fosfat tamponu (PBS) (Sigma-Aldrich), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

d. Moleküler Modelleme İşlemlerinde Kullanılan Cihaz ve Programlar

Moelküler modelleme ve doking işlemlerinde Hp marka Intel(R) Core™ i5-6200U CPU @ 2.30 GHz 2.40 GHz özelliklerine sahip bilgisayar, Accelrys Discovery Studio 3.5, Chem Draw Professional version 15.0.0.106 kullanılmıştır.

Yöntem

a) İTK İle Reaksiyon ve Safılık Kontrolü

Yapılan bütün sentez çalışmalarında ince tabaka kromatografisi (İTK) uygulamaları ile reaksiyonların kontrolleri Reaksiyon esnasında reaksiyon balonlarından belli zaman aralıkları ile alınan numuneler gerçekleştirilmiştir.

Yöntem A'daki sentezlerin kontrolü için uygun çözücü sistemi (M1): n-Hekzan: Etil asetat (2:1), yöntem B'deki sentezlerin kontrolü için uygun çözücü sistemi olarak (M2): Kloroform: Metanol (20: 1) olarak belirlenmiştir.

b) Erime Noktalarının Tespiti

Sentezlenen bileşiklerin erime noktaları Electrothermal 9100 cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. İşlem üç kere tekrarlanarak erime derecelerinin kontrolleri sağlanmıştır.

c) ¹H NMR Spektrumlarının Alınması

Elde edilen orijinal bileşiklerin ¹H NMR spektrumları DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinin, tetrametilsilana (TMS) karşı Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR Spektrometre cihazına uygulanması sonucu alınmıştır.

d) ¹³C NMR Spektrumlarının Alınması

Elde edilen orijinal bileşiklerin ¹³C NMR spektrumları DMSO-d₆ içindeki çözeltilerinin, tetrametilsilana (TMS) karşı Varian Mercury 400 High Performance Digital FT-NMR Spektrometre cihazına uygulanması sonucu alınmıştır.

e) Kütle Spektrumlarının Alınması

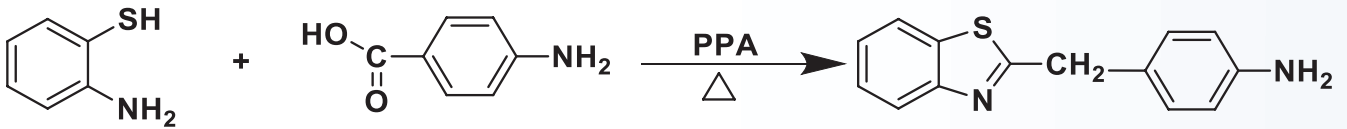
Elde edilen orijinal bileşiklere ait kütle spektrumlarının tespiti Waters 2695 Alliance Mikromass ZQ marka LC/MS spektrometre cihazında, Elektrosprey İyonizasyonu (ESI) yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Sentez

a) 2-(4-aminobenzil) benzotiyazol bileşığının sentezi, reaksiyon denklemleri ve saflaştırma yöntemleri (Yöntem A)

2-(4-Aminobenzil) benzotiyazol bileşığı elde edilmek üzere; 0,1511g (1mmol) p-amino fenilasetik asit ve 0,1252 g (1mmol) o-aminotiyofenol bileşikleri 2,4 g polifosforik asit (polyphosphoric acid, PPA) içerisinde yağ banyosunda (160-200°C) geri çeviren soğutucu altında 4 saat karıştırılarak ısıtılır. Reaksiyonun tamamlandığı ince tabaka kromatografisi (İTK) bakılarak karar verildiğinde tüm içerik buza dökülerek reaksiyon içeriğinin tamamının çözünmesi sağlanır. Bu işlem sonrasında turnusol kağıdı ile kontrol edilerek %10 NaOH çözeltisi ile ortam hafif alkali hale getirilir. Ortamın alkali hale dönüşmesiyle çözelti içerisinde çökelti oluşur, oluşan çökeltiler düz süzgeç kağıdından süzülerek alınır. Elde edilen çökelti etanol içerisinde ısı yardımı ile çözülür, aktif kömürden geçirilerek istenmeyen safsızlıklarından ayrılması sağlanır. Çözücünün fazlası buharlaştırılarak kristalizasyon için buzdolabında bekletilir ve kristal oluşumu sağlanır. Oluşan kristaller oda ısısında kurutulur.

Sentezlenen bileşik aşağıda verilen reaksiyon denklemi doğrultusunda elde edilmiştir (Şekil 1) ve bir sonraki reaksiyon basamağında başlangıç maddesi olarak kullanılır.

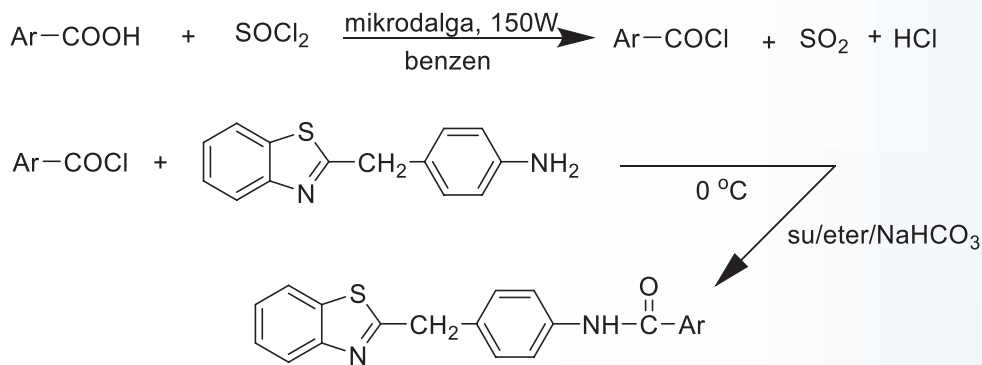


Şekil 1 2-(4-Aminobenzil) benzotiyazol bileşığının sentez denklemi

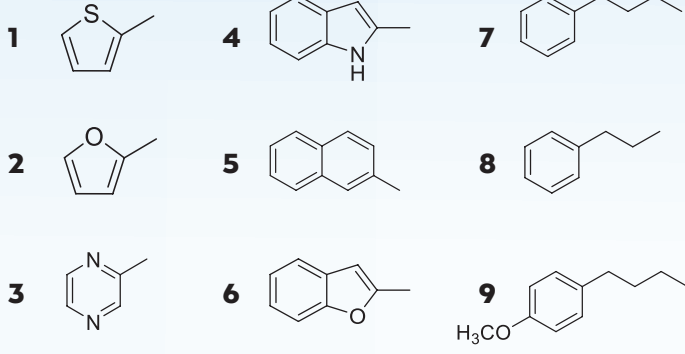
b) N-(4-(benzotiyazol-2-ilmetil)fenil)amit türevi bileşiklerin sentezi, reaksiyon denklemleri ve saflaştırma yöntemleri (Yöntem B)

Sentezlenecek bileşiklere ulaşmak üzere; öncelikle çeşitli karboksilik asit bileşikleri (2mmol) benzen (0,3mL) / SOCl₂ (0,3mL) içerisinde 150 W gücünde mikrodalga enerjisine 5 dakika maruz bırakılarak açillenmeleri sağlanır. Süre bitiminde benzenin ve tiyoniklorürün aşırısı evaporatörde uçurulduktan sonra kalan bakiye dietileter içerisinde çözülür. Bu işlem sonunda elde edilen çözelti, buz banyosunda soğutulan önceden sentezlenmiş olan başlangıç maddesi 2-(4-Aminobenzil) benzotiyazol 0,4771 g (2mmol), sodyum bikarbonat (2 mmol), eter (10mL), su (10 mL) karışımı içerisinde damla damla ilave edilir. 12 Saat boyunca buz banyosunda karıştırılan karışım süre sonunda süzülür. Bakiye, sırasıyla su, 2N HCl, su ve eter ile yıkanır. Elde edilen ürün etanolde çözülerek kristallendirilir ve oluşan kristaller vakum etüvünde kurutulur.

Sentezlenen bileşikler aşağıda verilen reaksiyon denklemi doğrultusunda elde edilmiştir (Şekil 2).



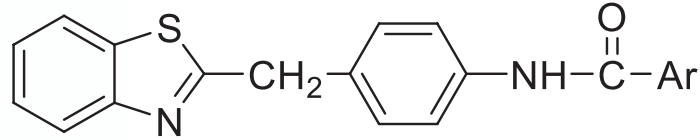
Ar-

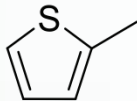
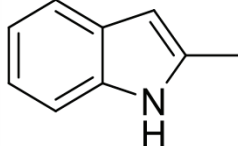
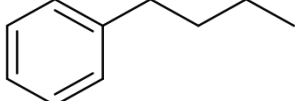
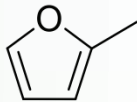
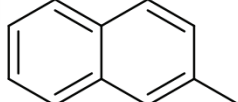
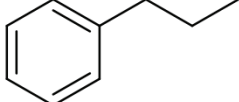
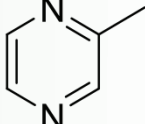
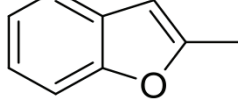
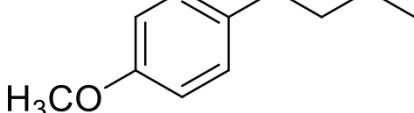


Şekil 2 N-(4-(benzotiyazol-2-ilmetil)fenil)amit türevi bileşiklerin sentez denklemi

Şekil 2'de belirtilen sentez yönteminin uygulanması sonucunda, karboksamid grubu taşıyan, 9 adet yeni benzotiyazol türevi bileşik sentezlenmiştir. Sentezi ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilen bu bileşikler çizelgede verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1 Sentezlenen benzotiyazol türevi bileşikler



Ar-					
1		4		9	
2		6		10	
3		8		11	

c) Hücre kültürü çalışmaları

Bileşiklerin antikanser aktivitesinin araştırılmasında A549 (İnsan akciğer karsinoma hücre hattı), MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma hücre hattı), PC-3 (İnsan prostat kanseri hücre hattı), HEP-3B (İnsan hepatoselüler karsinoma hücre hattı), HeLa (İnsan serviks kanseri hücre hattı), HT-29 (İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre dizisi), K562 (İnsan kemik iliği kronik miyeloid lösemi hücre hattı), Raji (İnsan Burkitt lenfoma hücre hattı), NIH3T3 (fare embriyo fibroblast hücre hattı) hücre hatları kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin antikanser aktivitelerini değerlendirilebilmek amacıyla; klinikte kanser tedavisinde kullanılan etoposid bileşiği referans olarak aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin antikanser etkinlikleri MTT deneyi ile değerlendirilmiştir.

d) Moleküler Modelleme Çalışmaları

Tezi kapsamında sentezlenen ve antikanser aktivite potansiyellerine sahip olduğu düşünülen bileşiklerin kanserde rol oynayan çeşitli reseptörler üzerinden protein-ligand etkileşim analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ısı şoku proteini (Hsp90), siklin bağımlı kinaz-2 (CDK-2), Topoizomeraz II, K-Ras ve K-Ras G12C proteinleri (sırasıyla PDB Kodu: 5GGZ [4], 5IEY [5], 3QX3 [6], 4EPR [7], 4L8G [8]) kullanılmış ve proteinlerin aktif bölgelerinde gerçekleşen bağlanma ve etkileşim noktalarını belirlemek amacıyla reseptör yapısına dayanan in silico doking metodu uygulanmıştır. Ayrıca sentezlenen bileşiklerin çeşitli fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri Discovery Studio 3.5 [12] programı kullanılarak tespit edilmiştir.

• Proteinlerin hazırlanması

Isı şoku proteini (Hsp90), siklin bağımlı kinaz-2 (CDK-2), Topoizomeraz II, K-Ras ve K-Ras G12C proteinlerinin kristal yapıları Protein Veri Bankası'ndan (www.rcsb.org) (sırasıyla PDB Kodu: 5GGZ [4], 5IEY [5], 3QX3 [6], 4EPR [7], 4L8G [8]) elde edilmiştir. Proteinlerin hazırlanması için öncelikle Discovery Studio 3.5'ta yer alan Protein Preparation protokolü kullanılmış, sonrasında CHARMM [9] kuvvet alanı kullanılarak bağ uzunlukları düzenlenmiş ve yüklü amino asitlerin üzerindeki atomların belirtilen ortam koşullarındaki olası yükleri otomatik olarak belirlenmiştir. Proteinlerin içerisinde yer alan ligandların bağlanma bölgelerinden yola çıkılarak her bir protein için aktif bağlanma bölgeleri belirlenmiş, proteinler içerisinde yer alan ligandlar aktif bölge içerisinde çıkartılmıştır.

• Ligandların hazırlanması

Docking işleminde kullanılacak tüm bileşikler ChemDraw Professional v.15 programı kullanılarak çizilmiş ve Accelrys Discovery Studio 3.5. programına aktarılmıştır. CHARMM kuvvet alanı uygulandıktan sonra adopted basis newton (ABNR) [10] minimizasyon metodu kullanılarak minimize edilmiş ve 3 boyutlu yapıları oluşturulmuştur.

• Doking işlemi

Yüksek lisans tez çalışması kapsamında sentezlenen bileşikler ısı şoku proteini (Hsp90), siklin bağımlı kinaz-2 (CDK-2), Topoizomeraz II, K-Ras ve K-Ras G12C proteinlerinin belirlenen aktif bölgelerine Discovery Studio 3.5. programı [12] ile CDocker [11] yöntemi kullanılarak doking işlemi gerçekleştirilmiştir. CDocker yöntemiyle reseptörlerin yapıları sabit tutulmuş, ligandlar esnek şekilde hareketlerine devam ederek reseptörün aktif bölgesinde rastgele 3000 farklı konformasyonla etkileşimleri sağlanmıştır. Buradan elde edilen sonuçlarda her bir molekül için 10 farklı poz elde edilmiştir. Daha sonra bu ligandlar ve proteinin bağlanma enerjileri hesaplanarak bu pozlardan en düşük bağlanma enerjisine sahip olanlar seçilmiştir.

• Fizikokimyasal ve Farmakokinetik Özelliklerin İncelenmesi

Yüksek lisans tezi kapsamında sentezlenen bileşiklerin partiyon katsayısı (LogP), moleküler ağırlık (MA), hidrojen bağı akseptörü (HBA) ve donör sayısı (HBD), dönebilen bağ sayısı, aromatik halka sayısı, polar yüzey alanı (PSA) gibi fizikokimyasal özellikleriyle birlikte çözünürlük, absorpsiyon, kan-beyin bariyerini geçiş, plazma proteinlerine bağlanma, karaciğerden CYP2D6 enzimiyle metabolize olma ve hepatotoksitesisi gibi farmakokinetik özellikleri Discovery Studio 3.5 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan yüksek lisans tez çalışmasında 9 adet orijinal N-(4-(benzotiyazol-2-iletimil)fenil)amit türevi bileşiğin sentezlenmesi, yapılarının ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve Kütle Spektroskopisi kullanılarak yapılarının aydınlatılması; A549 (İnsan akciğer karsinoma), MCF-7 (İnsan meme adenokarsinoma), PC-3 (İnsan prostat kanseri), HEP-3B (İnsan hepatoselüler karsinoma), HeLa (insan serviks kanseri), HT-29 (insan kolorektal adenokarsinoma), K562 (İnsan kemik iliği kronik miyeloid lösemi), Raji (insan Burkitt lenfoma), NIH3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre hatları üzerinden antikanser aktivitelerinin incelenmesi; biyolojik aktivite sonuçları doğrultusunda ısı şoku proteini (Hsp90), siklin bağımlı kinaz-2 (CDK-2), Topoizomeraz-II, K-Ras ve K-Ras G12C proteinleri üzerinden moleküler doking tekniklerini kullanarak biyolojik etki mekanizması aydınlatma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2 Sentezlenen bileşiklerin MTT analizi sonrası çeşitli hücrelerde ölçülen IC₅₀ değerleri (b: bileşik, h: hücre hattı)

h \ b	1	2	3	4	6	8	9	10	11	Etoposid
A549	95,05	93,40	82,39	67,61	95,52	97,88	130,27	104,72	102,69	95,01
MCF-7	99,21	100,58	79,84	75,81	82,00	98,42	114,76	110,66	102,49	100,40
PC-3	84,68	89,71	77,38	71,93	83,45	104,08	110,19	111,52	90,39	*
HEP-3B	184,70	167,70	162,69	166,15	155,45	126,54	153,28	134,73	93,12	*
HELA	110,76	145,53	100,06	98,47	119,48	133,98	145,75	101,13	100,67	99,73
HT-29	89,23	89,94	83,60	73,90	93,09	97,05	81,62	83,60	89,46	93,97
K562	106,57	92,13	70,19	53,52	64,86	76,62	96,44	73,33	104,17	97,97
Raji	87,04	100,20	82,54	77,59	68,11	66,92	84,92	74,62	107,83	104,73
NIH3T3	91,86	100,46	80,27	88,87	95,44	103,78	105,14	102,41	98,84	*

Bileşiklerin yapılarını aydınlatmak üzere ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve Kütle spektroskopisinden yararlanılmıştır. ¹H-NMR spektrumları incelendiğinde amit yapısına ait -NH protonunun 10,74 -9,86 ppm değerlerinde singlet olarak, benzotiyazol halkasının 4. ve 7. konumunda bulunan -H'lerin 8,05 - 7,16 ppm aralığında dublet olarak, benzotiyazol halkasının 5. ve 6. konumunda bulunan -H'lerin 7,47 - 7,35 ppm aralığında triplet olarak, benzil yapısında 3'-5' ve 2'-6' konumlarında bulunan H'lerin 7,87 - 7,26 ppm aralığında A2X2 sistemiyle iki dublet olarak, benzil yapısındaki -CH₂- grubunun H'leri 4,44 - 4,36 ppm aralığında singlet olarak, 1. bileşikteki tiyofen halkasının aromatik H'leri 7,82 - 7,20 ppm aralığında, 2. bileşikteki furan halkasının aromatik H'leri 6,68 - 6,67 ppm aralığında, 3. bileşikteki pirazin halkasının aromatik H'leri 9,28 - 8,78 ppm aralığında, 4. bileşikteki indol halkasının -NH grubunun protonu 12,07 ppm'de singlet, aromatik H'leri 7,59 - 7,18 ppm aralığında, 6. bileşikteki naftalen halkasındaki aromatik H'leri 8,56-7,57 ppm aralığında, 8. bileşikteki benzofuran halkasının aromatik H'leri 7,70-7,32 ppm aralığında, 9. bileşikteki fenil halkasının aromatik H'leri 7,22-7,18 ppm aralığında, alifatik zincirdeki 6 tane -CH₂- grubunun H'leri 2,59 - 1,86 ppm aralığında, 10. bileşikteki fenil halkasının aromatik H'leri 7,39-7,11 ppm aralığında, alifatik zincirdeki 4 tane -CH₂- grubunun H'leri 2,88 - 2,59 ppm aralığında, 11. bileşikteki fenil halkasının aromatik H'leri 7,08 - 6,81 ppm aralığında, -OCH₃ grubundaki H'ler 3,68 ppm'de, alifatik zincirdeki 6 tane -CH₂- grubunun H'leri 1,252 - 1,82 ppm aralığında gözlenmiştir. ¹³C-NMR spektrumları incelendiğinde bileşiklerdeki aromatik yapılara ait C'lar 100-160 ppm civarlarında, amit grubunun C'nu 170 ppm civarında, benzil C'nu 110 - 120 ppm aralığında, alifatik yapıdaki C'lar 60-25 ppm aralığında gözlenmiştir. Bileşiklerin kütle spektrumlarında temel pik olarak M+1 pikleri gözlenmiş, bileşik 4'de (M+33) (M+CH₃OH+H) piki gözlenmiştir. Sentezlenen bileşikler saf olarak elde edilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin oral biyoyararlanımları açısından ilaç benzerlik özellikleri incelendiğinde Lipinski'nin 5 kuralı, Veber kuralları, MDDR ilaç benzerlik kuralları ve Ghose filtresine göre hidrojen bağı akseptör / donör sayıları, molekül ağırlıkları, halka sayıları, dönebilir bağı sayısı ve polar yüzey alanları açısından kurallara uygun oldukları ancak 4-11 nolu bileşiklerin LogP değeri 5'in üzerinde olmasından dolayı lipinski kurallarına uyum sağlamadığı ancak 9 nolu bileşik hariç bu bileşiklerin Ghose filtresine göre LogP değerlerinin kabul edilebilir olduğu bulunmuştur.

Sentezlenen bileşiklerin farmakokinetik özellikleri değerlendirildiğinde genellikle suda az çözündükleri, ancak iyi asorbe oldukları, kan-beyin bariyerini 3 nolu bileşiğin en az diğerlerinin fazla geçtiği, 2 nolu bileşik hariç plazma proteinlerine bağlandığı, CYP2D6 enzimi ile metabolize edilmediği ve hepsinin hepatotoksik olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca bileşiklerin oral uygulamadan sonra insan intestinal absorpsiyonlarının %95'in üstünde olacağı tahmin edilmektedir.

SONUÇLAR

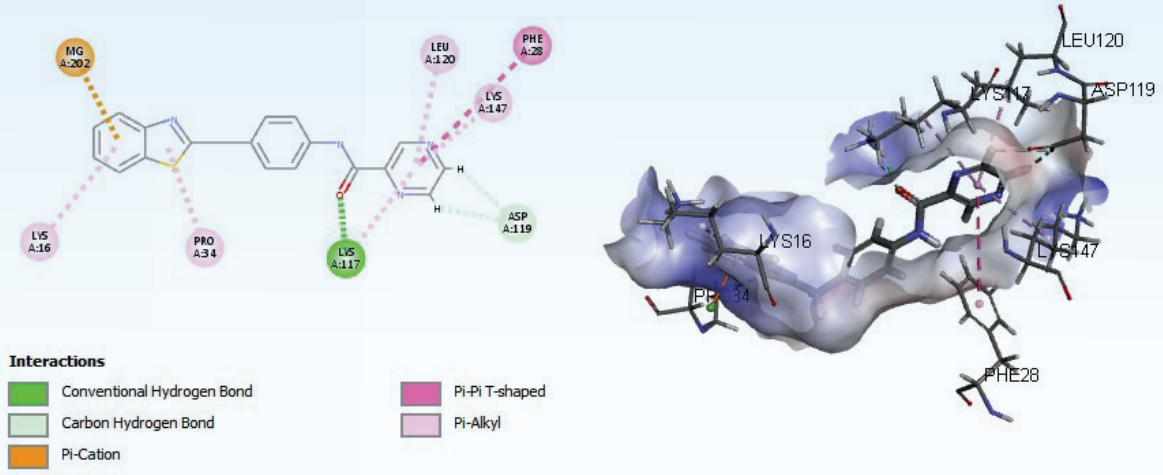
Sentezi gerçekleştirilen 1-11 nolu bileşikler için;

MTT analizi sonuçlarına göre K562 hücre hattındaki 3 ve 4 ve 6 nolu bileşiklerin, A549 hücre hattında 4 nolu bileşiğin sitotoksik etkinliklerinin doza bağlı olarak varlığı belirlenmiştir. Özellikle 4 nolu bileşik çoğu kanser türünde diğerlerine oranla dahi iyi bir inhibisyon gösterirken 9-10-11 nolu bileşiklerin inhibisyon dereceleri oldukça az olduğu saptanmıştır. Bileşiklerin yapıları incelendiğinde bir benzazol yapısında olan indol halkasının (4 nolu bileşik) biyolojik aktivite üzerinde kayda değer sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir. Amit yapısı ile aromatik halka arasındaki zincir uzadıkça (9-10-11 nolu bileşikler) aktivitenin azaldığı gözlemlenmiş, 11 nolu bileşiği $-OCH_3$ grubunun eklenmesi bu üç bileşik arasında etkisini biraz arttırmış olmasına rağmen genel olarak bakıldığında yine etkisiz kalmıştır. Yapıya amit grubuyla bağlanan aromatik halkanın özellikle N taşıyan bir heterohalka olması aktivite üzerinde olumlu sonuçlar gözlenmesine neden olmuştur.

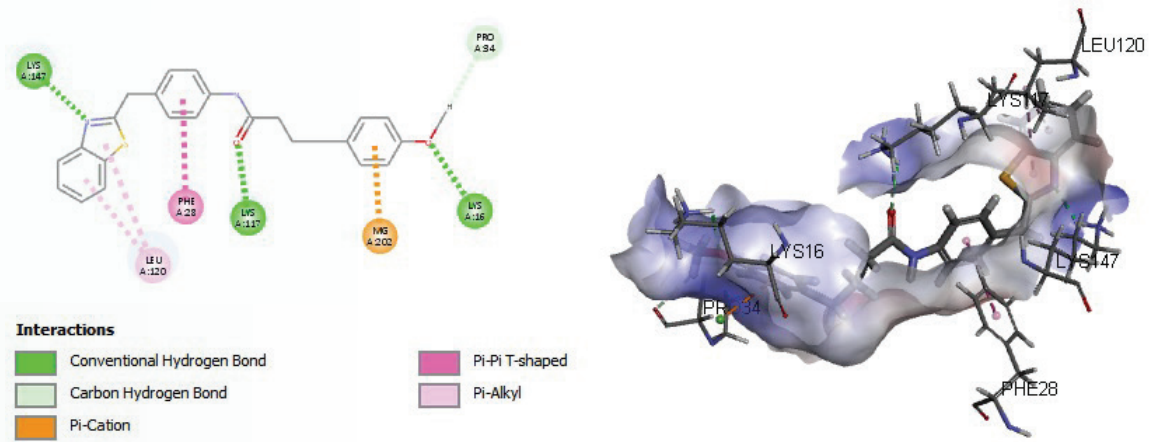
Yapılan doking çalışmaları sonucunda bileşiklerin hepsi ilgili proteinlerle düşük enerjilerle etkileşimler göstermektedir. Ancak Tablo 2'yi dikkatli incelerseniz en düşük bağlanma enerjilerinin sırasıyla KRas (pdb:4EPR), Kras G12C (pdb:5V9O) ve Topoizomeraz II (pdb:3QX3) enzimiyle olan etkileşimler oldukları öne çıkmaktadır [7].

Tablo 2 Doking çalışmaları sonucunda elde edilen bağlanma enerjileri

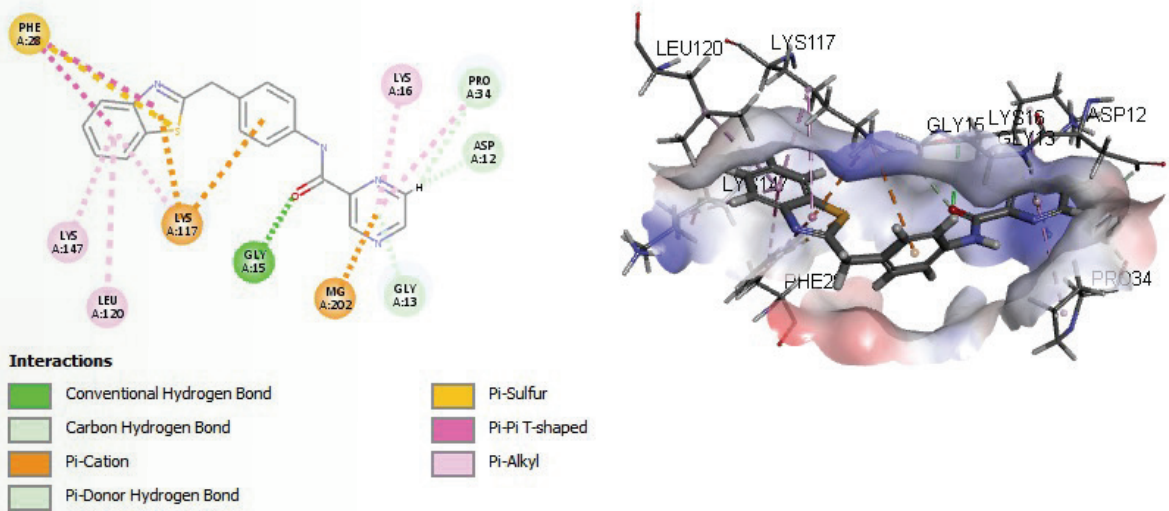
	5GGZ	5IEY	3QX3	4EPR	5V9O	4L8G
Bileşik	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)
1	-65,6236	-47,5435	-48,5679	-56,2497	-76,9791	-55,8046
2	-68,6842	-52,7046	-47,6865	-79,3301	-88,3257	-58,68
3	-91,8223	-21,5616	-95,1796	-113,843	-98,4994	-58,3673
4	-44,1648	-58,0135	-92,2613	-114,229	-95,3611	-47,2122
6	-79,6508	-71,897	-84,3315	-112,943	-82,6855	-
8	-46,0393	-46,8336	-52,4095	-99,0463	-95,3006	-68,4389
9	-60,1325	-75,7542	-78,1374	-93,3059	-96,5719	-34,7919
10	-67,7619	-64,9889	-54,5615	-105,953	-98,307	-49,1933
11	-78,7659	-82,9848	-83,2909	-112,976	-115,734	-



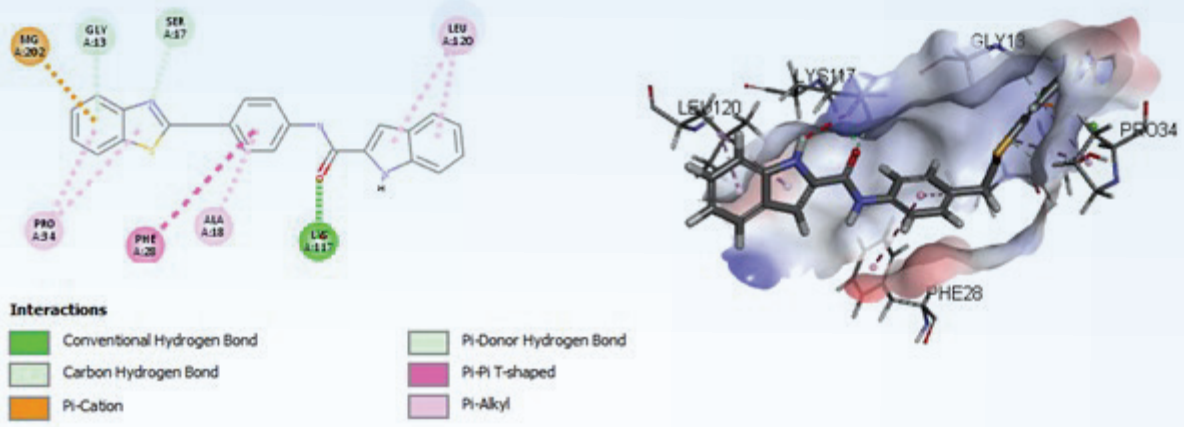
Şekil 3 Bileşik 3'ün 5V90 proteininin aktif bölgesi ile etkileşiminin 2B ve 3B görünümü



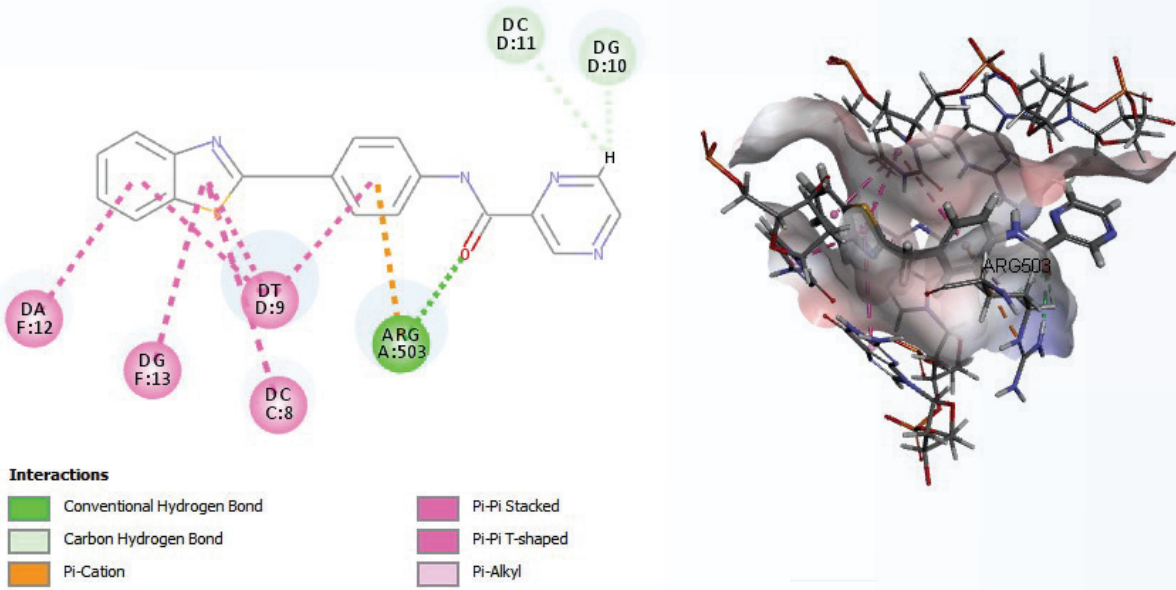
Şekil 4 Bileşik 11'in 5V90 proteininin aktif bölgesi ile etkileşiminin 2B ve 3B görünümü



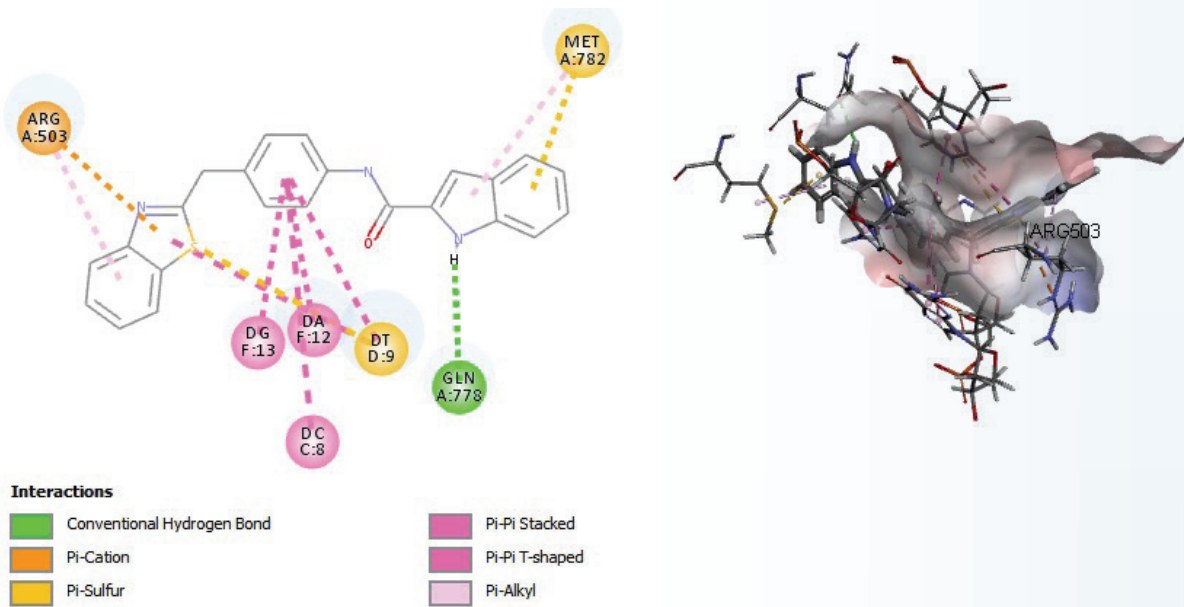
Şekil 5 Bileşik 3'ün 4EPR proteininin aktif bölgesi ile etkileşiminin 2B ve 3B görünümü



Şekil 6 Bileşik 4'ün 4EPR proteininin aktif bölgesi ile etkileşiminin 2B ve 3B görünümü



Şekil 7 Bileşik 3'ün 3QX3 proteininin aktif bölgesi ile etkileşiminin 2B ve 3B görünümü



Şekil 8 Bileşik 4'ün 3QX3 proteininin aktif bölgesi ile etkileşiminin 2B ve 3B görünümü

Yapılan bazı araştırmalarda akciğer kanserinin en önemli nedenlerinden birinin Ras proteininde görölen mutasyonlar olduğu bildirilmiştir. Gerçekleştirilen yüksek lisans tezinde elde edilen sonuçlara göre de özellikle 4 nolu bileşiğin A549 (İnsan akciğer karsinoma) hücre hattı üzerindeki inhibisyon etkisi bundan sonra yapılacak olan çalışmalar için yol gösterici nitelik taşımaktadır. Bu çalışmalardan yola çıkılarak aromatik halka sübtitüenti yerine N taşıyan farklı heterohalkaların getirilmesiyle daha etkili yeni bileşiklerin geliştirilmesi ileriki çalışmalar olarak planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Coleman, W.B. and G.J. Tsongalis, Cancer epidemiology: incidence and etiology of human neoplasms, in The molecular basis of human cancer. 2017, Springer. p. 1-24.
- [2] Hejmadi, M., Introduction to cancer biology. 2014: Bookboon.
- [3] Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 2018. 68(6): p. 394-424.
- [4] Jiang, F., et al., Novel tetrahydropyrido [4, 3-d] pyrimidines as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. Journal of medicinal chemistry, 2016. 59(23): p. 10498-10519.
- [5] Ayaz, P., et al., Conformational adaption may explain the slow dissociation kinetics of roniciclib (BAY 1000394), a type I CDK inhibitor with kinetic selectivity for CDK2 and CDK9. ACS chemical biology, 2016. 11(6): p. 1710-1719.
- [6] Wu, C.-C., et al., Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. Science, 2011. 333(6041): p. 459-462.
- [7] Sun, Q., et al., Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit Sos-mediated activation. Angewandte Chemie International Edition, 2012. 51(25): p. 6140-6143.
- [8] Ostrem, J.M., et al., K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. Nature, 2013. 503(7477): p. 548-551.
- [9] Momany, F.A. and R. Rone, Validation of the general purpose QUANTA® 3.2/CHARMm® force field. Journal of Computational Chemistry, 1992. 13(7): p. 888-900.
- [10] Chu, J.-W., B.L. Trout, and B.R. Brooks, A super-linear minimization scheme for the nudged elastic band method. The Journal of chemical physics, 2003. 119(24): p. 12708-12717.
- [11] Wu, G., et al., Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER—A CHARMm-based MD docking algorithm. Journal of computational chemistry, 2003. 24(13): p. 1549-1562.
- [12] Accelrys, Discovery Studio v3.5. (2012).

ASETAMİNOFEN SAFSIZLIKLARINDAN BİRİNİN SENTEZİ, STANDART HÂLE GETİRİLMESİ VE İLGİLİ ÇOK YÜKSEK BAŞARIMLI SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

P19

Cemil Caner ARIKAN¹, İlkay KÜÇÜKGÜZEL²

¹ Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 22030 Edirne.

² Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 22030 Edirne.

(e-posta: gozdeyence@trakya.edu.tr)

GİRİŞ

Bu çalışmada, asetaminofenin (parasetamol), Amerikan Farmakopesi Sürüm 42 (USP 42)'deki "organik safsızlıklar" HPLC analiz yönteminde tanımlı olmayan safsızlık moleküllerinden birinin sentezi, standart hâle getirilmesi, tanımlı hâle getirilen bu safsızlığı da içerecek şekilde ilgili yöntemin UHPLC'de geliştirilmesi ve ardından valide edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Laboratuvarında ve İstanbul Acıbadem'de bulunan Atabay İlaç Fabrikası Araştırma-Geliştirme Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında, N,N'-[Oksidi(4,1-fenilen)]diasetamid (ODAA) molekülünün sentezi, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra, standardizasyon çalışması ile etki değeri (potensi) hesaplanmıştır. Daha sonra Amerikan Farmakopesi Sürüm 42'nin (USP 42) "asetaminofen" monografında [1] bulunan "organik safsızlıklar" yüksek başarımlı sıvı kromatografisi (HPLC) analiz yöntemi, ilgili analiz yöntemi geliştirilerek çok yüksek başarımlı sıvı kromatografisi yöntemine (UHPLC) uyarlanmış ve ardından yöntem validasyonu yapılarak çalışma tamamlanmıştır.

Yöntem geliştirme çalışmaları, Shimadzu marka, Nexera X2 model, çok yüksek başarımlı sıvı kromatografisi (UHPLC) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Asetaminofenin, Amerikan Farmakopesi Sürüm 42'deki (USP 42) asetaminofen monografına göre hâlihazırda gerçekleştirilen "organik safsızlıklar" HPLC analiz yönteminde yüksek başarımlı sıvı kromatografisi (HPLC analizi), kromatogram üzerinde, bilinen ve tanımlanmış safsızlıkların yanı sıra, bilinmeyen safsızlıklar da elde edilmektedir [1]. USP 42'de tanımlı olmayan bu safsızlıklardan biri olan ODAA molekülü, bu çalışma dâhilinde çok yüksek başarımlı sıvı kromatografisinde (UHPLC) geliştirilen yeni yöntem ile tanımlı ve hesaplanabilir bir safsızlık hâline getirilmeye çalışılmıştır. Asetaminofen organik safsızlıklar analizi için UHPLC'de geliştirilen bu yeni yöntem ile aynı zamanda, HPLC'deki uzun analiz süresi de kısaltılmak istenmiştir.

UHPLC sisteminde yöntem geliştirme çalışmaları kapsamında, asetaminofen kromatogramında elde edilen tüm safsızlık piklerinin birbirlerini etkilemeyecek bir biçimde ayrılmasını sağlayacak ilgili kromatografik koşullar ve sistem gereklilikleri belirlenmiştir. Bu doğrultuda, farklı kolon markaları (Kromasil, GL Sciences, vb.), kolon dolgu malzemeleri (C8, C18, fenil, vb.), kolon fırını sıcaklıkları (30°C, 35°C, 40°C ve 45°C), akış hızları (0,2 mL/dk - 0,5 mL/dk arası), gradient akış programları, standart ve örnek çözelti bileşimleri denenmiş ve analiz için en uygun olan kromatografik koşullar, gradiyent akış programı, hareketli faz, standart ve örnek çözelti bileşimleri belirlenmiştir.

UHPLC sisteminin uygunluğunu kontrol üzere sistem uygunluk parametreleri belirlenmiştir. Bu doğrultuda öncelikle, geliştirilen yeni yöntem kullanılarak standart çözeltisi (aynı zamanda sistem uygunluk çözeltisi) analiz edilmiş ve sistem uygunluk parametrelerine uygunluk kontrol edilmiştir.

Asetaminofenin UHPLC'de geliştirilen organik safsızlıklar analiz yönteminin analitik yöntem validasyonu, "ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" başlıklı kılavuza göre yapılmıştır (ICH Topic Q2(R1), 1995) [2]. Validasyon çalışmaları, Shimadzu marka, Nexera X2 model UHPLC cihazında yapılmıştır.

Validasyon çalışmaları kapsamında kontrol edilen parametreler şu şekildedir:

1. Sistem uygunluk
2. Seçicilik (Özgünlük)
3. Kesinlik (Sistem kesinliği, yöntem kesinliği)
4. Doğruluk (Geri kazanım)
5. Doğrusallık ve çalışma aralığı
6. Sağlamlık
7. Çözelti stabilitesi
8. Hızlandırılmış bozundurma çalışması

BULGULAR VE TARTIŞMA

Literatürde bildirilen yöntem uygun şekilde [3] sentezlenen ODAA molekülünün kimyasal yapısı karakterizasyon çalışmaları sonucunda teyit edilmiş olup etki değeri %99,64 olarak bulunmuştur.

Tablo 1 ODAA'nın etki değerini belirlemek üzere yapılan analizlerin sonuçları.

Analiz	Yöntem	Sonuçlar
Organik safsızlıklar	HPLC analizi	%0,010000
İnorganik safsızlıklar	Sülfat külü (yakma bakiyesi) analizi	%0,009946
Kalıntı çözücüler	GC analizi	%0,037027
Nem miktarı	Karl Fischer analizi	%0,305000

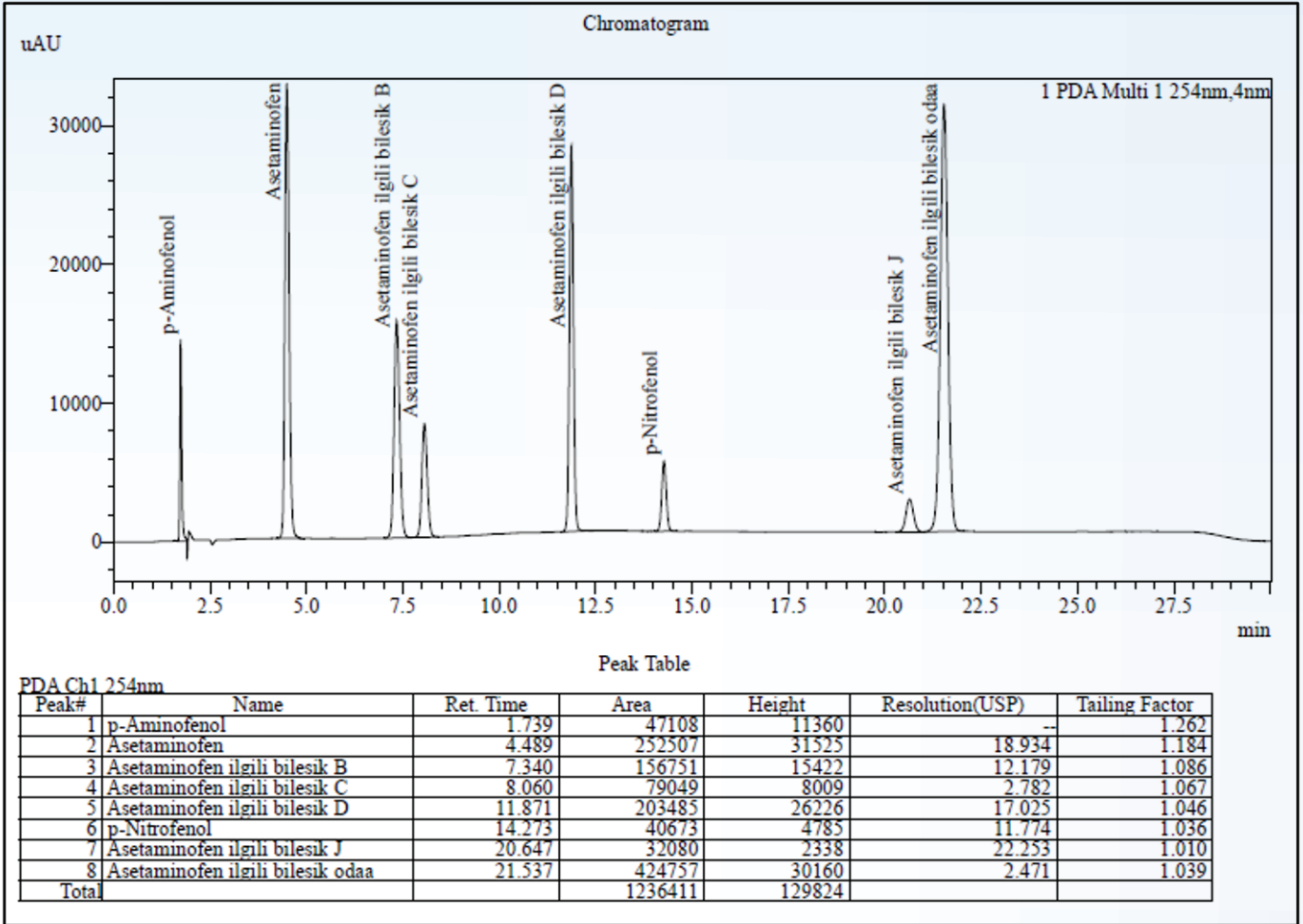
Analizler sonucunda elde edilen tüm bu değerler kullanılarak, sentezlenen ODAA molekülünün etki değeri aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\text{Potens (\%)} = \%100 \times \frac{\%100 - \% \text{Safsızlık}}{100} \times \frac{\%100 - [\% \text{Nem} + \% \text{Kalıntı çözücü} + \% \text{Diğer}]}{100}$$

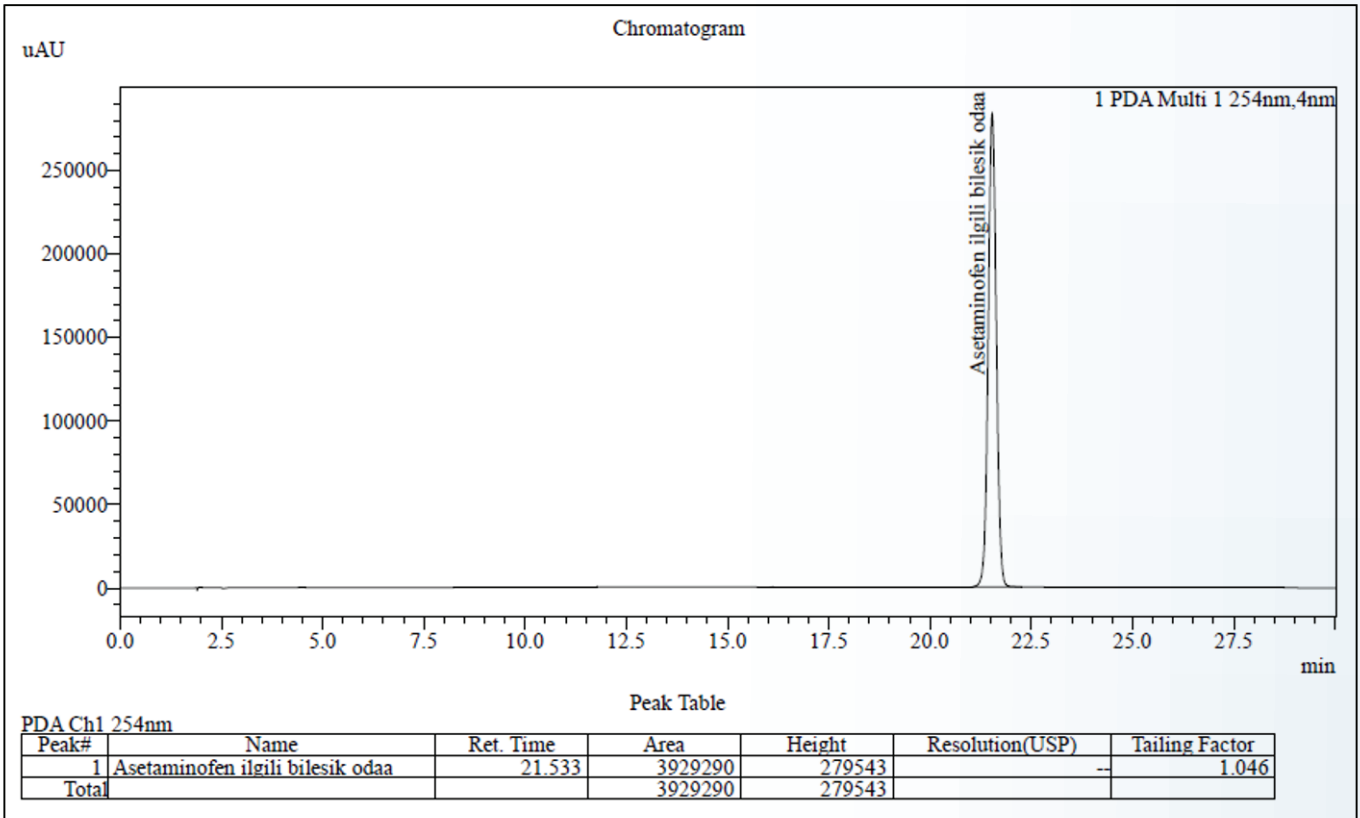
$$\text{Potens (\%)} = \%100 \times \frac{\%100 - \%0,01}{100} \times \frac{\%100 - [\%0,305 + \%0,037027 + \%0,009946]}{100}$$

Yukarıdaki formül yardımıyla yapılan hesaplama sonucunda, sentezlenen ODAA molekülünün etki değeri (potensi) %99,64 olarak bulunmuştur [4].

Asetaminofen organik safsızlıklar analiz yöntemi, ilgili yöntem geliştirilerek başarılı bir şekilde HPLC'den UHPLC'ye uyarlanmıştır. Validasyon çalışması sonucunda, tüm sonuçlar kabul ölçütleri içerisinde bulunmuş olup yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.



Şekil 1 Asetaminofen, ilgili safsızlıkları ve olası safsızlıklarına ait UHPLC kromatogramı.



Şekil 2 Seçicilik analizinde ODAA'ya ait UHPLC kromatogramı.

SONUÇLAR

Bu çalışma ile; Asetaminofenin, USP 42'deki "Asetaminofen" monografının "Organik Safsızlıklar (organic impurities)" yöntemine göre HPLC analizi gerçekleştirildiğinde, kromatogramda elde edilen, ancak USP 42'de tanımlı olmayan safsızlık moleküllerinden biri olan N,N'-[Oksidi(4,1-fenilen)]diasetamit (ODAA) molekülü sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Sentezlenen bu bileşik, daha önceden literatürde bildirilmiş olsa da, HPLC referans standartı olarak kullanılacağından elementel analiz, FTIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC, LC-MS teknikleriyle kapsamlı bir karakterizasyon çalışması yapılmıştır.

Karakterizasyon sonrasında organik safsızlıklar, sülfat külü tayini, kalıntı çözücü tayini ve Karl-Fischer nem tayini gibi ileri analizleri neticesinde, ODAA molekülünün etki değeri (potensi) %99,64 olarak tespit edilmiş ve molekül standart hâline getirilmiş, Asetaminofenin USP 42'deki organik safsızlıklar HPLC analiz yönteminde tanımlı olmayan bu molekül, UHPLC'de geliştirilen yeni yöntem ile tanımlı ve hesaplanabilir bir molekül hâline getirilmiş ve yöntem, HPLC'den UHPLC'ye başarılı bir şekilde uyarlanmış, geliştirilen yeni yöntem ile asetaminofenin organik safsızlıkları olan asetaminofen ilgili bileşik B, asetaminofen ilgili bileşik C, asetaminofen ilgili bileşik D, asetaminofen ilgili bileşik J ve ODAA molekülleri kromatografik olarak birbirlerinden ayırmıştır.

UHPLC'de geliştirilen yeni yöntemin asetaminofenin bilinen safsızlıklarının yanı sıra, olası safsızlıklarından p-aminofenol ve p-nitrofenol için de seçici olduğu ve asetaminofen ile birlikte toplam 8 molekülü kromatografik olarak birbirinden ayırabildiği gösterilmiş, asetaminofenin HPLC'deki organik safsızlıklar analiz süresi, UHPLC'de geliştirilen yeni yöntem ile yarı yarıya kısaltılmış, asetaminofenin HPLC'deki organik safsızlıklar analizinde kullanılan hareketli faz miktarı, UHPLC'deki yöntemde onda bir oranına indirilmiş, geliştirilen UHPLC yönteminin validasyonu sonucunda elde edilen tüm sonuçlar, kabul ölçütleri içerisinde bulunmuş ve yöntemin yüksek hassasiyet, seçicilik ve tekrarlanabilirlik gösterdiği saptanmış, gerçekleştirilen hızlandırılmış bozundurma çalışmalarının sonucunda, ODAA molekülünün asetaminofenin bozunması sonucunda oluşan bir safsızlık olmadığı; sentez aşamasında ortaya çıkan bir safsızlık olabileceği gösterilmiş, literatüre ve ilgili farmakopelere sunulabilecek yeni bir yöntem ortaya çıkarılmıştır.

KAYNAKÇA

[1] United States Pharmacopeia (USP 42 - NF 37). Official Monographs: Acetaminophen. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, USA; 2019.

[2] ICH Topic Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Step 5. Note For Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology. CPMP/ICH/381/95. European Medicines Agency, 1995.

[3] Gubbelmans E, Verbiest T, Picard I, Persoons A, Samyn C. Poly(phenylquinoxalines) for second-order nonlinear optical applications. Polymer. 2005;46:1784-1795.

[4] Culbert PA, Johnson BD. Chapter 6: Reference Standards. In: Ahuja S, Alsante KM, eds. Separation Science and Technology. Vol. 5: Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals. San Diego, California: Academic Press; 2003, p:119-143.

TEŞEKKÜR

Atabay Kimya Sanayi Ticaret A.Ş ve Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalına laboratuvarlarını, kimyasallarını ve cihazlarını kullanmamıza izin verdikleri için çok teşekkür ederiz.

AMİNO ASİT TAŞIYAN BİR GRUP ÜRE VE TIYOÜRE TÜREVİ BİLEŞİĞİN SENTEZİ VE ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

P20

Özlem AKGÜL¹, Aslı ŞAHİNER²

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

² Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 35100 İzmir.

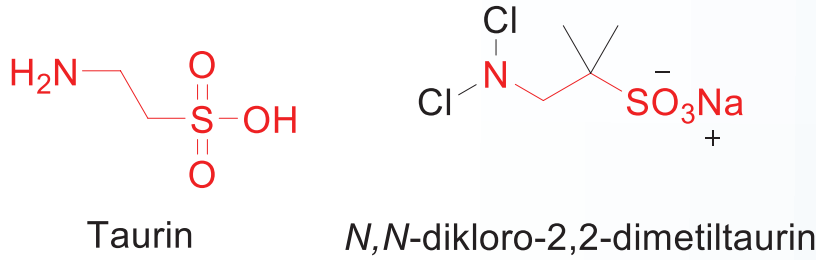
(e-posta : ozlem.akgul@ege.edu.tr)

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre; her yıl 700.000 insanın antimikrobiyal direnç mekanizmasından dolayı öldüğü ve 2050 yılında bu sayının 10 milyona yükseleceği bildirilmiştir [1].

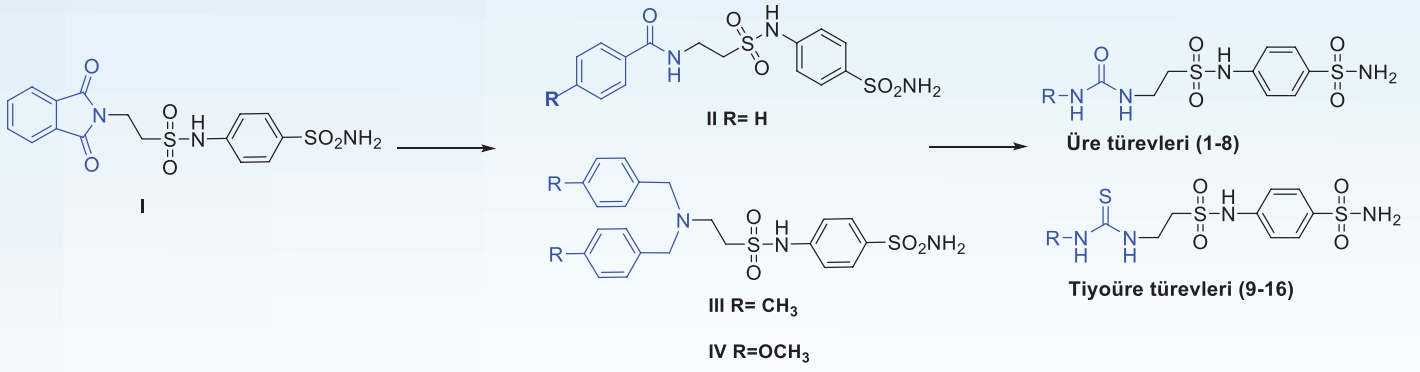
Bakterilerin ürettiği maddelerin, yine bakteriler üzerinde tedavi amaçlı kullanılabileceğinin bulunması ile antibiyotik ilaç tedavisinde bir devrim yaşanmıştır. Doğal bileşiklerin keşfi ise sadece 20 yıl sürmüştü ve bunu takip eden 50 yıl boyunca, bu bileşiklerin modifikasyonları ile etkili yeni antibiyotikler elde edilmiştir [2]. Ancak, bakteriler bu ilaçlara karşı direnç geliştirdikleri ve bu direnç mekanizmalarını genler aracılığı ile diğer bakterilere aktarabildikleri için; varolan çekirdek yapıların türevlendirilmesi yöntemi bir süre sonra etkisini yitirecektir. Bu yüzden; ilaç geliştirme çalışmalarında, yeni moleküler hedeflerin keşfedilmesi veya yeni çekirdek yapıların bulunması gerekmektedir [2-4].

Taurin (2-aminoetansülfonik asit), vücutta bulunan tek serbest β -aminoasittir ve diğer amino asitler gibi ilginç bir biyolojik paradoks sergilemektedir (Şekil 1) [5]. Bakteriler, yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için taurini azot, karbon ve sülfür kaynağı olarak kullanmaktadır. Diğer yandan, molekül insanlarda taurinkloramine dönüşerek antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermektedir [6]. Bu bileşiğin modifikasyonu ile elde edilen NVC-422 (N,N-dikloro-2,2-dimetiltaurin) kodlu bileşiğin geniş spektrumlu bir antibakteriyel ajan olduğu bildirilmiştir. Bileşik faz II çalışmalarına kadar ulaştıysa da ilaç olarak onay alamamıştır (Şekil 1) [7]. Taurin molekülünde yapılan küçük modifikasyonların etkili antibakteriyel bileşikler verdiği gözlenmektedir. Ancak sistematik olarak modifiye edilen taurin türevlerinin antibakteriyel etkisinin incelendiği kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.



Şekil 1 Taurin ve NVC-422 no lu bileşiğin açık kimyasal formülü

Önceki çalışmalarımızda; taurinin antibakteriyel aktivitesi bilinen sülfanilamid ile yaptığı konjugatları ile bir seri bileşik hazırlanmış ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir [8,9]. Taurin-sülfanilamid konjugatının imit (I), amit (II) ve tersiyer amin (III, IV) olarak türevlendirilmesi sonucunda elde edilen bileşiklerin S. aerous ve E. coli bakterisine gösterdiği minimum inhibitör konsantrasyonun değiştiği saptanmıştır (Tablo 1). Elde edilen bilgilerden yola çıkarak, bu çalışmada bir grup üre ve tiyoüre grubu ile türevlendirilmiş taurin-sülfanilamid konjugatının antimikrobiyal aktivitesinin değerlendirilmesi planlanmıştır.



Şekil 2 Önceki çalışmalarda araştırılan (I, II, III, IV) ve bu projede araştırılacak bileşiklerin (1-16) genel kimyasal formülleri

Tablo 1 Önceki çalışmalarda elde edilen bileşiklerin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK, µg/ml)

Bileşik	Gram (+) S. aureus	Gram (-) E. coli
I	2048	2048
II	512	512
III	512	1024
IV	2048	512
Siprofloksazin	0.25	0.008

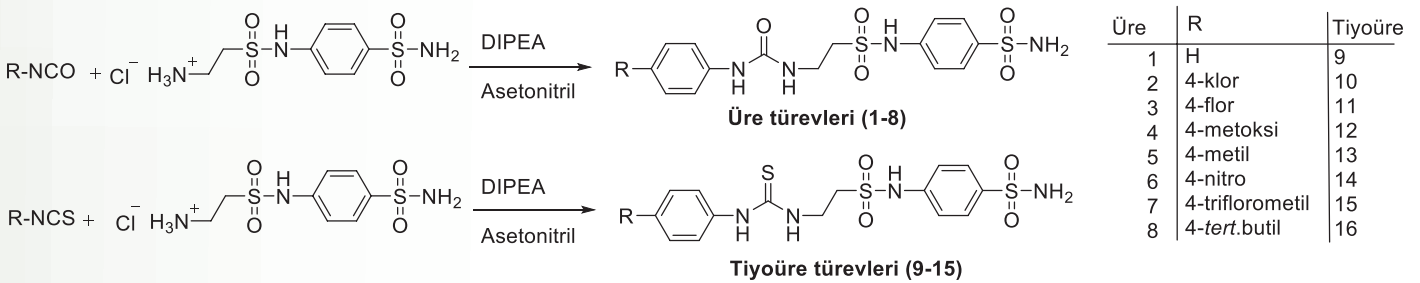
GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Sentez çalışmalarında kullanılan başlangıç maddeleri ve çözücüler Merck ve İnterlab firmasından temin edildi.

Sentez

Taurin türevleri, literatürde Akgül ve ark. tarafından bildirilen yöntemle sentezlendi [10,11].



Antimikrobiyal aktivite çalışmaları

Final ürünlerin antimikrobiyal aktivite taramaları Broth Mikrodilüsyon Metodu kullanılarak, literatürde bildirilen yöntemle gerçekleştirildi (**Tablo 2**) [9].

Tablo 2 Bileşiklerin in vitro anti-bakteriyel aktivite taraması sonucunda elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) değerleri

Bakteri suşları			Bakteri suşları		
Bileşik No	Gram (+) S. aureus	Gram (-) E. coli	Bileşik No	Gram (+) S. aureus	Gram (-) E. coli
1	2048	>2048	9	128	2048
2	>2048	1024	10	512	2048
3	>2048	2048	11	512	1024
4	2048	>2048	12	>2048	>2048
5	>2048	2048	13	512	2048
6	2048	>2048	14	512	2048
7	2048	>2048	15	1024	1024
8	1024	>2048	16	1024	2048
Siprofloksazin	0.25	0.008			

BULGULAR VE TARTIŞMA

Aktivitesi incelenen bileşiklerin antimikrobiyal aktivite sonuçları Tablo 2'de özetlenmektedir. Üre türevleri (1-8) S. Aureus ve E. Coli bakterilerine karşı 1024-2048 $\mu\text{g/ml}$ değerleri arasında düşük antimikrobiyal aktivite sergilemişlerdir. Oysa 1 no lu bileşikteki üre grubunun tiyoüre ile yer değiştirmesi sonucunda elde edilen 9 no lu bileşiğin S. Aureus'a gösterdiği aktivitenin 16 kat arttığı (128 $\mu\text{g/ml}$) saptanmıştır. Diğer taraftan; 9 no lu bileşiğin klor, flor, metil ve nitro ile sübtitüsyonu sonucunda elde edilen tiyoüre türevlerinin (sırasıyla 10, 11, 13 ve 14 no lu bileşikler) karşılık geldikleri üre türevlerinden (sırasıyla 2, 3, 5 ve 6 no lu bileşikler) 4 kat daha yüksek aktivite sergiledikleri gözlenmiştir. Ancak final ürünlerden hiçbiri standart bileşik siprofloksazin kadar etkili bulunmamıştır.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, 16 adet üre ve tiyoüre türevi bileşiğin antimikrobiyal aktivitesi değerlendirilmiştir. Üre türevlerinin tiyoüre türevlerine göre düşük aktivite profili sergiledikleri saptanmıştır. Bileşikler arasından en yüksek aktiviteyi; 4-((2-(3-feniltiyoürido)etil)sülfonamido) benzen sülfonamid (9 no lu) bileşiği gram (+) S. Aerous suşuna karşı göstermiştir. Bileşiklerin çözünürlük değerlerinin bir sonucu olarak, bakteri lipit membranından hidrofilik sitoplazmik çevreye geçememiş olabilecekleri ve bu yüzden genel olarak düşük antimikrobiyal aktivite profili sergiledikleri düşünülmüştür. Sonuç olarak; bir sonraki çalışmada daha lipofilik türevlerin tasarlanması planlanmıştır.

KAYNAKÇA

- [1] Idrees M, Mohammad AR, Karodia N, Rahman A. Multimodal Role of Amino Acids in Microbial Control and Drug Development. *Antibiotics*. 2020; 9:330.
- [2] Walsh CT, Wencewicz TA. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *J Antibiot (Tokyo)*. 2014; 67:7-22.
- [3] Docquier J-D, Cusi MG. Editorial overview: Anti-infectives: Towards novel antiviral and antibacterial drugs? Current approaches to address a growing medical need. *Curr Opin Pharmacol*. 2014; 18:iv-vi.
- [4] Capasso C, Supuran CT. Anti-infective carbonic anhydrase inhibitors: a patent and literature review. *Expert Opin Ther Pat*. 2013; 23:693-704.
- [5] Vanitha MK, Baskaran K, Periyasamy K, Saravanan D, Ilakkia A, Selvaraj S, Venkateswari R, Mani BR, Anandakumar P, Sakthisekaran D. A Review on the Biomedical Importance of Taurine. *Int J Pharma Res Heal Sci*. 2015; 3:680-686.
- [6] Martinez-Losa M, Cortijo J, Piqueras L, Sanz MJ, Morcillo EJ. Taurine chloramine inhibits functional responses of human eosinophils in vitro. *Clin Exp Allergy*. 2009; 39:537-546.
- [7] Darouiche D, Najafi R, Krantz K, Debabov D, Friedman L, Khosrovi B, Wang L, Iovino S, Anderson M. NVC-422. *Drugs Future*. 2011; 36:651.
- [8] Akgül Ö, Öztürk İ, Aygül A, Ermertcan Ş. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Taurinamide Derivatives. *Marmara Pharm J*. 2017; 21:361-361.
- [9] Akgül Ö, Ateş, Ayşegül, Ermertcan Ş. Antimicrobial Activity Evaluation of Newly Synthesized N,N-Disubstituted Taurinamidobenzenesulfonamide Derivatives. *J Turkish Chem Soc Sect A Chem*. 2021; 8:323-330.
- [10] Akgül Ö, Angeli A, Vullo D, Carta F, Supuran CT. Unconventional amino acids in medicinal chemistry: First report on taurine merged within carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg Chem*. 2020; 103:104236.
- [11] Akgul O, Singh S, Andring JT, McKenna R, Selleri S, Carta F, Angeli A, Supuran CT. Handling drug-target selectivity: A study on ureido containing Carbonic Anhydrase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2021; 212:113035.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu [TÜBİTAK 116S705] ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Destek Programı [BAP 2018.BİL.002] tarafından desteklenmiştir.

Sedanur EKREK¹, Sevil ŞENKARDEŞ¹, Ömer ERDOĞAN², Özge ÇEVİK²

¹Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34854 İstanbul.

²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 09010 Aydın.

(e-posta: sedaekrek@gmail.com)

GİRİŞ

Kanserin saptanması ve tedavisinde kayda değer ilerlemeler olmasına rağmen, artmaya devam eden malignite ile en önemli klinik zorluklardan biri olmaya devam etmektedir.

Hidrazino-tiyazoller, potansiyel biyoaktif ajanların tasarlanması için çok yönlü yapı iskeleleridir. Bu bileşikler, antibakteriyel [1,2] anti-artritik [3], antikanser [4] ve antioksidan [5] aktiviteler gibi geniş biyolojik aktivite spektrumu için rapor edilmiştir. Son zamanlarda, Sayed ve ark. 2-(2-(benziliden)hidrazinil)-5-(1-(2-(5-((2,4-diklorofenil)diazenil)-4-metiltiazol-2-il)hidrazono)etil)-4-metiltiyazol' ün çoğalma önleyici özelliklerini bildirmiştir. Sentezlenen bileşiğin HepG2 hücre hattına karşı IC50 değeri 2.31 µM ve HCT-116 hücre hattı karşı IC₅₀ değeri 3.65 µM olduğu belirtilmiştir [6]. Etil 4-okso-2-(2-(4-(2-okso-2-(piridin-2-ilamino)etoksi)benziliden)-hidrazinil)-4,5-dihidrotiyazol-5-karboksilat MCF-7 hücre hattına karşı umut verici antikanser aktivite gösterdiği bildirilmiştir [7]. Etil 2-(2-(1-(6-bromo-2-okso-2H-kromen-3-il)etiliden) hidrazinil)-4-metiltiyazol-5-karboksilat bileşiğinin antikanser aktivitesi Hela kanser hücre hattına karşı taranmış ve IC50=0.0091 µM değeri ile etkili olduğu gösterilmiştir [8]. Ayrıca, Riyadh ve ark. tarafından sentezlenen sülfonamid grubu içeren tiyazol türevleri MCF-7 kanser hücrelerine karşı MTT testlerine tabi tutulmuş iyi aktivite gösterdiği bildirilmiştir [9].

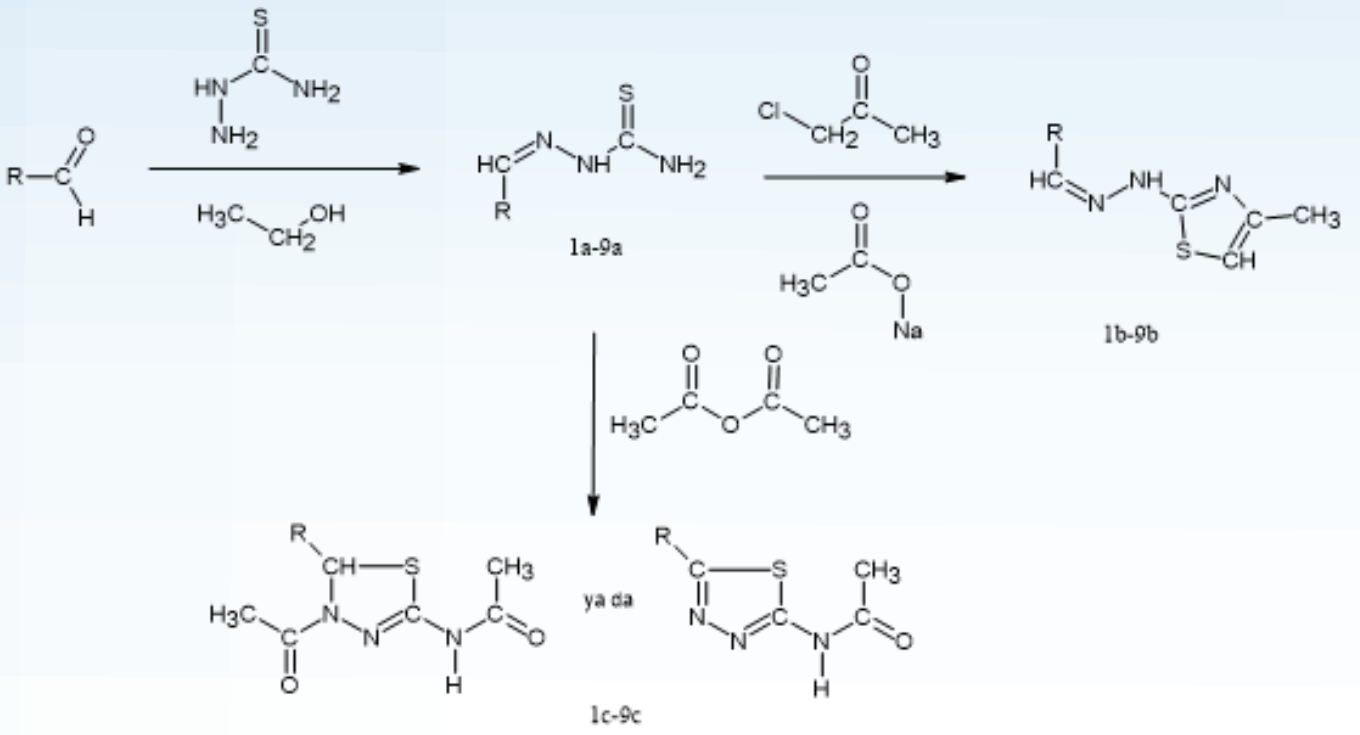
1,3,4-tiyadiazol halka sistemi, biyolojik olarak önemli bir dizi molekülün çekirdek yapısını temsil eder ve türevleri geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir [10-13]. Piyasada antiprotozoal etkili Megazol, karbonik anhidraz inhibitörü Asetazolamid, antihiperglisemik etkili Glibuzol, antibiyotik etkili Sefazolin ve antibakteriyel etkili Sülfametizol gibi tiyadiazol kısmı içeren bazı farklı ilaçlar mevcuttur.

Bu nedenle bu çalışmanın amacı; tiyazol ve tiyadiazol kısımları içeren yeni moleküller hazırlamak ve tüm bileşiklerin çeşitli kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Tiyosemikarbazit'den hareketle süstitüe aldehitler kullanılarak önce 2-(arilmetilen)hidrazinokarbotiyoamit [1a-9a], sonrasında bu bileşiklerin kloroaseton ile ısıtılmasıyla 1,3-tiyazol bileşikleri [1b-9b] [14], asetik anhidrit ile ısıtılmasıyla ise 1,3,4-tiyadiazol halkası taşıyan bileşikler [1c-9c] sentezlenmiştir [15]. Tüm bileşikler için genel sentez yöntemi, Şekil 1'de gösterilmektedir.



R= 4-bromotiyofen-2-il, mesital, 2,6-diflorofenil, 2,5-diflorofenil, 3,4-diflorofenil, 3,4-dimetilfenil, 2-naftil,4-(4-florobenziloksi)fenil, 4-(triflorometoksifenil)

Şekil 1 Genel sentez reaksiyonu

Hücre kültürü çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin sitotoksik taramaları HeLa serviks kanseri hücre hattı, MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve HT-29 kolon kanseri hücre hattı ile 24 saat muamele edilen bileşiklerin sitotoksikite sonuçları MTT testi ile belirlenmiştir. Normal hücelere karşı etkisini araştırmak için L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bileşik **1b-9b**'nin IR spektrumunda, C=N hidrazon varlığını doğrulayan bantlar $1591-1622\text{ cm}^{-1}$ de görülmüştür. Bu bileşiklerin $^1\text{H-NMR}$ verileri, azometin protonları için δ 7.94-8.31 ppm arasında ^1H integrasyonunda singlet olarak gözlemlenmiştir.

1c-9c bileşikleri, karbonil grupları için $1692-1703\text{ cm}^{-1}$ aralığında IR absorpsiyonları ile karakterize edilir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde asetamit protonları δ 2.17-2.30 ppm civarında singlet olarak; bileşik **3c** ve **9c**' de ise, ikinci asetamit kısmı singlet olarak δ 2.05-2.07 ppm aralığında görülmüştür.

Antikanser etki çalışmaları

Serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücresine karşı yapılan biyolojik aktivite tayini neticesinde tiyazol halkası taşıyan seride en etkili bileşik 2-naftil sübtitüentli **8b** ($\text{IC}_{50}=12,44\text{ }\mu\text{M}$) ve 4-trifluorometoksifenil sübtitüentli **9b** ($\text{IC}_{50}=12,31\text{ }\mu\text{M}$) iken, tiyadiazol halkalı seride yine 2-naftil sübtitüenti içeren **8c** ($\text{IC}_{50}=13,76\text{ }\mu\text{M}$) bileşiği olmuştur.

MCF-7 meme hücre hattına karşı en etkili bileşik $\text{IC}_{50}=7,73\text{ }\mu\text{M}$ değeri ile 2,5-difluorofenil halkası içeren **4b** bileşiği ve $\text{IC}_{50}=8,05\text{ }\mu\text{M}$ değeri ile **9b** bileşiği iken, tiyadiazol halkası içeren serideki en etkili bileşik $\text{IC}_{50}=7,58\text{ }\mu\text{M}$ ile 2,6-difluorofenil sübtitüentine sahip **2c** bileşiği olarak tespit edilmiştir.

HT-29 kolon kanseri hücre hattına karşı yapılan sitotoksosite çalışması sonucunda, yaklaşık 22,01 μM IC_{50} değeri ile **8b** bileşiği ve diğer seride 23,77 μM IC_{50} değeri ile 2c bileşiği en etkili bileşikler arasında yer almaktadır (Tablo 1).

Tablo 1 Bileşiklerin sitotoksosite sonuçları.

IC_{50} değerleri (μM)				
Bileşik No	HeLa	MCF-7	HT-29	L929
1b	117,30	799,50	248,40	13,85
2b	118,40	77,38	248,20	12,77
3b	30,06	48,27	23,45	143,90
4b	15,55	7,73	55,59	115,70
5b	1128,20	188,39	278,01	1114,64
6b	130,80	172,67	172,20	105,90
7b	126,40	77,90	229,30	126,92
8b	12,44	38,32	22,01	212,60
9b	12,31	8,05	27,04	304,05
1c	131,00	83,80	281,61	193,61
2c	42,58	7,58	23,77	186,64
3c	124,30	751,80	1233,3	168,31
4c	127,60	811,10	273,90	181,03
5c	112,60	1077,80	496,30	155,30
6c	119,80	725,10	256,42	153,40
7c	121,70	704,80	245,30	59,81
8c	13,76	18,01	45,91	165,70
9c	408,10	727,60	677,41	961,62

SONUÇLAR

Potansiyel antikanser ajanlar olarak bir dizi tiyadiazol ve tiyazol bazlı küçük moleküller tasarlanmış ve sentezlenmiştir. 1b ve 2b bileşiklerinin normal hücre hattına karşı sitotoksik olduğu gözlemlenirken, 2c, 3b, 8b, 8c ve 9b bileşiklerinin kanser hücrelerine karşı güçlü sitotoksik etkisi olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, bu aktif bileşiklerin kanser için potansiyel terapötik ajanlar olduğunu göstermektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Hampannavar GA, Karpoomath R, Palkar MB, Shaikh MS, Chandrasekaran B. Dehydrozingerone Inspired Styryl Hydrazine Thiazole Hybrids as Promising Class of Antimycobacterial Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* 2016;7(7):686–691.
- [2] Baba NHK, Ashok D, Rao BA, Madderla S, Murthy YS. Microwave Assisted Synthesis and Biological Activity of Novel Bis-[2-[2-(substituted benzylidene)hydrazinyl]thiazole] Derivatives. *Russ. J. Gen. Chem.* 2018;88(3):580-586.
- [3] Li S, Luan G, Ren X, Song W, Xu L, Xu M, Zhu J, Dong D, Diao Y, Liu X, Zhu L, Wang R, Zhao Z, Xu Y, Li H. enzyliidenehydrazinyl-Substituted Thiazole Derivatives as Potent Inhibitors of Human Dihydroorotate Dehydrogenase with in Vivo Anti-arthritic Activity. *Sci. Rep.* 2015;5:1-19.
- [4] Dawood KM, Raslan MA, A. Abbas AA, Mohamed BE, Abdellattif MH, Nafie MS., Hassan MK. Novel Bis-Thiazole Derivatives: Synthesis and Potential Cytotoxic Activity Through Apoptosis With Molecular Docking Approaches *Front. Chem.* 2021;9: 1-16.
- [5] Shih MH, Su YS, Wu CL. Syntheses of aromatic substituted hydrazino-thiazole derivatives to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles *Chem. Pharm. Bull.* 2007;55:1126-1135.
- [6] Sayed AR, Gomha SM, Taher EA, Muhammad ZA, El-Seedi HR, Gaber HM, Ahmed MM. One-Pot Synthesis of Novel Thiazoles as Potential Anti-Cancer Agents. *Drug Des. Devel. Ther.* 2020;14:1363-1375.
- [7] Alqahtani AM, Bayazeed AA. Synthesis and antiproliferative activity studies of new functionalized pyridine linked thiazole derivatives. *Arab. J. Chem.* 2021;14(1):1-14.
- [8] Abd El-Karim SS, Syam YM, El Kerdawy AM, Abdelghany TM. New thiazol-hydrazono-coumarin hybrids targeting human cervical cancer cells: Synthesis, CDK2 inhibition, QSAR and molecular docking studies. *Bioorg. Chem.* 2019;86:80-96.
- [9] Riyadh SM, El-Motairi SA, Ahmed HEA, Khalil KD, Habib ESE. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking of Novel Thiazoles and [1,3,4]Thiadiazoles Incorporating Sulfonamide Group as DHFR Inhibitors. *Chem. Biodivers.* 2018;15(9)
- [10] Tatar E, Yaldız S, Kulabaş N, Vanderlinden E, Naesens L, Küçükgülzel İ. Synthesis and structure-activity relationship of L-methionine-coupled 1,3,4-thiadiazole derivatives with activity against influenza virus. *Chem. Biol. Drug Des.* 2022;99(3):398-415.
- [11] Karakuş S, Rollas S. Synthesis and Antimycobacterial Activity of some 2-(4-Aminophenyl)-5-Substitutedamino-1,3,4-thiadiazole Derivatives and Their Coupling Products. *Marmara Pharm. J.* 2016;20(2):199-206.
- [12] Jain AK, Sharma S, Vaidya A, Ravichandran V, Agrawal RK. 1,3,4-Thiadiazole and its Derivatives: A Review on Recent Progress in Biological Activities. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013;81:557-576.
- [13] Hu Y, Li CY, Wang XM, Yang YH, Zhu HL. 1,3,4-Thiadiazole: Synthesis, Reactions, and Applications in Medicinal, Agricultural, and Materials Chemistry. *Chem. Rev.* 2014;114:5572-5610.
- [14] Salman AS, Mahmoud NA, Abdel-Aziem A, Mohamed MA, Elsis DM. Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic evaluation of some novel heterocyclic compounds bearing indole ring. *J Org Chem.* 2016;6:39-53
- [15] Badr SMI. Synthesis and antiinflammatory activity of novel 2,5-disubstituted thiophene derivatives. *Turk J Chem.* 2011;35:131-143

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2021-10209 numaralı proje ile desteklenmiştir.

1,2,4-TRIAZOL HALKASI İÇEREN YENİ TİYOETER TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

P22

Selma CRNIŞANIN¹, Necla KULABAŞ², Merve GÜRBOĞA³, Gamze ÇİFTÇİ⁴, Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR³, Kemal YELEKÇİ⁴, İlkay KÜÇÜKGÜZEL²

¹ Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34854 İstanbul.

² Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34854 İstanbul.

³ Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 34854 İstanbul.

⁴ Kadir Has Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyoinformatik ve Genetik Bölümü, 34083 İstanbul

(e-posta: selmacrisanin@marun.edu.tr)

GİRİŞ

Dünya çapında yeni antikanser ilaçları bulmak için araştırmalar sürüyorken, insidansın sürekli artması, şu an kullanılmakta olan ilaçların sayısız yan etkilerinin yanı sıra tümörlerin ilaçlara karşı gelişen dirençleri, daha güvenli etki profiline sahip yeni moleküller için sürekli arayışı teşvik etmektedir [1].

Mikrozomal prostaglandin E2 sentaz 1 (mPGES-1) önemli bir PGE sentazıdır ve son zamanlarda çeşitli kanser türlerinde yüksek seviyelerde eksprese edildiği rapor edilmiştir. mPGES-1 enzimi, eikozanoid ve glutatyon metabolizmasında yer alan membrana bağlı protein süper ailesinin bir üyesidir [2]. COX genlerinin ve ürünlerinin insan solid tümörlerinin ilerlemesinde rol oynadığına dair kanıt, bu genlerin ekspresyonunu kontrol eden ilaçların (başta COX-2 inhibitörleri olmak üzere) klinik uygulaması için ana itici gücü sağlamıştır. COX-2 genini inhibisyonun mantığı, pro-tümörijenik bir etki uygulayan araşidonik asidin PGE2'ye enzimatik dönüşümünü azaltmaktır. Uzun zamandır müdahalelerin odak noktası olan COX-2 inhibitörleri tarafından PGE2 oluşumunun önlenmesi, güvenlik profilleriyle ilgili endişeler nedeniyle bir şekilde dışlanmıştır. PGE2 sentazları (mPGES-1, mPGES-2 ve cPGES), özellikle indüklenebilir mikrozomal PGE2 sentaz tip-1 (mPGES-1) ile müdahale edilmesi büyük ilgi uyandırmıştır [3]. Bu enzim, tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenebilir. Araştırmalar, uzun süreli klasik nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ve COX-2 inhibitörlerinin kullanımıyla ilişkili kardiyovasküler risklerin azaltılması için mPGES-1 inhibitörlerinin yeni bir hedefi temsil edebileceğini öne sürmekle birlikte bu grup moleküllerin tümör büyümesini baskılayabileceğini de öne sürmektedir [4]. mPGES-1 enziminin 1999 yılında keşfedilmesinden bu yana farklı mPGES-1 enzim inhibitör türleri rapor edilmiştir, ancak çok azı in vivo aktiviteyi sürdürmesine rağmen FDA onayı alamamıştır [5].

1,2,4-Triazol ve türevlerinin kimyası, sentezleriyle ilgili zengin literatür ve biyolojik etkiye sahip önemli temsilcileri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Deneysel çalışmalar, 4H-1,2,4-triazol-3-tiyon yapısı içeren bileşiklerin antimikrobiyal, antikanser, antikonvülsan etkiler de dâhil olmak üzere çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduklarını göstermiştir [6,7].

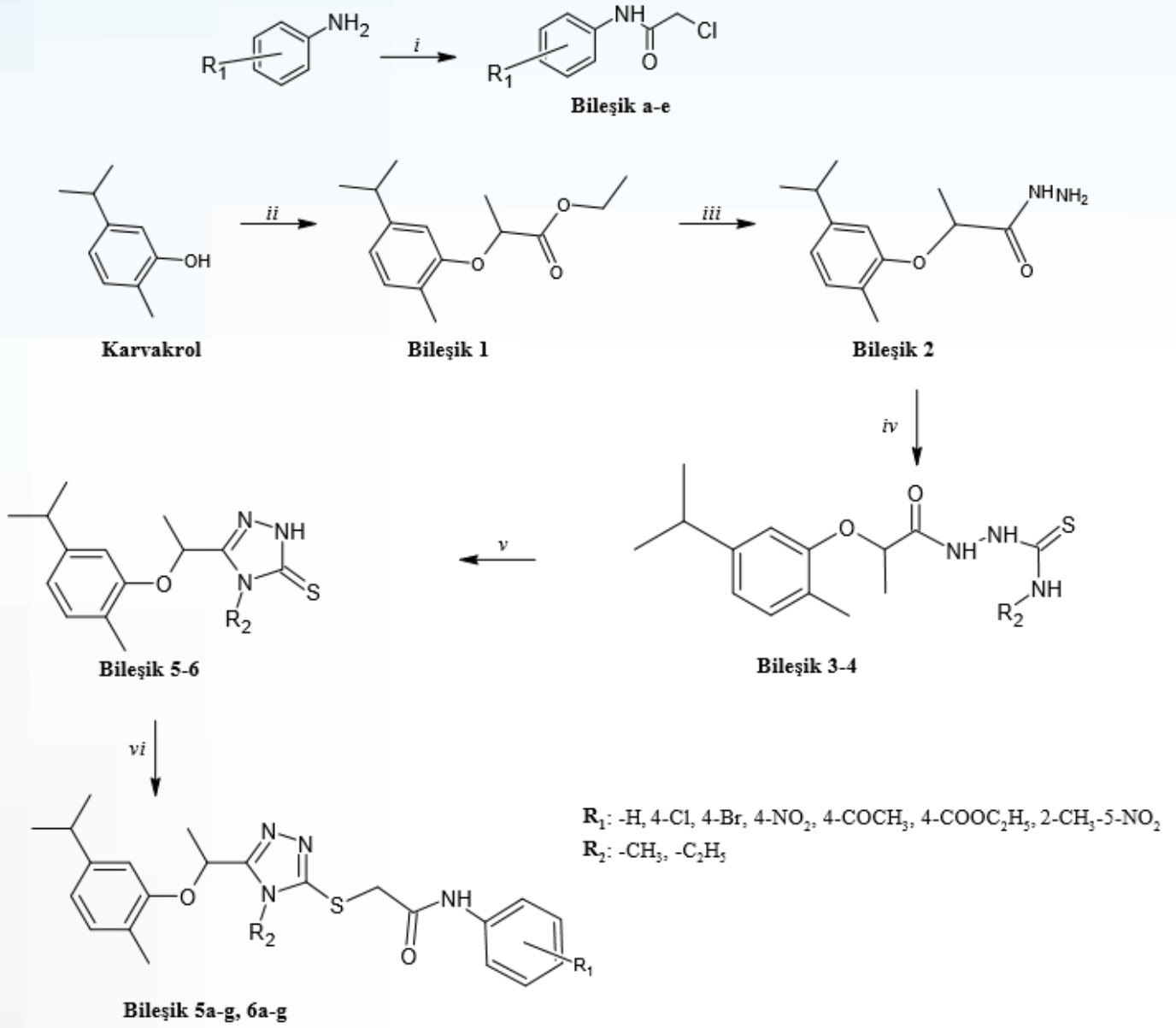
Karvakrol, özellikleri ve farklı alanlardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle ilgi çekici bir doğal maddedir. Karvakrolün iyi bilinen antimikrobiyal [8], antitümör [9], antitrombositler, analjezik, antiinflamatuvar [10], antianjiyojenik, antioksidan, antielastaz, böcek öldürücü, antiparazitik, hücre koruyucu ve AChE inhibitör gibi aktivitelerinin ardından son 10 yıldır antitümör ve antiproliferatif etkiler de gösterdiği bildirilmiştir [11]. Literatürlerden elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda olası antikanser etkili 1,2,4-triazol çekirdeği taşıyan türevlerin sentezlenmesi ve analizlerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Çalışma sırasında 2-[(5-sübstitüe-4H-1,2,4-triazol-3-il) sülfanil]-N-(sübstitüe fenil)asetamit yapısına sahip 14 orijinal bileşik sentezlenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, etil 2-[2-metil-5-(propan-2-il)fenoksi]propanoat [12] molekülünden hareketle 14 tane yeni 4H-1,2,4-triazol-3-tiyon türevi sentezledi. 1,2,4-triazoller, 2-[(5-sübstitüe-4H-1,2,4-triazol-3-il)sülfanil]-N-(sübstitüe fenil)asetamit türevlerini verecek şekilde DMF içinde kloroasetamit türevleriyle reaksiyona sokuldu. Tepkime şeması Şekil 1'de gösterilmiştir.

2-[(5-Sübstitüe-4H-1,2,4-triazol-3-il)sülfanil]-N-(sübstitüe fenil)asetamit türevlerinin sentezi Kulabaş ve ark. tarafından bildirilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir [13].

Yapılan sentez çalışmaları süresince son ürünün saflığı, kullanılan Zıt Fazlı Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi ile saptanmış ve FT-IR, ¹H-NMR ve kütle spektral verileri kullanılarak yapıları tanımlanmıştır.



Tepkime koşulları: *i*) ClCH₂COCl, DMF 0-5°C; *ii*) Br-CH(CH₃)COOEt; *iii*) NH₂NH₂·H₂O, EtOH, 90°C; *iv*) R-NCS, EtOH, 100°C; *v*) 2N NaOH, %10 HCl, 100°C; *vi*) Bileşik a-e, K₂CO₃, DMF, 55°

Şekil 1 2-[(5-Sübstitüe-4H-1,2,4-triazol-3-il)sülfanil]-N-(sübstitüe fenil)asetamit türevlerinin sentez şeması

Hücre Kültürü Çalışmaları

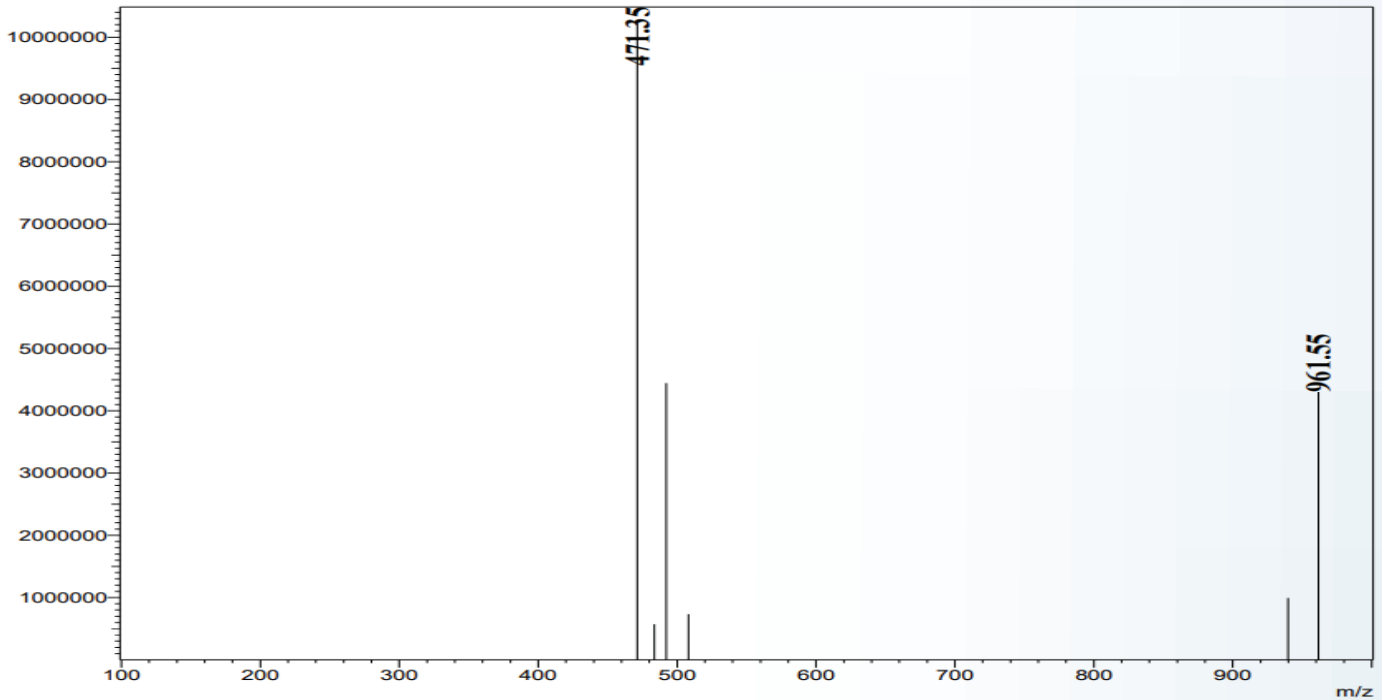
Yapılan çalışmalarda, insan kronik myeloid lösemi, K562 (ATCC, CCL243); insan meme kanseri, MCF- 7 (ATCC, HTB22); insan akciğer kanseri, A549 (ATCC, CCL-185), insan prostat kanseri, PC-3 (ATCC, CRL-1435) hücreleri ile nonkanserojenik fare embriyonik fibroblast hücresi NIH3T3 kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hücreler, %10 FBS, %1 penisilin streptomisin ve %1 L-glutamin, içeren DMEM ile hazırlanan kültür medyumu kullanılarak hücre flasklarında çoğaltılmış ve 5. pasaj sonunda hücre sayımı yapılarak tripan mavisi ile hücrelerin canlılıkları belirlenmiştir.

Moleküler Modelleme Çalışmaları

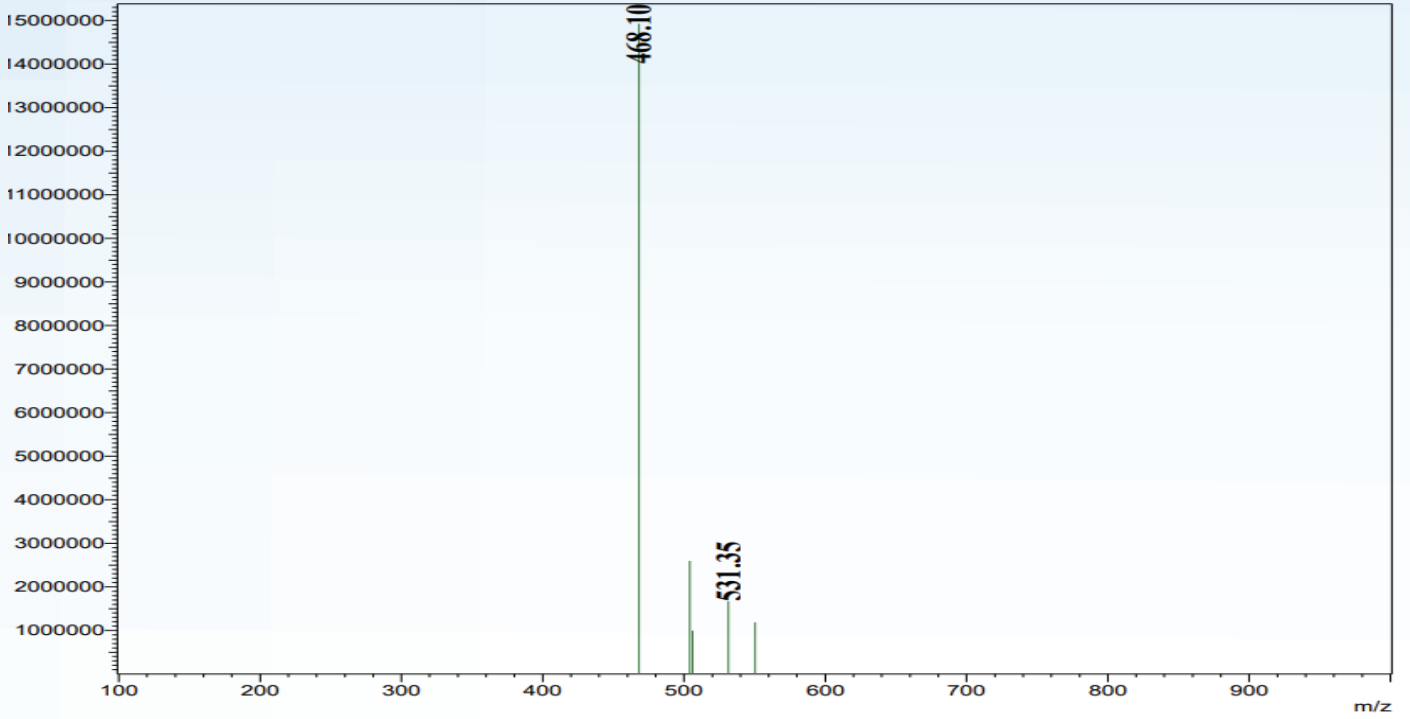
Deneyssel olarak belirlenen 14 molekül ve referans molekül (MK-886 [14]) yapıları Biovia Discovery Studio 4.5 (DS) (Dassault Systemes BIOVIA, 2017) programı kullanılarak modellenmiş ve optimize edilmiştir. DS ligand hazırlama aracını kullanarak. Moleküler modelleme çalışmalarında kullanılan mPGES-1 enzimi (PDB ID: 5K0I, çözünürlük: 1.30 Å) [15] bir çevrimiçi protein veri tabanı olan Protein Data Bank'tan (<https://www.rcsb.org>) alınmıştır. Proteinler, BIOVIA "Prepare Macromolecule" araç seti ile sanal taramalar için hazırlanmıştır. Tüm moleküler modelleme çalışmaları için rigid protein ve esnek ligand olacak şekilde AutoDock 4.2.6 yerleştirme programı (<http://autodock.scripps.edu>) [16] kullanılmıştır. mPGES-1 enziminin bağlanma bölgesinin merkez koordinatları sırasıyla 9.697, 15.296, 27.28 (x, y, z) şeklinde belirlenmiş ve boyutlar 50 × 50 × 50 Å olacak şekilde seçilmiştir. Ligandlar ve protein komplekslerinin aktif bölgeleri arasındaki etkileşimleri incelemek için BIOVIA programı kullanılarak görselleştirme yapıldı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

N-(4-Nitrofenil)-2-[(4-metil-5-{1-[2-metil-5-(propan-2-il)fenoksi]etil}-4H-1,2,4-triazol-3-il) sülfanil]asetamid (**5d**): M.a.: 469.556 g/mol. E.n.: 156.5-157.0 °C, İTK Rf: 0.175 (Petrol Eteri: Etil asetat (70:30 h/h)), YBSK R t : 2.94 dk , verim %65. IR cm^{-1} : 3194 (N-H g.b.), 3127-2959 (C-H g.b.), 1707 (C=O g.b., Amid I bandı), 1615, 1562, 1505 ve 1483 (C=N g.b., N-H e.b. Amid II bandı ve C=C g.b.), 845 ve 802 (aromatik C-H e.b.), 673 (C-S g.b.). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 1.01-1.14 (q, 6H, J= 6.75 Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.66 (d, 3H, J= 6.6 Hz, $-\text{OCHCH}_3$); 2.07 (s, 3H, Ar- CH_3); 2.73-2.82 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3.55 (s, 3H, N- CH_3); 4.18 (s, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-$); 5.78 (q, 1H, J= 6.6 Hz, $-\text{OCHCH}_3$); 6.74 (dd, 1H, J= 1.2 ve 1.5 Hz, J= 7.5 Hz, Ar-H); 6.90 (d, 1H, J= 1.2 Hz, Ar-H); 7.04 (d, 1H, J= 7.5 Hz, Ar-H); 7.80 (d, 2H, J= 9 Hz, Ar-H); 8.23 (d, 2H, J= 9 Hz, Ar-H); 10.94 (s, 1H, $-\text{NH}-$). $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ için hesaplanan %C:64.35 H:6.48, N:12.01, S:6.87; bulunan %C:56.30 H:5.944, N:14.58, S:6.285. LR-MS (ESI) (m/z): Hesaplanan $[\text{M}+2]^+$: 471.17, Bulunan: 471.35. Hesaplanan $[\text{M}-\text{H}]^-$: 468.17, Bulunan:468.10.

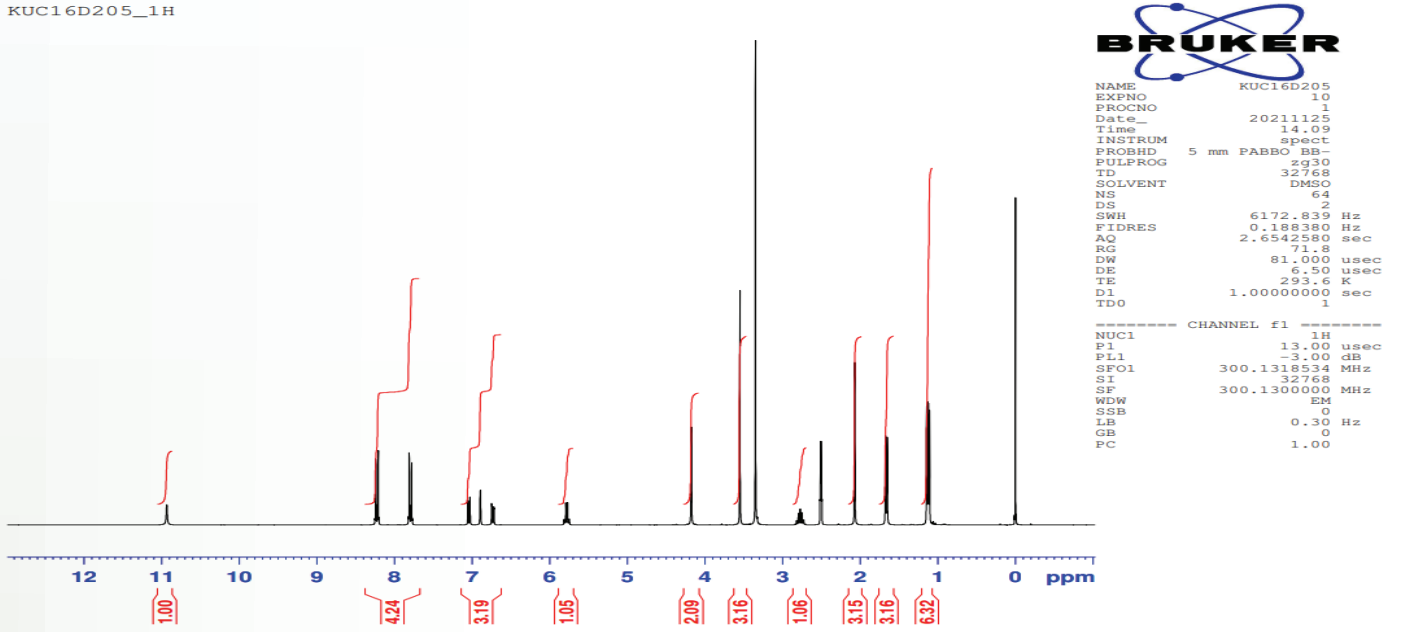


Şekil 2 Bileşik 5d'ye ait Kütle Spektromu (Pozitif iyon)



Şekil 3 Bileşik 5d'ye ait Kütle Spektromu (Negatif iyon)

KUC16D205_1H



Şekil 4 Bileşik 5d'ye ait 1H-NMR spektrumu

In *siliko* moleküler modelleme çalışmaları sentezlenen bileşikler arasında en yüksek mPGES-1 inhibisyon potansiyeline sahip bileşiğin 2-kloro-*N*-(4-nitrofenil) asetamit kullanılarak kazanılan bileşik 5d olduğunu göstermiştir (Tablo 1). Aktif bölge etkileşimleri için ilgili görseller poster bildiride sunulacaktır.

Tablo 1 Sentezlenen bileşik 5a-g ve 6a-g'nin mPGES-1 enziminin aktif bölgesine bağlanma enerjileri

Bileşik	Bağlanma Enerjisi, ΔG (kcal/mol)	Bileşik	Bağlanma Enerjisi, ΔG (kcal/mol)
5a	-6.93 (R)	6a	-6.67 (R)
	-7.15 (S)		-6.99 (S)
5b	-7.06 (R)	6b	-7.50 (R)
	-7.48 (S)		-7.82 (S)
5c	-7.24 (R)	6c	-7.97 (R)
	-7.65 (S)		-7.06 (S)
5d	-8.40 (R)	6d	-7.60 (R)
	-8.09 (S)		-8.08 (S)
5e	-7.89 (R)	6e	-7.76 (R)
	-7.56 (S)		-7.10 (S)
5f	-7.16 (R)	6f	7.04 (R)
	-6.97 (S)		-6.40 (S)
5g	-8.31 (R)	6g	-7.44 (R)
	-8.08 (S)		-7.94 (S)
MK886	-7.38		

Çeşitli kanser hücre hatlarında yüksek inhibisyon potansiyeline sahip 5 bileşiğe ait veriler Tablo 2'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar 5b, 5c, 5d numaralı bileşiklerin MCF-4 ve PC-3 kanser hücre hatları üzerinde çok yüksek bir antikanserojenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bileşik 5d'nin ilk 24 saat içinde metabolik aktivitede yüksek bir azalmaya yol açtığı ve kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivitesine ek olarak normal hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

Tablo 2 . Sitotoksiste çalışmalarında tespit edilen en aktif bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerine karşı inhibisyon potansiyelleri

% İnhibisyon					
Bileşik adı	MCF7	A549	PC-3	K562	NIH3T3
5b	60,42	46,79	82,19	10,36	65,8
5c	72,79	56,44	82,14	16,05	69,45
5d	83,02	62,13	83,11	21,45	-17,74
5e	48,59	21,33	75	-0,42	22,17
6a	63,68	22,95	40,05	13,63	30,4

SONUÇLAR

Çalışma sırasında 2-[(5-süstitüe-4H-1,2,4-triazol-3-il)sülfanil]-N-(süstitüe fenil)asetamit türevi olan 14 bileşik orijinal bileşik sentezlendi ve karakterize edildi. Sentezlenen bileşikler arasında özellikle bileşik 5d'nin kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif aktivitesine ek olarak normal hücreler üzerinde sitotoksik etki değerli oldukça düşük olduğundan seçici bir inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte bileşik 5d en yüksek mPGES-1 enzim inhibisyon potansiyeli de sergilemiştir. Bu sonuçlar sentezlenen türevlerin kanser araştırmalarında umut verici antitümör ajanlara ulaşılmasında öncül moleküller olabileceklerini göstermiştir.

KAYNAKÇA

- [1] Xu Z, Zhao SJ, Liu Y. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. *Eur J Med Chem*. 2019;183:111700
- [2] Kamata H, Hosono K, Suzuki T, et al. mPGES-1-expressing bone marrow-derived cells enhance tumor growth and angiogenesis in mice. *Biomed Pharmacother*. 2010;64(6):409-416
- [3] Finetti F, Terzuoli E, Bocci E, et al. Pharmacological inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses epidermal growth factor receptor-mediated tumor growth and angiogenesis. *PLoS One*. 2012;7(7):e40576
- [4] Nakanishi M, Montrose DC, Clark P, et al. Genetic deletion of mPGES-1 suppresses intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2008;68(9):3251-3259
- [5] He S, Li C, Liu Y, Lai L. Discovery of highly potent microsomal prostaglandin e2 synthase 1 inhibitors using the active conformation structural model and virtual screen. *J Med Chem*. 2013;56(8):3296-3309
- [6] Bekircan O , Kahveci B , Küçük M . Synthesis and Anticancer Evaluation of Some New Unsymmetrical 3,5-Diaryl-4H-1,2,4-Triazole Derivatives. *Turk J Chem*. 2006; 30(1): 29-40
- [7] Sonawane AD, Rode ND, Nawale L, et al. Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-triazole-3-thione and 1,3,4-oxadiazole-2-thione as antimycobacterial agents. *Chem Biol Drug Des*. 2017;90(2):200-209
- [8] Marinelli L, Fornasari E, Eusepi P, et al. Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agents. *Eur J Med Chem*. 2019;178:515-529. doi:10.1016/j.ejmech.2019.05.093
- [9] Mezzoug N, Elhadri A, Dallouh A, et al. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat Res*. 2007;629(2):100-110. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.01.011
- [10] Landa P, Kokoska L, Pribylova M, Vanek T, Marsik P. In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E(2) biosynthesis. *Arch Pharm Res*. 2009;32(1):75-78. doi:10.1007/s12272-009-1120-6
- [11] Fan K, Li X, Cao Y, et al. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2015;26(8):813-823. doi:10.1097/CAD.0000000000000263
- [12] Erensoy G, Ding K, Zhan CG, Elmezayen AD, Yelekçi K, Duracık M, Bingöl Özakpınar Ö, Küçükgülzel İ. Synthesis, in silico studies and cytotoxicity evaluation of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives designed as potential mPGES-1 inhibitors. *J Res Pharm*. 2020;24(4): 436-451. <https://doi.org/10.35333/jrp.2020.187>
- [13] Kulabaş N, Tatar E, Bingöl Özakpınar Ö, et al. Synthesis and antiproliferative evaluation of novel 2-(4H-1,2,4-triazole-3-ylthio) acetamide derivatives as inducers of apoptosis in cancer cells. *Eur J Med Chem*. 2016;121:58-70. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.017
- [14] Li Y, Yin S, Nie D, et al. MK886 inhibits the proliferation of HL-60 leukemia cells by suppressing the expression of mPGES-1 and reducing prostaglandin E2 synthesis. *Int J Hematol*. 2011;94(5):472-478.
- [15] Kuklish SL, Antonysamy S, Bhattachar SN, et al. Characterization of 3,3-dimethyl substituted N-aryl piperidines as potent microsomal prostaglandin E synthase-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(19):4824-4828. doi:10.1016/j.bmcl.2016.08.023
- [16] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-2791.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından SBAG-218S549 kodlu 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

YENİ BAZI PÜRİN ANALOĞU BİLEŞİKLERİN SENTEZ, YAPI AYDINLATILMASI VE SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

P23

Pınar KUL¹, Meral TUNÇBİLEK¹, Mustafa ERGÜL², Ezgi Nurdan YENİLMEZ TUNOĞLU³, Yusuf TUTAR³

¹Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06560 Ankara.

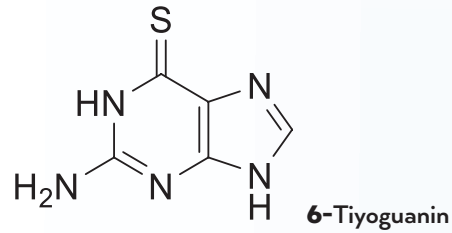
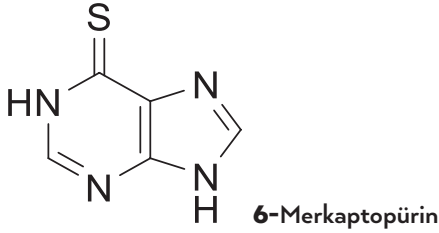
²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 58140 Sivas.

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 34668 İstanbul.
(e-posta:pkul@ankara.edu.tr)

GİRİŞ

Kanser, hücre fonksiyonlarını yerine getiremeyen anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize, yayılmanın kontrol edilemediği durumlarda ölümcül olabilen bir dizi hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir [1]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 9,96 milyon kansere bağlı ölüm vakası meydana gelmiştir. 2040 yılına kadar 28,9 milyon yeni kanser vakası ve 16,2 milyon ölüm meydana gelmesi öngörülmektedir [2].

Pürin halkası tümör hücresinin biyokimyasal bileşenlerinden olup, hücre büyümesini doğrudan etkileyen kimyasal yapılarda bulunur. Kanser kemoterapisinde kullanılan pürin türevi ilaçlar kanser hücresinin DNA sentezini engelleme veya hücre fonksiyonlarını bozma yoluyla etkisini gösterir ve hücreyi öldürür [3]. Kanser tedavisinde kullanılan en eski pürin türevleri FDA tarafından 1953 yılında onaylanan 6-merkaptopürin ve 1966 yılında onaylanan 6-tiyoguanin'dir [4]. Her iki bileşik de hücreye kolayca girer, de novo pürin sentezini inhibe eder ve DNA'ya yanlış bağlanan aktif formlara hücre içinde metabolize edilir. Bu bileşikler bağırsaktan oldukça iyi emilir ve genellikle oral yoldan kullanılırlar [5].

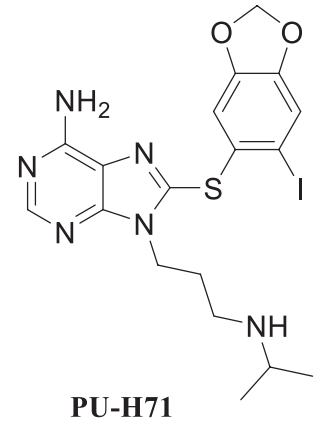
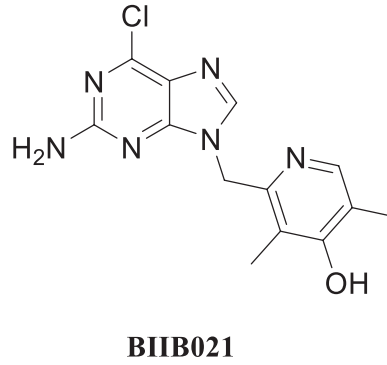
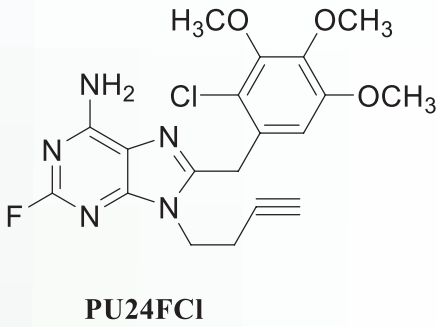
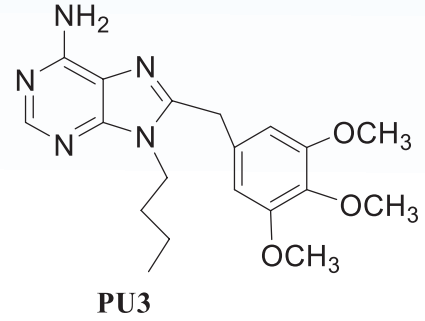
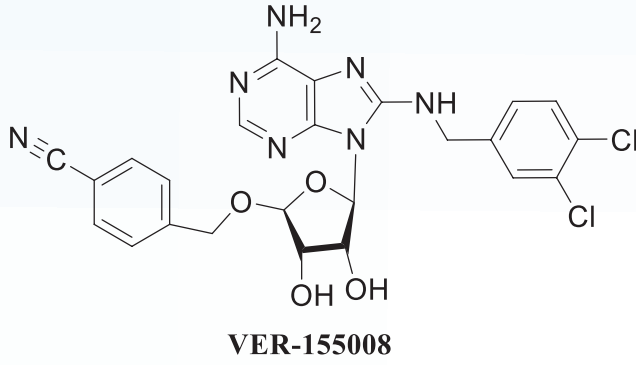


Heat Shock Proteinleri (Hsp), stres ve hücre hasarına karşı hücreyi koruyan, hücre antioksidan sistemlerinin ayrılmaz bir parçası olan protein grubudur [6]. Hsp'ler, hücrelerin normal ısılarından daha yüksek ısıya maruz kalmaları sonucunda üretilen spesifik proteinlerdir. Hücre stres ya da zararlı kimyasallara maruziyet sonucunda da üretilen Hsp'lere stres proteinleri de denir [7]. Hsp ailesi; Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90 ve büyük molekül ağırlıklı Hsp'ler olmak üzere moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılırlar [8].

Hsp'ler çoğalma, farklılaşma, göç ve metastaz yoluyla karsinogenezde önemli rollere sahiptir. Kanser hücrelerinde apoptozu engellemek ve hayatta kalmak için aşırı eksprese edilirler. Bu nedenle Hsp inhibitörleri antikanser aktivite çalışmalarında çok çalışılan moleküller olarak görülmektedir. Özellikle Hsp70, kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve inhibisyonu, kanser tedavisinde Hsp'leri popüler hale getirmiştir. Hsp70 proteinleri, polipeptitlerin katlandığı C-terminal substrat-bağlanma alanı (SBD) ve ATP'nin bağlandığı ve ATPaz aktivitesinin meydana geldiği N-terminal nükleotid-bağlanma alanı (NBD) olmak üzere iki ana bölümden oluşur. Hsp70 inhibitörleri, ATPaz aktivitesini bozmak için çoğunlukla NBD ile etkileşime girer.

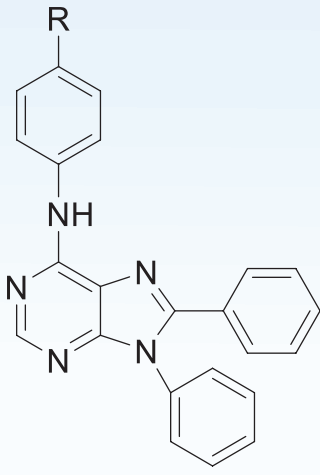
Bir pürin nükleozit analogu olan VER-155008, Hsp70'in NBD'sine bağlanır, ATPaz aktivitesini bloke eder ve NBD/SBD etkileşimini inhibe eder. In vivo çalışmalar, VER-155008'in zayıf biyoyararlanıma sahip olduğunu ve dolayısıyla klinik kullanımını sınırladığını göstermektedir [9]. PU3, PU24FCl, BIIB021, BIIB021 ve PU-H71 pürin yapıdaki Hsp90 inhibitörleridir. PU3, meme kanseri hücrelerinde Her2, Raf1 ve östrojen reseptörlerinin degradasyonunu durdurarak hücre bölünmesini G1 fazında bloke eder. Hsp90'a düşük afinite ile bağlanır ve yüksek IC50 değeri nedeniyle klinikte klinik kullanım bulamamıştır.

Daha aktif bileşikler sentezlemek üzere PU3 bileşiğinde yapılan modifikasyonlarla tasarlanan PU24FCI ile yapılan in vivo deneylerde, bileşiğin Her2'yi parçalamada PU3'ten 30 kat daha güçlü olduğu ve meme kanser hücrelerini %72 oranında azalttığı gözlenmiştir [10]. BIIB021, Faz I ve Faz II klinik çalışmaları bulunan, in vitro ve in vivo olarak çeşitli tümör hücrelerinin apoptozunu indüklediği kanıtlanan oral yoldan kullanılabilen yeni bir Hsp90 inhibitörüdür. Wang ve ark., BIIB021'in, tek bir ajan olarak veya radyasyon ile kombine kullanımı ile özofagus yassı epitel hücreli karsinom (ESCC) hücre hatlarında güçlü sitotoksik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir [11]. PU-H71; solid tümörleri, lenfoma ve miyeloproliferatif bozuklukları olan hastalarda Faz I klinik çalışmaları ile değerlendirilen Hsp90 inhibitörüdür. Usmani ve ark., insan miyelom hücre hatlarında yaptığı çalışmalara göre PU-H71'in G2/M fazındaki hücre oranlarında ve protein sentez aşamasında siklin D1 ekspresyonunda azalmaya yol açtığını bulmuşlardır. Bu sonuçlara dayanarak PU-H71'in hücre döngüsü inhibe ettiği görülmüştür [11, 12].





Hsp inhibitörü bileşikler, proteinin ATP bağlanma bölgesine bağlanır. İnhibitörün bağlanmasıyla uygun üç boyutlu yapıya geçemeyen karsinogenezle ilişkili bu protein bloke olur ve tümör oluşumu engellenir. Hsp inhibitörü olarak sentezlenen pürin türevlerinin yapı-aktivite ilişkileri, yenilikçi ilaç tasarımı için bir ana iskelet sağlar. Hsp70, özellikle kanser hücrelerinde çok fazla eksprese edilen proteinlerden biri olduğundan, pürin türevlerinin bu proteini inhibe edici etkileri, kanser tedavisi ve ilaç tasarım araştırmalarına büyük fayda sağlamaktadır. Kanser tedavisinde tümör hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelerin büyümesini engelleyerek sitotoksik aktivite gösteren seçici olmayan bileşiklerin kullanımı yerine, kanser ile ilişkili olduğu bilinen moleküllerin hedeflendiği ve spesifik olarak inhibe edildiği yöntemler günümüzde tercih edilmektedir.

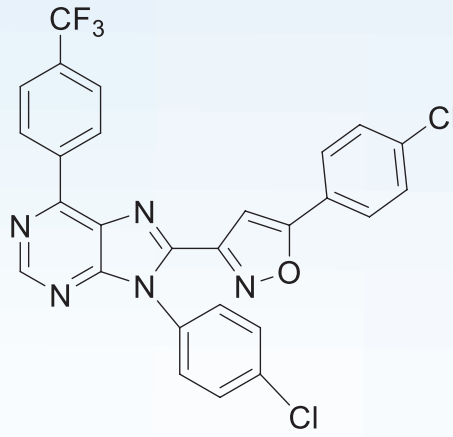
Bu çalışmada 6-(4-süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin ve 6,9-(4-süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevlerinin (Şekil 1) sentezi, sitotoksik aktivitelerinin in vitro olarak MCF7 meme, HepG2 karaciğer, PC3 prostat ve K562 kronik myeloid lösemi hücre hatlarında test edilmesi, etki mekanizmalarının belirlenmesi, kanser hücresi ve apoptoziste önemli olan Hsp70 ve Hsp90 proteinleri üzerinde inhibitör aktivitelerinin ve bu proteinler ile docking çalışmalarının yapılması hedeflenmiştir. Daha sonraki aşamada ise en aktif türev üzerinden gidilerek etki mekanizmasının belirlenmesi için çalışmaların yürütülmesi amaçlanmıştır.



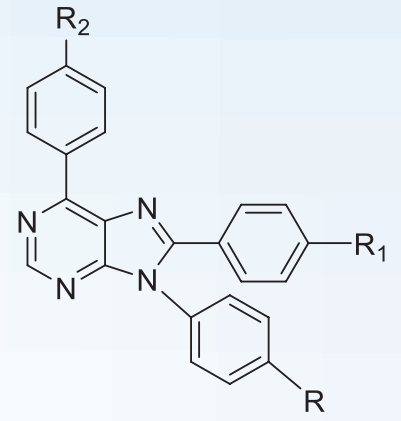
5-12

R

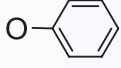
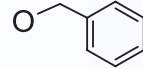

	R
5	H
6	Cl
7	CH(CH ₃) ₂
8	OH
9	OCH ₂ - 
10	OCHF ₂
11	SCH ₃
12	



20



21-24

	R	R ₁	R ₂
21	H	Cl	CF ₃
22	H	OCH ₃	CF ₃
23	Cl		Cl
24			CF ₃

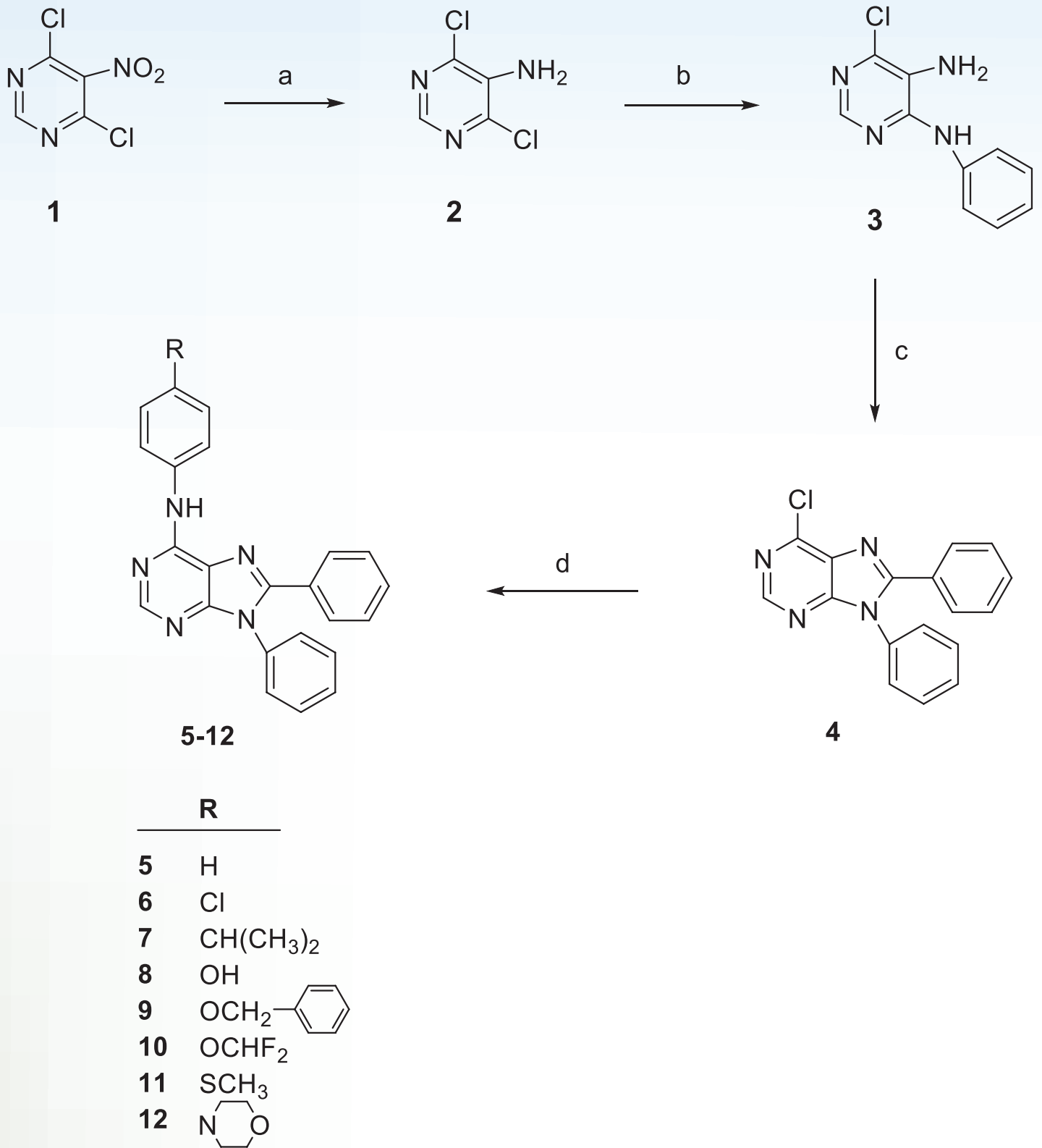
Şekil 1 Sentezlenen pürin türevleri

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

1. 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin Sentezi

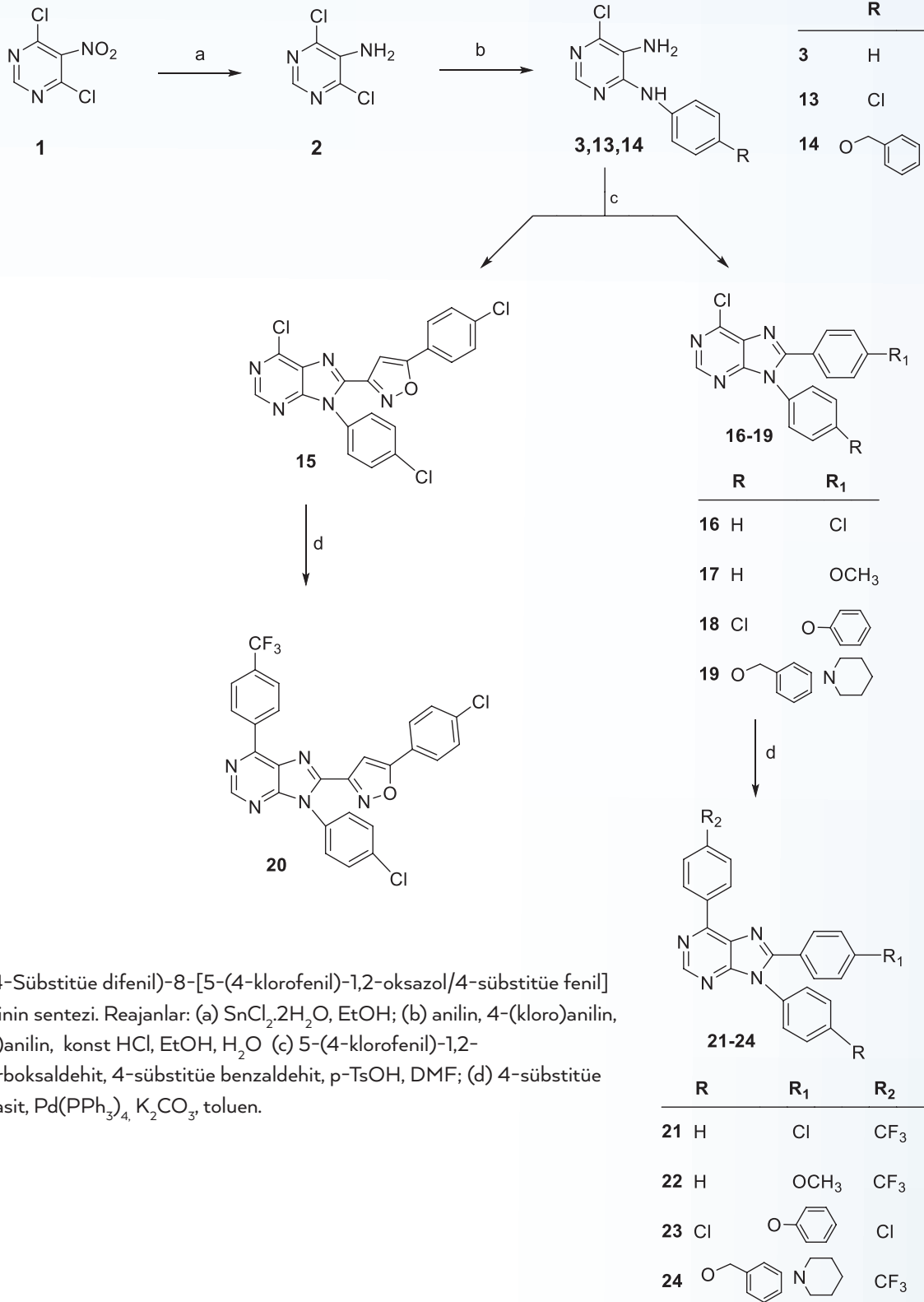
6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerini (5-12) sentezlemek üzere 4,6-dikloro-5-nitro-pirimidin'den (1) hareketle Şekil 2'de verilen sentez yöntemine göre öncelikle 6-kloro-8,9-difenil-pürin türevinin (4) sentezi yapılmıştır. Buna göre başlangıç maddesinin (1) SnCl₂ ile redüksiyonunu takiben elde edilen 5-amino-4,6-dikloropirimidin bileşiğinin (2) anilin ile aromatik nükleofilik süstitüsyonu ile sentezlenen ara ürünün (3) p-TsOH katalizörlüğünde süstitüe benzaldehitler ile siklizasyonu sonucu pürin halkası (4) elde edilmiştir. Bu bileşik (4), süstitüe anilin türevleri ile reaksiyona tabi tutularak sonuç pürin bileşikleri (5-12) sentezlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin türevlerinin sentezi. Reajanlar: (a) SnCl₂·2H₂O, EtOH; (b) anilin, konst HCl, EtOH, H₂O (c) benzaldehit, p-TsOH, DMF; (d) 4-süstitüe anilin, Et₃N, EtOH.

2. 6-(4-Sübstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin Türevlerinin Sentezi

6,9-(4-Sübstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-sübstitüe fenil] pürin türevlerini (20-24) sentezlemek üzere Şekil 3'de verilen yöntem ile elde edilen 5-amino-4-(4-sübstitüe fenil)amino-6-kloropirimidin (3,13,14) ara ürünlerinin 5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol-3-karboksaldehit ve 4-sübstitüe benzaldehitler ile p-TsOH katalizörlüğünde siklizasyonu sonucu pürin halkası (15-19) elde edilmiştir. Bu bileşiklerin, Suzuki Coupling reaksiyonu ile toluen içinde K_2CO_3 varlığında ve $Pd(PPh_3)_4$ katalizörlüğünde 4-sübstitüe fenil boronik asitler ile reaksiyona tabi tutulması ile sonuç pürin türevlerinin (20-24) sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3 6,9-(4-Sübstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-sübstitüe fenil] pürin türevlerinin sentezi. Reajanlar: (a) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, EtOH; (b) anilin, 4-(kloro)anilin, 4-(benziloksi)anilin, konst HCl, EtOH, H_2O (c) 5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol-3-karboksaldehit, 4-sübstitüe benzaldehit, p-TsOH, DMF; (d) 4-sübstitüe fenil boronik asit, $Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , toluen.

Hücre Kültürü Çalışmaları

Kanser, hücre fonksiyonlarını yerine getiremeyen anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize, yayılmanın kontrol edilemediği durumlarda ölümcül olabilen bir dizi hastalık grubu için kullanılan genel bir terimdir [1]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında dünya genelinde 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 9,96 milyon kansere bağlı ölüm vakası meydana gelmiştir. 2040 yılına kadar 28,9 milyon yeni kanser vakası ve 16,2 milyon ölüm meydana gelmesi öngörülmektedir [2].

Pürin halkası tümör hücrelerinin biyokimyasal bileşenlerinden olup, hücre büyümesini doğrudan etkileyen kimyasal yapılarda bulunur. Kanser kemoterapisinde kullanılan pürin türevi ilaçlar kanser hücrelerinin DNA sentezini engelleme veya hücre fonksiyonlarını bozma yoluyla etkisini gösterir ve hücreyi öldürür [3]. Kanser tedavisinde kullanılan en eski pürin türevleri FDA tarafından 1953 yılında onaylanan 6-merkaptopürin ve 1966 yılında onaylanan 6-tiyoguanin'dir [4]. Her iki bileşik de hücreye kolayca girer, de novo pürin sentezini inhibe eder ve DNA'ya yanlış bağlanan aktif formlara hücre içinde metabolize edilir. Bu bileşikler bağırsaktan oldukça iyi emilir ve genellikle oral yoldan kullanılırlar [5].

Sentezi gerçekleştirilen pürin analoglarının hücre hatlarında yarattığı sitotoksik etki, nonradyoaktif, kolorimetrik bir metod olan XTT hücre canlılık testi ile incelenmiştir. Bütün pürin türevleri MCF7, HepG2, PC3, K562 hücreleri üzerine tek doz 10 µM uygulanmış ve hücreler bileşikler ile 48 saat inkübasyondan sonra elde edilen sonuçlar yüzde canlılık değerleri olarak gösterilmiştir.

Annexin V Bağlanma Deneyleri

MCF7 hücreleri IC50 konsantrasyonda bileşik 7 ile muamele edilmiş ve hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmış, DMEM besi yeri ile tripsin inaktif hale getirildikten sonra hücreler 800 x rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılmış ve dipteki pellet 1 ml, en az %1 fetal bovine serum içeren PBS ile resuspende edilerek hücreler thoma lamında sayılmıştır. Uygun hücre sayısı elde edildiğinde ise hücreler üzerine 100 µL Annexin V Cell Reagent eklenmiş ve hücreler oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ise muse cihazı yardımıyla apoptoz belirlenmiştir.

Moleküler Docking Çalışmaları

Moleküler docking çalışmaları, PyRx kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen türevlerin moleküler yapıları ChemSketch programı ile çizilmiş ve Pymol programı ile görselleştirilmiştir. Kristal yapısı belirlenmiş ligand içeren insan Hsp90α (PDB kodu:1YC4), Hsp90β (PDB kodu: 6N8Y), Hsp70 ATPaz bölgesi (PDB kodu: 1S3X) ve Hsp70 SBD bölgesi (PDB kodu: 4WV5) yapıları pdb formatında protein data banktan (PDB) indirilmiştir. Protein data bankta kompleks halde bulunan proteincele bağlı moleküller silinmiştir. PyMol programına proteinlerin pdb dosyaları yüklenerek, sentezlenen türevleri ile insan Hsp90 ve HSP70 bölgeleri arasındaki etkileşim web tabanlı çalışan Pymol programı ile belirlenmiştir. Hesaplama sonucu sentezlenen pürin türevleri ile Hsp90α, Hsp90β, Hsp70 ATPaz, Hsp70 SBD arasındaki bağlanma enerjileri ve etkileşime giren kritik amino asitler tespit edilmiştir. Moleküler docking sonuçları PYMOL görüntüleme programı ile görselleştirilmiştir.

Hsp70 Bağlanma Deneyleri

Bağlanma deneyleri inhibitörlerin proteinin fonksiyonuna etkisini belirlemek için yapılmaktadır. Hsp70, ATP'yi hidroliz ederek elde ettiği enerjiyi SBD'in kapağının açılıp kapanmasını sağlamak için kullanmaktadır. Sentezlenen pürin analoglarının bağlanma deneylerini gerçekleştirmek için MCF7 hücre hattında oldukça aktif bulunan bileşik 7 seçilmiş ve bilinen Hsp70 inhibitörü PES ve Tutar Y. ve ark., tarafından patentlenen KBR1307 bileşikler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bileşik 7 ve KBR1307 protein çözeltisine ardışık artışlarla ilave edilerek, Kd değerleri hesaplanmıştır. Ligand bağlanmasını ölçmek için ANS (8-anilino-1-naftalen sülfonik asit) azo boyar maddesi (ekstrinsik prob) kullanılmıştır. Bileşik 7 ve KBR1307 protein çözeltisine ardışık artışlarla ilave edilerek, Kd değerleri hesaplanmıştır. Deneyler 1 µM Hsp70 ve 10 µM ANS ve inhibitörler ile oda sıcaklığında titrasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Proteinin ANS probu ile floresansı Shimadzu Spectrofluorometrede sırasıyla 340 nm ve 520 nm dalga boylarında ölçülmüştür.

Hsp70 Agregasyon Deneyleri

Katlanma deneyleri için lüminesans özellik gösteren lüsiferaz (ateş böceği) enzimi agregate edilmiştir. Değişen Hsp-koşaperon-inhibitör konsantrasyonlarında agregasyon, lüminometrik sinyal söndürmesi ile bileşik 7'nin Hsp70'e karşı etkinliği tespit edilmiştir. Lüsiferaz peptit denatüre edilmiş ve lüsiferazın Hsp tarafından yeniden katlanması farklı koşullarda izlenmiştir. Pürin türevinin (7) inhibe edici özelliklerini anlamak için pozitif kontrol grubu olarak KBR1307 kullanılmıştır.

Yolak Analizi

Bileşik 7 varlığında ve yokluğunda karşılaştırılan anahtar genlerin ekspresyonu ve qPCR (Analytic Jena) verileri Reactome veritabanı kullanılarak analiz edilmiş ve PathwayMapper programı ile Bileşik 7 için gen ekspresyon haritası çıkarılmıştır.

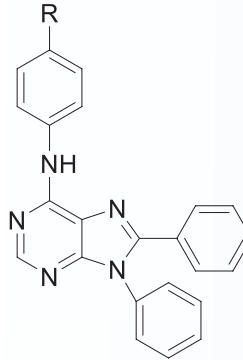
BULGULAR VE TARTIŞMA

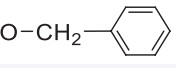

Bu çalışmada 6-(4-süstitüe fenil amino)-8,9-difenil-pürin ve 6,9-(4-süstitüe difenil)-8-[5-(4-klorofenil)-1,2-oksazol/4-süstitüe fenil] pürin türevlerinin (5-12, 20-24) sentezi, yapılarının aydınlatılması ve sitotoksik aktiviteleri in vitro olarak MCF7, HepG2 PC3 ve K562 hücre hatlarında test edilmiştir. Daha sonra en aktif türev olan 6-(4-İzopropilfenilamino)-8,9-difenil-9H-pürin (7) bileşiği ile etki mekanizmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Ayrıca bu türevin MCF7 meme kanser hücresi ve apoptozisinde önemli yeri olan Hsp70 proteini ile bağlanma ve agregasyon deneyleri yapılmıştır. Bu deneylere ilave olarak Hsp70 proteini ile bileşik 7'nin docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve gen ekspresyon haritası çıkarılmıştır.

Bileşik 7, MCF7 hücrelerinde % 66 ölüm sağlamıştır (Çizelge 1). Diğer hücre hatlarında pürin türevlerinin hemen hemen hepsi de 10 µM'lık dozda etki göstermemiştir (Çizelge 2). Daha sonraki aşamada % hücre canlılığını 50'nin altına düşüren ve en aktif pürin türevi olan bileşik 7 için MCF7 hücre hattında IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. MCF7 hücreleri üzerine sırasıyla 40, 20, 10, 5 ve 2.5 µM konsantrasyonlarda uygulanmış ve 48 saatin sonunda bileşik 7'nin MCF7 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 8.88 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4).

Çizelge 1 6-(4-Süstitüe fenil amino)-8,9-difenil pürin türevlerinin (5-12) sitotoksik aktiviteleri

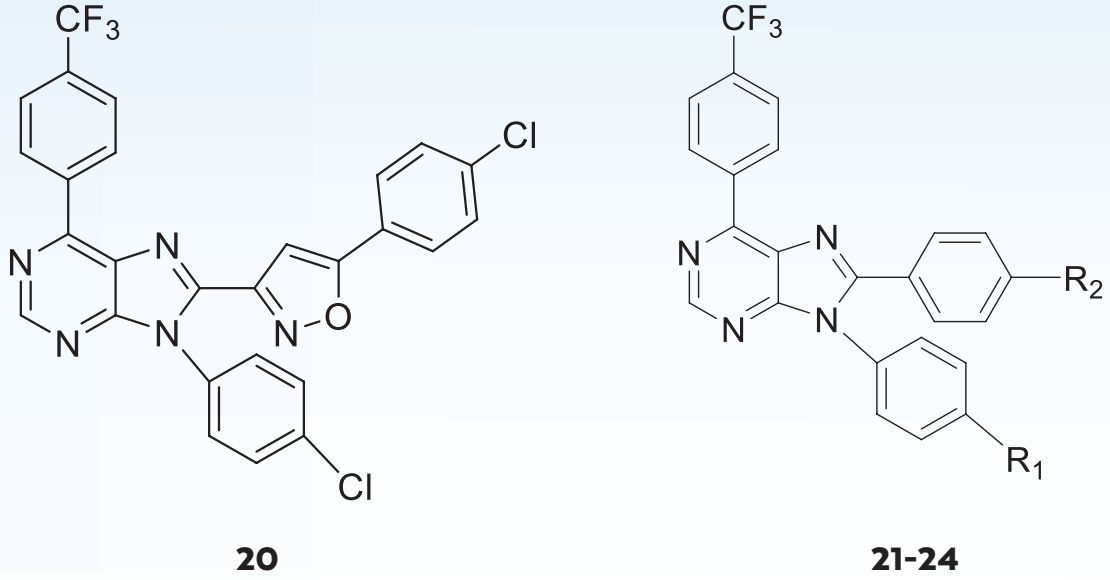
5-12



% Hücre Canlılığı (± Standart Hata)					
Bileşikler	R	MCF7	HepG2	PC3	K562
5	H	96 ± 3.12	EG	EG	EG
6	Cl	90 ± 2.17	EG	EG	EG
7	CH (CH ₃) ₂	34 ± 1.09	81 ± 2.74	97 ± 2.11	99 ± 2.87
8	OH	EG	EG	EG	EG
9	O-CH ₂ - 	60 ± 3.32	EG	99 ± 1.95	96 ± 1.11
10	OCHF ₂	71 ± 2.96	EG	EG	EG
11	SCH ₃	87 ± 1.96	EG	EG	EG
12		EG	EG	EG	98 ± 4.07
Fludarabin		59 ± 3.36	63±2.85	49 ± 3.96	45 ± 3.27

Maddeler ve Fludarabin 10 µM'lık tek doz uygulandıktan sonra 48 saatlik inkübasyon sonunda XTT analizi ile % hücre canlılık değerleri hesaplandı. EG: Etki Görülmedi

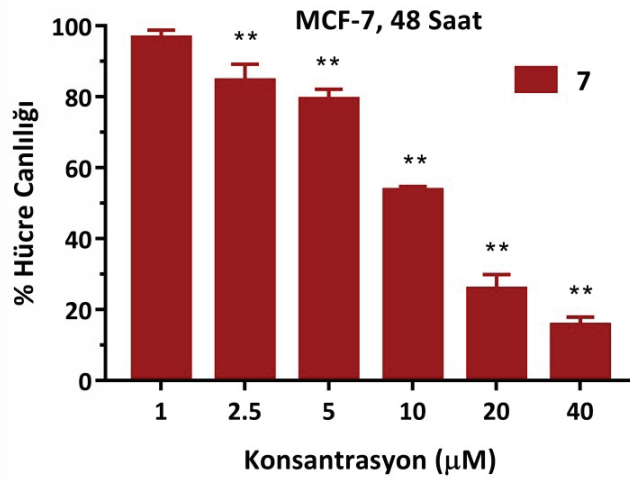
Çizelge 2 6-[4-(Triflorometil)fenil]-8,9-(4-sübstitüe difenil)pürin türevlerinin (20-24) sitotoksik



% Hücre Canlılığı (± Standart Hata)						
Bileşikler	R ₁	R ₂	MCF7	HepG2	PC3	K562
20	-	-	91 ± 4.21	96 ± 3.45	98 ± 3.42	92 ± 2.74
21	H	Cl	89 ± 3.27	EG	97 ± 2.18	EG
22	H	OCH ₃	EG	EG	EG	EG
23	Cl		93 ± 3.85	97 ± 4.23	EG	95 ± 1.98
24			89 ± 4.48	EG	95 ± 3.41	EG
Fludarabin			59 ± 3.36	63 ± 2.85	49 ± 3.96	45 ± 3.27

Maddeler ve Fludarabin 10 µM'lık tek doz uygulandıktan sonra 48 saatlik inkübasyon sonunda XTT analizi ile % hücre canlılık değerleri hesaplandı.

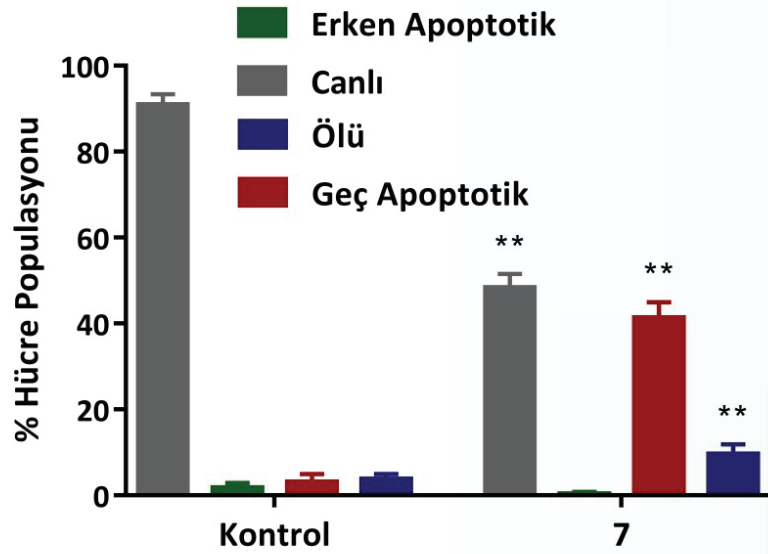
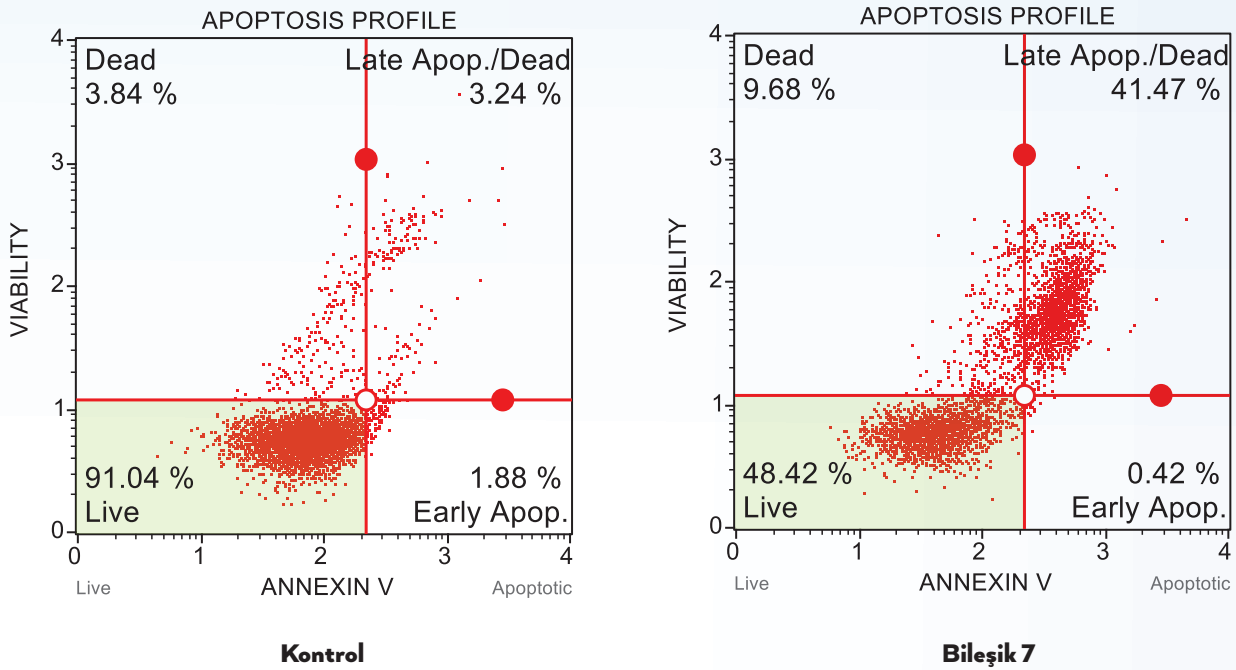
EG: Etki Görülmedi



Şekil 4 Bileşik 7'nin, MCF7 meme kanser hücre hattındaki % inhibisyon grafiği

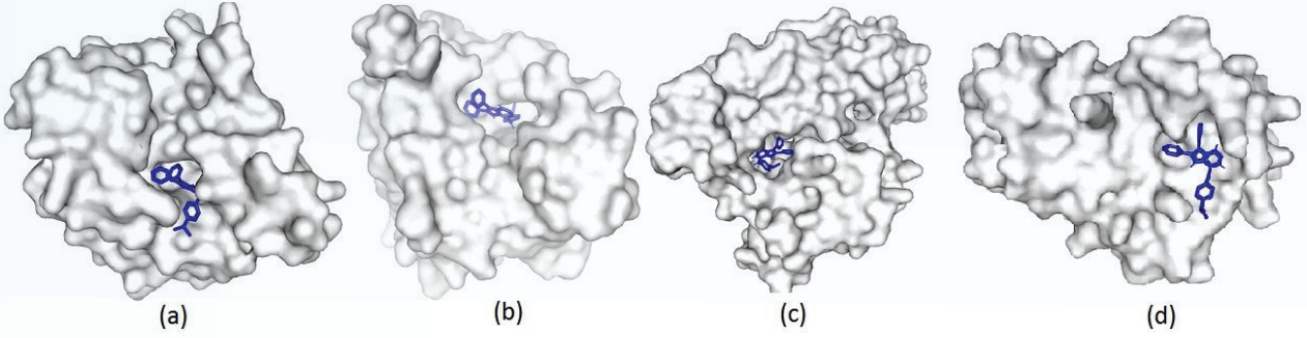
**P < 0.01

Bileşik 7'nin apoptotik etkisinin değerlendirilmesi, Annexin V bağlanma deneyleri ile gerçekleştirilmiştir. MCF7 hücreleri, bileşik 7'nin IC_{50} konsantrasyonu ile muamele edilerek Şekil 5'de görüldüğü üzere kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 7 nolu bileşiğin özellikle geç apoptoz olmak üzere apoptozu anlamlı olarak indüklediği belirlenmiştir ($P < 0.01$). Kontrol grubunda % 1.88 ± 0.12 olan geç apoptotik hücre değeri, Bileşik 7 grubunda % 41.47 ± 1.39 olarak hesaplanmıştır. Bileşik 7 uygulaması ayrıca kontrol grubunda % 3.84 ± 0.27 olan ölü hücre popülasyonunun % 9.68 ± 1.07 'ye yükselmesine neden olmuştur ($P < 0.01$).

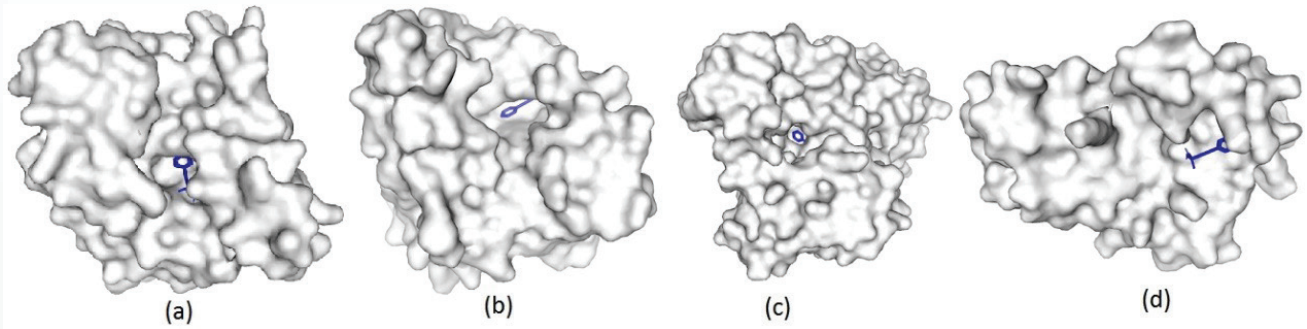


Şekil 5. Bileşik 7'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda MCF7 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. MCF7 hücreleri, Bileşik 7'nin IC_{50} konsantrasyonu ile muamele edildi, ardından 48 saat süreyle inkübe edildi ve apoptoz, Muse hücre analizörü (Millipore) ile tespit edildi. Geç apoptotik ve ölü hücre yüzdesi, Bileşik 7 uygulamasını takiben önemli ölçüde artmıştır ($P < 0.01$). Tüm deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. ** $P < 0.01$ 'dir.

Moleküler docking sonuçlarına göre tüm bileşikler, Hsp70 proteininin ATP bağlanma cebine (PDB: 1S3X) -8.5 ile -10.8 kcal/mol; Hsp70 substrat bağlanma bölgesine (PDB: 4WV5), -6.5 ile -7.7 kcal/mol; Hsp90 α (PDB: 1YC4) bölgesine -7.3 ile -8.6; Hsp90 β bölgesine (PDB: 6N8Y) -8.5 ile -10 arasında değişen bağlama enerjileri ile bağlanmıştır. Bileşik 7, Hsp70 ATPaz domain bölgelerine yüksek bir afinite ile bağlanmıştır (Şekil 6). Bileşik 7'nin bağlanma enerjisi -8.8 kcal/mol, PES'in bağlanma enerjisi -6.4 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Şekil 7). Bu sonuçlara göre Bileşik 7'nin Hsp70 ATPaz bölgesi ile olan etkileşimi, PES'e kıyasla daha yüksek bir afiniteyle gerçekleşmiştir ve bu bölgedeki Asp11 amino asiti ile etkileşmiştir. Ayrıca Bileşik 7 Hsp90 α domain bölgesinde Asn 51, Asp 54, Gly 97, Gly 135, Thr 184 amino asitleri; Hsp90 β domain bölgesinde Leu 102, Gly 130 amino asitleri; Hsp70 ATPaz domain bölgesinde Asp69, Glu 231, Glu268 amino asitleri ve Hsp70 SBD bölgesinde Ser400, Met410, Glu446 amino asitleri ile etkileşmiştir.

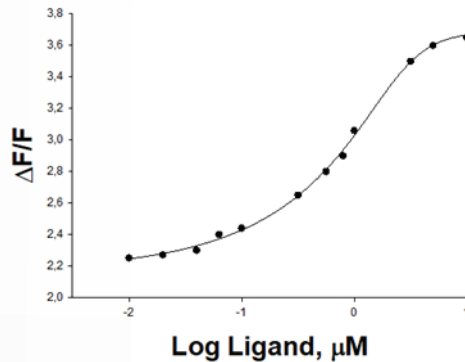


Şekil 6 (a) 1yc4 ile Bileşik 7'nin etkileşimi (b) 6n8y ile bileşik 7'nin etkileşimi (c) 1s3x ile bileşik 7'nin etkileşimi (d) 4wv5 ile bileşik 7'nin etkileşimi



Şekil 7 (a) 1yc4 ile PES etkileşimi (b) 6n8y ile PES etkileşimi (c) 1s3x ile PES etkileşimi (d) 4wv5 ile PES etkileşimi

Sentezlenen pürin analoglarının bağlanma deneylerini gerçekleştirmek için MCF7 hücre hattında IC_{50} değeri 8.88 μ M ile kaydadeğer sitotoksik aktivite gösteren bileşik 7, bilinen Hsp70 inhibitörü PES ve Tutar Y. ve ark., tarafından patentlenen KBR1307 bileşikleri pozitif kontrol olarak kullanılarak Hsp70 bağlanma deneyleri yapılmış ve Bileşik 7 ve KBR1307 için K_d değeri sırasıyla 0.82 μ M ve 3.16 μ M olarak bulunmuştur. Bileşik 7 göreceli iyi bağlanmakta ve potansiyel olarak konformasyonel değişimi perturbe edici özellik göstermektedir. Dolayısı ile inhibitör olarak kullanılması oldukça potansiyeldir (Şekil 8).



Şekil 8 Bileşik 7'nin 1 μ M ATP varlığında, Hsp70'e bağlanma grafiği

SONUÇLAR

Bu çalışmada sentezi yapılan 13 adet orijinal 6,8,9-trisübstitüe pürin analogu bileşiklerin sitotoksik aktiviteleri, MCF7 meme hücre, HepG2 karaciğer hücre, PC3 prostat ve K562 kronik myleoid lösemi hücre hatlarında pürin nükleozit analogu Fludarabin pozitif kontrolüne karşı incelenmiş, farklı konsantrasyonlarda yol açtıkları inhibisyon yüzdeleri hesaplanmış, sonuçlar yüzde canlılık değerlerini gösterecek şekilde verilmiştir. Elde edilen sitotoksikite sonuçlarına göre pürin halkasının 8. konumunda 4-(izopropil)anilin bulunan bileşik 7, MCF7 hücre hattında IC₅₀= 8.88 µM değeri ile en aktif pürin türevi olarak belirlenmiş ve bu IC₅₀ değerinin ilaç olarak kullanılabilir etkin doz aralığında olduğu (<10 µM) saptanmıştır. Ayrıca bu bileşik ile aynı hücre hattında % 34 ± 1.09 hücre canlılığı tespit edilirken bu değer Fludarabin için % 59 ± 3.36 olarak görülmüştür. Buna göre bileşik 7, MCF7 kanser hücresinde pürin nükleozit analogu Fludarabin'den daha aktif bulunmuştur.

Hsp70 inhibitörü bileşikler, proteinin ATP bağlanma bölgesine bağlanır. İnhibitörün bağlanmasıyla uygun üç boyutlu yapıya geçemeyen karsinogenezle ilişkili bu protein bloke olur ve tümör oluşumu engellenir. Hsp70 inhibitörü olarak sentezlenen pürin türevlerinin yapı-aktivite ilişkileri, yenilikçi ilaç tasarımı için bir ana iskelet sağlar. Hsp70, özellikle kanser hücrelerinde çok fazla eksprese edilen proteinlerden biri olduğundan, pürin türevlerinin bu proteini inhibe edici etkileri, kanser tedavisi ve ilaç tasarımı araştırmalarına büyük fayda sağlamaktadır.

Hsp70 yapı fonksiyon etkisinin incelenmesi için sentezlenen moleküller ilk önce in silico ortamda taranarak en etkin molekül 7 olarak belirlenmiştir. Bu yapı Hsp70 ve Hsp90'ın iki ayrı alt ünitesinde bu etkileşim incelenmiştir. Substrat bağlanma bölgesi off-target etkileri minimize ettiği için özellikle hedeflenen bölgedir. Ayrıca Hsp90 inhibisyonu ile Hsp90'a komplementer yapı olan Hsp70 in ve izoformlarının indüklenmesi dual inhibitör arayışlarını hızlandırmıştır.

Bileşik 7 bu anlamda oldukça uygun bir inhibitördür. Hsp70 substrat bağlanma bölgesine etkin bir şekilde bağlanması Hsp70 in koopere ve koordine olduğu diğer Hsp yapılarının etkileşimlerini perturbe edebileceğini özellikle agregasyon deneyleri ile göstermiştir. Sinyal yolu analizi sonuçları ile Bileşik 7'nin aynı anda hem yaşlanmayı hem de apoptozu indüklediği doğrulanmıştır. Hsp70 antiapoptotik özelliği bu yapı ile engellenmesi antikanser ilaç aday potansiyel olarak umut vericidir. Bu yapının farklı hücre hatlarında ve direnç gösteren hücrelerde denenmesi ayrıca klinik ilaçlar ile sinerjetik etki göstermesi kullanım alanlarını arttıracığı için önemlidir. İlerleyen çalışmalarda in vivo etkilerinin belirlenmesi klinik ilaç olarak değerlendirilmesi için önemlidir.

KAYNAKÇA

- [1] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2020; 1-76.
- [2] World Health Organization. Cancer. Erişim Adresi: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1] Erişim Tarihi: 6 Temmuz 2022.
- [3] Ruben Vardanyan, Victor Hruby, Chapter 28 - Antineoplastic Agents, Editor(s): Ruben Vardanyan, Victor Hruby, Synthesis of Best-Seller Drugs, Academic Press, 2016; 495-547.
- [4] Abraham, D.J. and Denny, W.A. Synthetic DNA-Targeted Chemotherapeutic Agents And Related Tumor-Activated Prodrugs. In Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 2010.
- [5] Lind MJ. Principles of systemic anticancer therapy. Medicine (United Kingdom). 2020; 48(2): 90-96.
- [6] Venojärvi M, Oksala N, Kinnunen S, Atalay M., Chapter 23 - Stress Proteins and Heat Shock Proteins: Role in Muscle Building and Sports Nutrition, Editor(s): Debasis Bagchi, Sreejayan Nair, Chandan K. Sen, Nutrition and Enhanced Sports Performance, Academic Press. 2013; 229-235.
- [7] Miller OJ. Harlequin Chromosomes. Encyclopedia of Genetics. 2001; 914.
- [8] Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. Trends Pharmacol Sci. 2017 Mar;38(3):226-256.
- [9] Taldone, T.; Chiosis, G. Purine-Scaffold Hsp90 Inhibitors. Curr. Top. Med. Chem., 2009, 9(15), 1436-1446.
- [10] Wang, X.T.; Bao, C.H.; Jia, Y.B.; Wnag, N.; Ma, W.; Liu, F.; Wang, C.; Wang, J.B.; Song, QX.; Cheng, Y.F. BII021, a novel Hsp90 inhibitor, sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to radiation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2014, 452(4), 945-950.
- [11] Ambati, S.R.; Lopes, E.C.; Kosugi, K.; Mony, U.; Zehir, A.; Shah, S.; Taldone, T.; Moreira, A.L.; Meyers, P.A.; Chiosis, G.; Moore, M.A.S. Pre-clinical efficacy of PU-H71, a novel HSP90 inhibitor, alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma. Mol. Oncol., 2014, 8(2).
- [12] Usmani, S.Z.; Bona, R.D.; Chiosis, G.; Li, Z. The anti-myleoma activity of a novel purine scaffold HSP90 inhibitor PU-H71 is via inhibition of both HSP90A and HSP90B1. J. Hematol. Oncol., 2010, 26;3:40.

YENİ 5-NİTROİYOFEN TÜREVLERİNİN SENTEZİ DFT HESAPLAMALARI, MOLEKÜLER YERLEŞTİRME ÇALIŞMALAR VE ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

P24

Demokrat NUHA^{1,2,3}, Asaf Evrim EVREN^{1,4}, Zennure Şevval ÇİYANCI⁵, Halide Edip TEMEL⁵,
Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ⁵, Leyla YURTTAŞ¹

¹Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 26555 Eskişehir, Türkiye

³University of Business and Technology, Eczacılık Fakültesi, Priştine, Kosova

⁴Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczacılık Hizmetleri Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye

⁵Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye

(e-posta: demokratnuha@gmail.com ; demokrat_nuha@eskisehir.edu.tr)

GİRİŞ

Kanser, DNA'daki, özellikle genlerinin bazı kısımlarındaki mutasyonların neden olduğu hastalıklara verilen genel bir isimdir [1]. Altında yatan sebep ne olursa olsun, çevre dokulardaki anormal hücreler kontrolsüz bir şekilde yayılmaya ve bölünmeye başlar [2]. Kanser hücreleri, habis hücreler veya tümör hücreleri isimlendirmeleri bu anormal hücreleri tanımlamak için kullanılan terimlerdir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) istatistiklerine göre her yıl yaklaşık 10 milyon insan kanser sebebiyle ölmektedir [3]. Kanser, kardiyovasküler hastalıktan (CVS) sonra en yüksek morbidite oranına sahip hayatı tehdit eden hastalıkların başında gelmektedir. Yüksek mortalite ve morbidite oranları nedeniyle, düşük yan etkileri ve kanser hücresine karşı seçiciliği olan etkili yeni antikanser ajanlara klinikte hala ihtiyaç duyulmaktadır. Tiyazol halkası antibakteriyel [4], analjezik [5], antiinflamatuvar [6], antioksidan [7], anti-HIV [8], antialerjik [9], ve antikanser özellikleri [10] gibi birçok biyolojik etkiye sahiptir. Bu çalışmada (2a-2j) bileşiklerini sentezleyerek A549 insan akciğer kanseri ve L929 murin fibroblast hücre hatlarına karşı sitotoksik etkilerini araştırdık. Elde edilen bilgiler doğrultusunda yapı-etki ilişkilerini ortaya koyduk.

MALZEMELER ve YÖNTEMLER

Kimya

Başlangıçta 5-nitrotiyofen-2-karbaldehit ve tiyosemikarbazid katenatlanarak 2-[(5-nitrotiyofen-2-il)metilen]hidrazinkarbotioamid (1) oluşturuldu. 2-bromo-1-feniletanon türevleri ve bileşik 1 daha sonra etanol içinde reaksiyona sokularak çekirdek yapı, 2-2-[(5-nitrotiyofen-2-il)metilen]hidraziniltiyazol türevleri (2a-2j) elde edildi. Üretilen bileşiklerin yapıları, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve yüksek çözünürlüklü kütle spektroskopisi (HRMS) kullanılarak doğrulandı.

Bileşiklerin Sitotoksitesi için MTT Testi

Bileşiklerin sitotoksitesi için MTT tahlili, daha önce yayınlanmış prosedürlere göre belirlenmiştir [11].

Apoptozun Akış Sitometrik Analizleri

Tatmin edici bir sitotoksik profile sahip aktif bileşikler, daha önce yayınlanmış prosedürler kullanılarak apoptoz/nekroz hücre oranını değerlendirmek için akış sitometrisi üzerinde incelenmiştir [12].

Akış Sitometrisi ile Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Analizi

Aktif bileşikler ve sisplatin için akış sitometrisi ile mitokondriyal membran potansiyelinin analizi, daha önce yayınlanmış prosedürlere göre belirlenmiştir [11].

Kaspaz-3 Aktivasyonunun Spektroflorometrik Analizi

En sitotoksik bileşikler olan aktif bileşikler, daha önce yayınlanmış prosedürler kullanılarak kaspaz-3 aktivasyonu için değerlendirildi [13].

Moleküler Yerleştirme

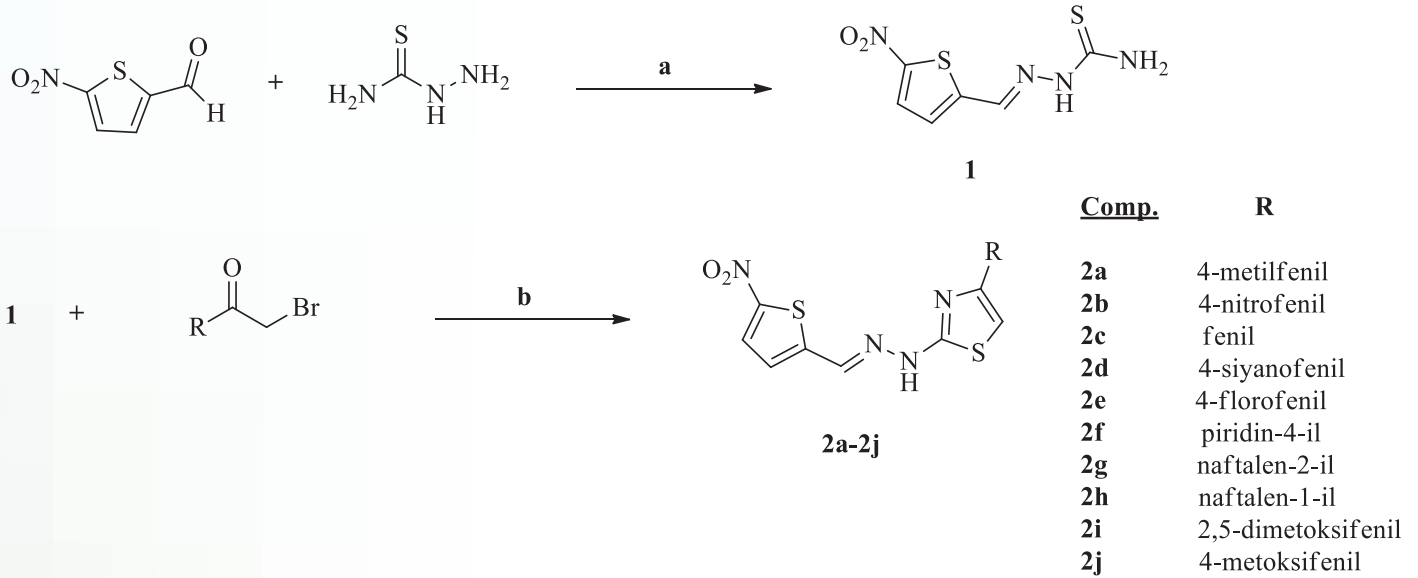
Bileşik **2c** için moleküler yerleştirme çalışması, daha önce yayınlanmış prosedürlere göre hesaplandı [14].

DFT Çalışmaları

Bileşik **2b** ve **2c** için DFT çalışması, daha önce yayınlanmış prosedürlere göre hesaplanmıştır [15, 16].

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

2a-2j bileşikleri, Şema 1'de özetlendiği gibi sentezlendi.



Şema 1 Hedeflenen bileşiklerin (**2a-2j**) sentez diyagramı. Reaksiyon koşulları: (a) EtOH, 80°C, 2 saat; (b) EtOH, 80°C.

Biyolojik Aktivitenin Sonuçları

Sitotoksisite

2a, 2b, 2c ve 2d bileşikleri, kanser hücresi seçiciliği ile A549 hücre çizgisine (sırasıyla IC₅₀:6.04 µg/mL, 4.86 µg/mL, 5.25 µg/mL ve 4.26 µg/mL) karşı önemli sitotoksik etki göstermiştir. Bu bileşiklerin sisplatininden (11.56±0.38 µg/mL) daha etkili olduğu gösterildi ve L929 hücreleri üzerindeki sitotoksisitelelerinin oldukça düşük olduğu belirlendi.

Apoptoz İndüksiyonu

Tüm bileşiklerin, diğer bileşiklerle karşılaştırıldığında (%9.72) en yüksek erken apoptoz oranına neden olan 4-nitrofenil kısmını içeren bileşik 2b ile apoptotik yol yoluyla A549 hücrelerini etkilediği gösterilmiştir. Sisplatinin toplam apoptoz oranı %46.18 iken bileşik 2b %15.59'luk bir orana sahipti. Bu oran bileşik 2d için %10.21 ve bileşik 2c için %9.71 olarak hesaplanmıştır.

Mitokondriyal membran depolarizasyonu ($\Delta\Psi_m$)

Mitokondri zarının depolarizasyonu %3.73, polarizasyonu ise %86.64 olarak belirlendi. Bu oran sisplatinle sırasıyla %37.37 ve %54.37 olarak bağlanmıştır. Apoptotik oranda olduğu gibi, 2b'nin en fazla depolarizasyona (%25.53) neden olan en güçlü kimyasal olduğu gösterildi. Bunu %22,33 ile 2c, %13,83 ile 2d ve %7,48 ile 2a izledi.

Kaspaz-3 aktivasyonu

Fenilli 2c ve 4-siyanofenil kısmımlı 2d bileşiklerinin kaspaz-3'ü sisplatinle daha fazla aktive ettiği gösterildi. Ek olarak, bileşik 2c, %96.44'lük bir yüzde ile iyi aktivasyon göstermiştir.

Moleküler Yerleştirme Çalışmasının Sonuçları

Yüksek oranda kaspaz-3 aktivasyonu ölçülmesi sebebiyle, enzim-molekül ilişkisini daha iyi anlayabilmek için kaspaz-3 cebi üzerinde moleküler yerleştirme çalışması gerçekleştirildi.

ÖNERİLER

Bu çalışmada, yeni bileşiklerin potansiyel antikanser ve enzim inhibisyon aktivitelerini in vitro ve in silico (moleküler yerleştirme ve DFT hesaplaması) ortamlarda araştırdık. Bileşikler, sitotoksikite, apoptoz, mitokondriyal membran bütünlüğü ve kaspaz-3 aktivasyonunu tanımlayan A549 insan akciğer karsinoması ve L929 mürin fibroblast hücre dizilerinde antikanser aktivitesi için test edildi. Apoptotik mekanizmalar yoluyla çalışan bazı yeni bileşikler, güçlü antikanser aktivite gösterdi. Ayrıca, %96.44'lük bir yüzde ile bileşik 2c, güçlü kaspaz-3 aktivasyonu gösterdi. Daha sonra yapı-etki ilişkisini analiz edebilmek amacıyla in silico prosedürler uygulandı. Moleküler yerleştirme çalışmaları aracılığıyla etkileşim şekilleri ve güçleri aydınlatılırken elektronik özellikleri ise yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) kullanılarak hesaplandı.

KAYNAKÇA

- [1] Minna, J.D., Roth, J.A., Gazdar, A.F. Focus on lung cancer. *Cancer Cell*. 2002;1 (1), 49-52.
- [2] Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.*2020; 70 (1), 7-30.
- [3] Montana, M., Mathias, F., Terme, T., Vanelle, P. Antitumoral activity of quinoxaline derivatives: A systematic review. *Eur. J. Med. Chem.*2019; 163, 136-147.
- [4] Bondock, S., Fadaly, W., Metwally, M.A. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazole, thiophene and pyrazole derivatives containing benzothiazole moiety. *Eur. J. Med. Chem.* 2010; 45 (9), 3692-3701.
- [5] Kumar, G., Singh, N.P. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic evaluation of thiazole/oxazole substituted benzothiazole derivatives. *Bioorg. Chem.* 2021; 107, 104608.
- [6] Ghonim, A.E., Ligresti, A., Rabbito, A., Mahmoud, A.M., Di Marzo, V., Osman, N.A., Abadi, A.H. Structure-activity relationships of thiazole and benzothiazole derivatives as selective cannabinoid CB2 agonists with in vivo anti-inflammatory properties. *Eur. J. Med. Chem.* 2019; 180, 154-170.
- [7] Dincel, E.D., Gursay, E., Yılmaz-Ozden, T., Ulusoy-Guzeldemirci, N. Antioxidant activity of novel imidazo[2,1-b]thiazole derivatives: Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking study and in silico ADME prediction. *Bioorg. Chem.*2020; 103, 104220.
- [8] Kasralikar, H.M., Jadhavar, S.C., Goswami, S.V., Kaminwar, N.S., Bhusare, S.R. Design, synthesis and molecular docking of pyrazolo [3,4d] thiazole hybrids as potential anti-HIV-1 NNRT inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2019;86, 437-444.

- [9] Gomha, S.M., Khalil, K.D. A convenient ultrasound-promoted synthesis of some new thiazole derivatives bearing a coumarin nucleus and their cytotoxic activity. *Molecules*. 2012; 17 (8), 9335-9347.
- [10] Farghaly, T.A., Masaret, G.S., Muhammad, Z.A., Harras, M.F. Discovery of thiazole-based-chalcones and 4-hetarylthiazoles as potent anticancer agents: Synthesis, docking study and anticancer activity. *Bioorg. Chem.* 2020; 98, 103761.
- [11] Yurttas, L., Temel, H.E., Aksoy, M.O., Bulbul, E.F., Ciftci, G.A. New chromanone derivatives containing thiazoles: Synthesis and antitumor activity evaluation on A549 lung cancer cell line. *Drug Dev Res.* 2022; 83 (2), 470-484.
- [12] Oturanel, C.E., Kiran, I., Ozsen, O., Ciftci, G.A., Atli, O. Cytotoxic, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Perillyl Alcohol and Its Biotransformation Metabolite on A549 and HepG2 Cancer Cell Lines. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2017;17 (9), 1243-1250.
- [13] Yurttas, L., Ozkay, Y., Akalin-Ciftci, G., Ulusoylar-Yildirim, S. Synthesis and anticancer activity evaluation of N-[4-(2-methylthiazol-4-yl)phenyl]acetamide derivatives containing (benz)azole moiety. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2014; 29 (2), 175-184.
- [14] Evren, A.E., Dawbaa, S., Nuha, D., Yavuz, Ş.A., GÜL, Ü.D., Yurttaş, L. Design and synthesis of new 4-methylthiazole derivatives: In vitro and in silico studies of antimicrobial activity. *J. Mol. Struct.* 2021; 1241.
- [15] Nuha, D., Berber, H., Karaburun, A.Ç. A Dft Study of the Chemical Reactivity Properties of Alzheimer's Disease Medications. *SSRN Electronic Journal*. 2022
- [16] Nuha, D., Evren, A.E., Ciyanci, Z.S., Temel, H.E., Akalin Ciftci, G., Yurttas, L. Synthesis, density functional theory calculation, molecular docking studies, and evaluation of novel 5-nitrothiophene derivatives for anticancer activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2022; e2200105.

YENİ TIYAZOLİDİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ VE SELEKTİF SİKLOKSİJENAZ-2 (COX-2) ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİTÖR ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

P25

Shoruq Ahmed NAJİa, Begüm Nurpelin SAĞLIKa, Asaf Evrim EVRENa,b, Ahmet Çağrı KARABURUN

a Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir.

b Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Eczane Hizmetleri Bölümü, 11110, Bilecik.

(e-posta : saonaji@anadolu.edu.tr)

GİRİŞ

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler), siklooksijenaz enzimini inhibe ederek etkilerini gösteren (COX) analjezik ilaç grubudur. Siklooksijenaz enziminin aktif bölgesi ile bileşikler arasındaki bağlanma ilişkisini anlayarak, bileşiklerin bazılarının diğerlerine göre nasıl daha seçici bağlandığını ilişkilendirmek mümkündür. Siklooksijenaz aktif bölgesi, Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların bağlandığı, ligand bağlama bölgesi olarak da bilinen uzun bir hidrofobik kanal tarafından oluşturulur. Bu aktif bölge, membran bağlama alanından (lobi) katalitik alanın çekirdeğine kadar uzanır. COX-2'de 523 konumundaki valinin, enzimin aktif bölgesinin aynı konumunda COX-1'deki nispeten hacimli izolösin (Ile) tortusu ile birbirinden ayrılır, bu enzimin 3 boyutlu yapısında bir değişiklik meydana getirerek yeni bir yan cep oluşturur. Seçici COX-2 inhibisyonu yeni moleküller geliştirilirken bu cebe bağlanacak hacimli grupların tasarımı göz önüne alınmaktadır [1, 2].

Bunun yanında, polar kısımlarla etkileşime girebilen COX-1'deki histidin (His513) aminoasidi yerine COX-2'deki valin aminoasidi Ile-434'ün değişimi, komşu fenilalanin aminoasidinin (Phe518) rahat hareket etmesine izin verir. Bu aynı zamanda yan cebe erişimi de artırmaktadır. COX aktif bölgeleri arasındaki bu farklılıkların, inhibitörlerin seçicilik profili üzerinde önemli etkileri vardır. Bu nedenle COX-2 enziminin seçici inhibisyonu ile ilgili çalışmalar yeni ilaç geliştirme çalışmalarında oldukça önemlidir [3, 4].

Ve bu çalışmada sentezlenen yeni bileşiklerin, COX-2 cebinin spesifik amino asidi ile etkileşime gireceğinden emin olmak amacıyla tasarlanan moleküllerimizde hidrofobik kısımlarını tutarken, bu kısımların büyük veya uzun bir hidrofobik zincirden oluşmamasına dikkat ettik. Ayrıca COX-1 yerine COX-2 cebinde arjinin parçasının bulunması, tasarladığımız tasarlanacak bileşiklerin enzim aktif bölgesinde arjinin ile etkileşimde bulunabilmesi için bir polar grup (asetohidrazid) ile desteklenmesi düşünülmüştür. Böylece bu çalışmada sentezlenen yeni bileşiklerin COX-1 yerine COX-2 cebine karşı daha seçici olmaları hedeflenmektedir [5, 6].

GEREÇ VE YÖNTEM

Final bileşiklerin çekirdek yapısı, fenil izotiyosiyanat türevleriyle başlanarak 3 aşamada sentezlenen N'-[tiyazol-2(3H)-iliden]asetohidrazit yapısıdır. Her adımda sıcaklık kontrol edilerek reaksiyonlar yürütülmüş ve reaksiyonların kontrolleri ince tabaka kromatografisi (İTK) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen bileşiklerin COX-2 enzimi üzerindeki inhibisyon aktiviteleri In vitro enzim deneyleriyle ölçülmektedir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Ana yapısında N'-[tiyazol-2(3H)-iliden]asetohidrazit içeren bileşikler sentezlenmiş ve etanol-hekzan (10:1) karışımından saflaştırılmıştır. Bileşiklerin saflık kontrolleri ve yapı aydınlatmaları HRMS, ¹H- ve ¹³C-NMR kullanarak yapılmıştır. Aktivite çalışmaları halen devam etmektedir.

SONUÇLAR

Yeni 10 adet tiyazol-2(3H)-iliden türevi sentezlenerek saflık kontrolleri ve yapı tayinleri gerçekleştirilmiştir. Aktivite sonuçlarının hesaplanmasının ardından yapılacak olan docking ve dinamik simülasyon analizleri ile birlikte tüm sonuçlar değerlendirilecek olup yapı-eti ilişkileri ortaya konacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] Sağlık, B.N., Osmaniye, D., Levent, S., Çevik, U.A., Çavuşoğlu, B.K., Özkay, Y., Kaplançıklı, Z.A. (2021). Design, synthesis and biological assessment of new selective COX-2 inhibitors including methyl sulfonyl moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112918.
- [2] Aggarwal, R., Kumar, S., Kaushik, P., Kaushik, D., Gupta, G.K. (2013). Synthesis and pharmacological evaluation of some novel 2-(5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4, 5-dihydropyrazol-1-yl)-4-(coumarin-3-yl) thiazoles. *European journal of medicinal chemistry*, 62, 508-514.
- [3] Sharma, R.N., Xavier, F.P., Vasu, K.K., Chaturvedi, S.C., Pancholi, S.S. (2009). Synthesis of 4-benzyl-1, 3-thiazole derivatives as potential anti-inflammatory agents: an analogue-based drug design approach. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 24 (3), 890-897.
- [4] Deb, P.K., Kaur, R., Chandrasekaran, B., Bala, M., Gill, D., Kaki, V.R., Akkinapalli, R.R., Mailavaram, R. (2014). Synthesis, anti-inflammatory evaluation, and docking studies of some new thiazole derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 23 (6), 2780-2792.
- [5] Kamat, V., Santosh, R., Poojary, B., Nayak, S.P., Kumar, B.K., Sankaranarayanan, M., Faheem, Khanapure, S., Barretto, D.A., Vootla, S.K. (2020). Pyridine- and Thiazole-Based Hydrazides with Promising Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities along with Their In Silico Studies. *ACS Omega*, 5 (39), 25228-25239.
- [6] Mohsin, N.-u.-A., Irfan, M. (2020). Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: A review of recent chemical scaffolds with promising anti-inflammatory and COX-2 inhibitory activities. *Medicinal Chemistry Research*, 29 (5), 809-830.

İZONİYAZİT HİDRAZON BİLEŞİKLERİNİN İN VİTRO MİKROZOMAL METABOLİZMA ÇALIŞMASI İLE N-OKSİT METABOLİTLERİNİN İNCELENMESİ

P26

Elif Göksu ALGIN¹, Jülide Cansu KARAKOÇ¹, Başak TÜRK ERBUL¹, Göknil Pelin COŞKUN¹, Mert ÜLGEN¹

¹Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34668 İstanbul.
(e-posta: basak.turk@acibadem.edu.tr)

GİRİŞ

Tüberküloz, Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Genellikle akciğerleri etkiler, ancak lenf düğümleri, merkezi sinir sistemi, karaciğer, kemikler, genitoüriner sistem ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere hemen hemen her organ sistemini etkileyebilir. Tüberküloz, solunum damlacıkları yoluyla yüksek oranda bulaşabilir [1]. Tüberkülozun başlıca klinik evreleri maruz kalma, enfeksiyon ve hastalıktır. Maruz kalma, bulaşıcı olan tüberküloz ile temastır. Bu aşama, enfeksiyon olarak sınıflandırılmak için gereken kanıttan yoksundur. Tüberküloz enfeksiyonu (TBH), bir kişinin akciğerde ve lenfoid dokuda yaşayan M. tuberculosis içeren havadaki damlacıkları solumasiyla oluşur. Hastalık, M. tuberculosis'in neden olduğu semptomlar veya radyografik belirtiler gösterdiğinde ortaya çıkar. Etkilenen tüm hastalar tüberküloz gelişimi için aynı düzeyde riske sahip değildir [2].

Bu çalışmada izoniyazit üzerinden farklı sübstitüentler taşıyan hidrazon türevleri sentezlenerek in vitro mikrozomal metabolizma çalışmasının yapılması amaçlanmıştır. Olası metabolitleri de standart olarak sentezlenmiştir. İzoniyazit yapısında bulunan halka içi azot üzerinden N-oksit metabolitlerinin oluşması beklendiğinden, hidrazonların N-oksit türevleri de sentezlenmiştir. Bileşiklerin sıçan mikrozomları kullanılarak in vitro mikrozomal metabolizma çalışmaları yapılmıştır. Çalışmaların sonucunda bileşiklerin hidroliz ve oksidasyon ürünü verdikleri LC-MS ile ispatlanmıştır. Oksidasyon ürünlerinden N-oksit metaboliti çalışmamızda ilk defa sentezlenmiş orijinal bileşiktir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

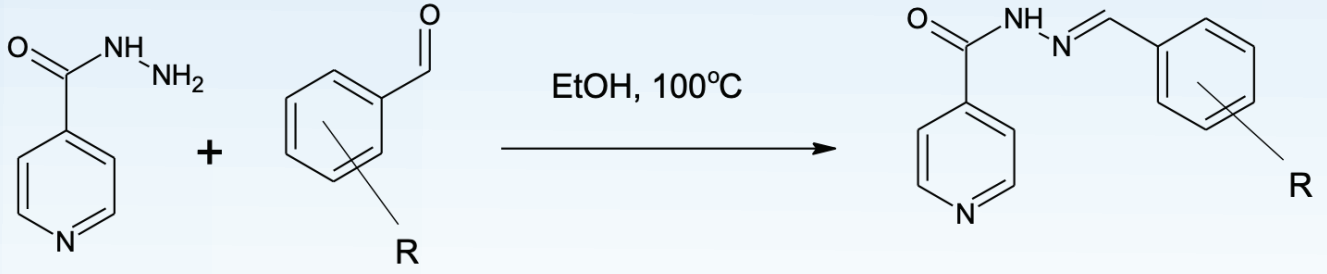
Kromatografik analizler ince tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS) yöntemleri ile yapılmıştır. TLC için Adsorban olarak 0,2 mm kalınlığındaki 20x20 cm hazır silika jel plaklar (Merck- Silicagel TCC Aluminium Sheet ve HPTLC Silica gel 60 F254) kullanılmıştır. LC-MS çalışmaları Agilent 1260 Infinity II LC-MS cihazında yapılmış olup ACE C18 Kolon kullanılmıştır. Erime Derecesi Tayini: Stuart SMP50 Automatic Melting Point Cihazı ile belirlenmiştir.

Yöntem

Sentez

N'-[(E)-(Sübstitüefenil)metiliden]piridin-4-karbohidrazit bileşiklerinin sentezi (Substratlar) INH4Br, INH4Me, INH2OH

0.01 mol izoniyazit 20 ml etanolde çözülür ve üzerine eş molar miktarda sübstitüe benzaldehitler eklenerek 100oC su banyosunda geri çeviren soğutucu altında 2 saat ısıtılır. Reaksiyon takibi İTK ile yapılır, reaksiyon sonunda çöken ürün süzülür, kurutulur ve etanolden kristallendirilir. Sentezlenecek türevler şekilde gösterilmiştir (Şekil 1).

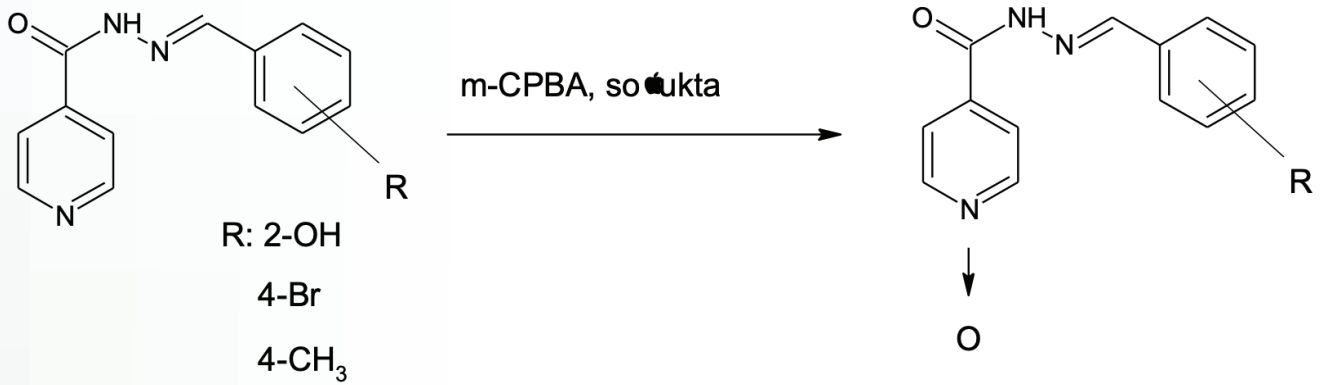


R: 2-OH
4-Br
4-CH₃

Şema 1 Substratların genel sentez şeması (2-OH: INH2OH, 4-Br: INH4Br, 4-CH₃: INH4Me)

N'-[(E)-(Süstitüefenil)metiliden]piridin-4-karbohidrazit-N-oksit bileşiklerinin sentezi (INH-X-NO)

0.01 mol hidrazon bileşikleri 20 ml etanol içerisinde çözülür ve üzerine 0.012 mol m-CPBA eklenerek soğuk ortamda 4 saat karıştırılır. Reaksiyon takibi İTK ile yapılır. Reaksiyon sonunda etanol uçurularak kalan katı karışım DCM/su ile ekstre edilir ve bileşiğin organik faza geçmesi sağlanır. Ekstraksiyon sonucu organik faz toplanır, uçurular ve kolon kromatografisi ile saflaştırılır (Şekil 2).

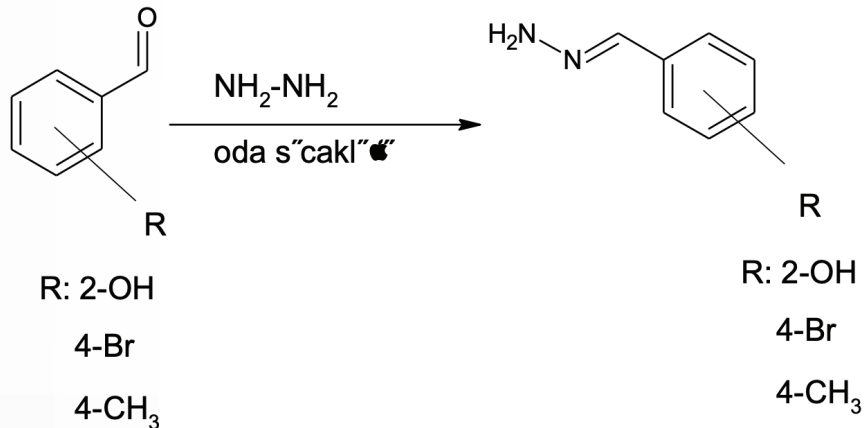


R: 2-OH
4-Br
4-CH₃

Şema 2 N-oksit metabolitinin (Metabolit 1) genel sentez şeması

(1E)-(Süstitübenziliden)hidrazin bileşiklerinin sentezi (X-HYD)

0.01 mol süstitübenzaldehit üzerine hidrazin-hidrat aşırısı eklenerek oda sıcaklığında karıştırılır. Reaksiyon sonunda çöken ürün süzülür, kurutulur ve etanolde saflaştırılır (Şekil 3).



R: 2-OH
4-Br
4-CH₃

R: 2-OH
4-Br
4-CH₃

Şekil 3 Metabolit 2'nin genel sentez şeması

Biyolojik Yöntemler

Mikrozomlar sıçan karaciğerinden hazırlanmıştır. Hayvanlar sakrifiye edilmeden önce 24 saat sadece su verilmiştir. Kullanılacak karaciğer %0.9 sodyum klorür çözeltisine koyularak kanından arındırılmış ve 0.25 M izotonik sukroz çözeltisinde (1 g karaciğer için 3 ml sukroz kullanılmıştır) homojenize edilmiştir. Mikrozomlar kalsiyum klorür çöktürme metodu ile literature uygun yöntemle hazırlanmıştır [3]

İnkübasyon

Mikrozom, ko-faktör ve substratların inkübasyon işlemleri 3 tekrar test, 2'şer tekrar kontrol deneyleri ile yapılmıştır. Her bir inkübasyon tüpü içerisinde 1 ml mikrozom, 2 ml co-faktör ve 2 µM substrat eklenerek 37 °C su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi diklorometan eklenerek durdurulmuş ve inkübasyon ortamında bulunan substrat ve metabolitler DCM ile (3x5 ml) ekstre edilmiştir. Elde edilen organik faz azot gazı altında uçurularak 2-8 °C'de muhafaza edilmiştir. Analizler, tüp içeriklerinin 200 µl metanolde çözülerek LC-MS cihazına verilmesi ile yapılmıştır. (Tablo 1)

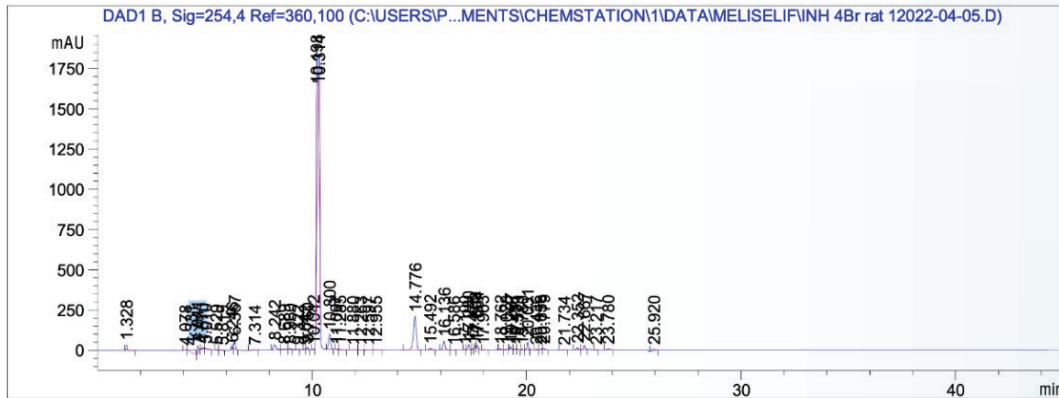
Şema 2 N-oksit metabolitinin (Metabolit 1) genel sentez şeması

Kod	Tüp	Substrat	Mikrozom	Kofaktör
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Test 1	+	+	+
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Test 2	+	+	+
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Test 3	+	+	+
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Kontrol 4	+	Denatüre mikrozom	+
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Kontrol 5	+	Denatüre mikrozom	+
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Kontrol 6	+	+	Tampon
INH2OH/INH4Br/INH4Me	Kontrol 7	+	+	Tampon

Test tüpleri

BULGULAR VE TARTIŞMA

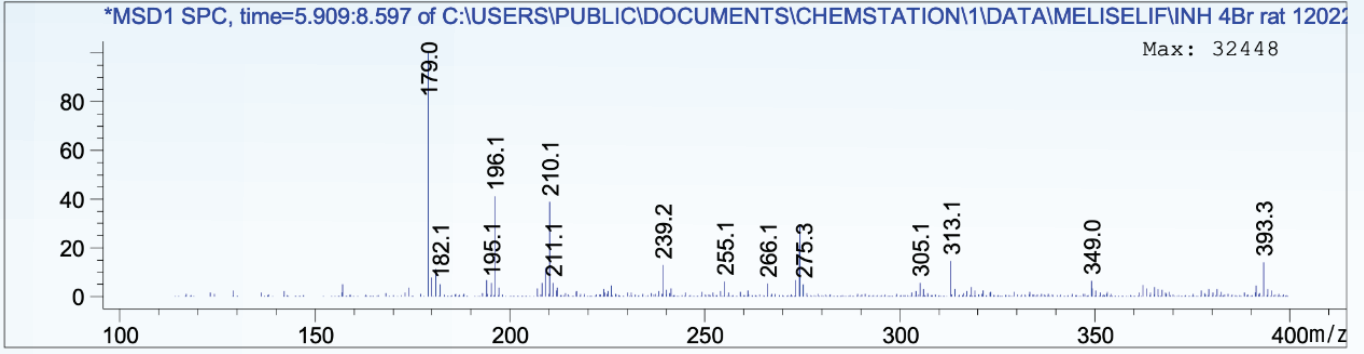
N'-[(E)-(4-bromofenil)metiliden]piridin-4-karbohidrazid [INH4Br] bileşiğinin inkübasyon sonuçları



Şekil 4 INH4Br bileşiğine ait test inkübasyon çalışmasının HPLC kromatogramı

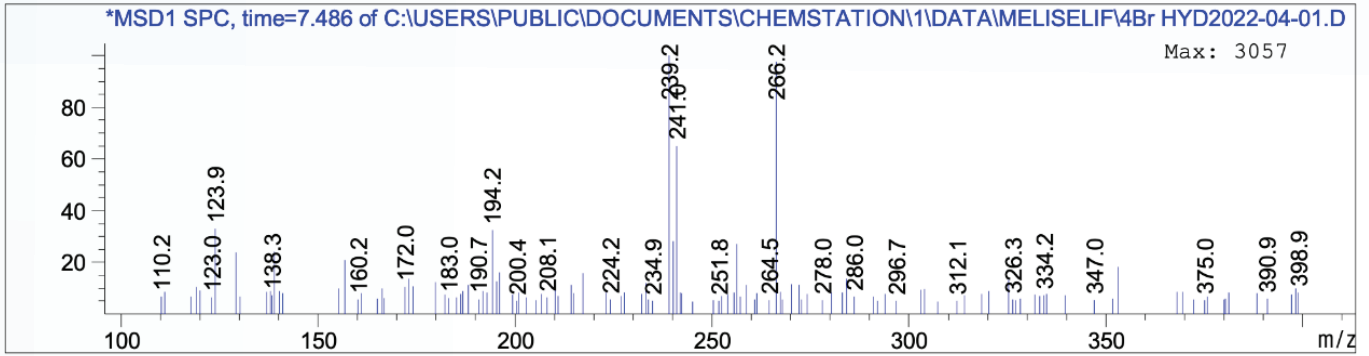
Kütle spektrumu:

[INH4Br] için 305.1 m/z'de [M+1] piki, 179.0 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 5)



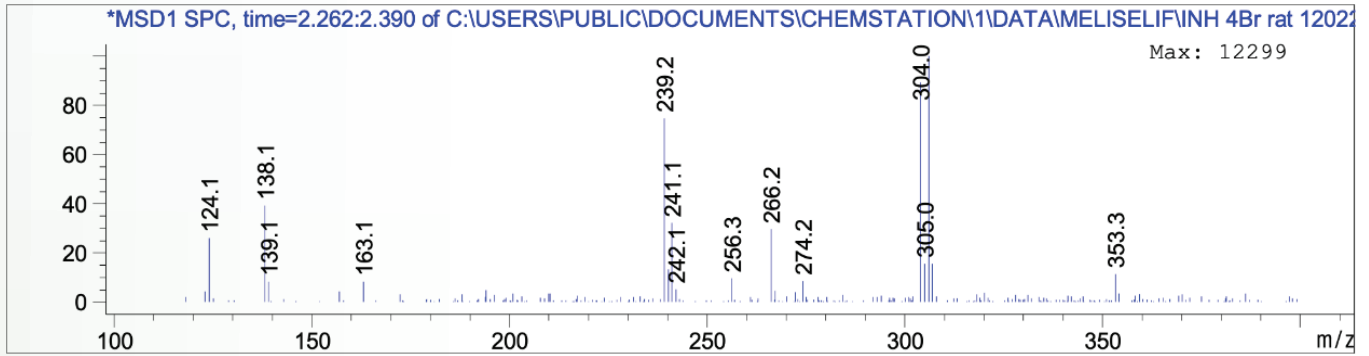
Şekil 5 INH4Br bileşiğinin test inkübasyonu içerisindeki kütle spektrumu

[4BrHYD] için 200.4 m/z'de [M+1] piki, 266.2 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 6)



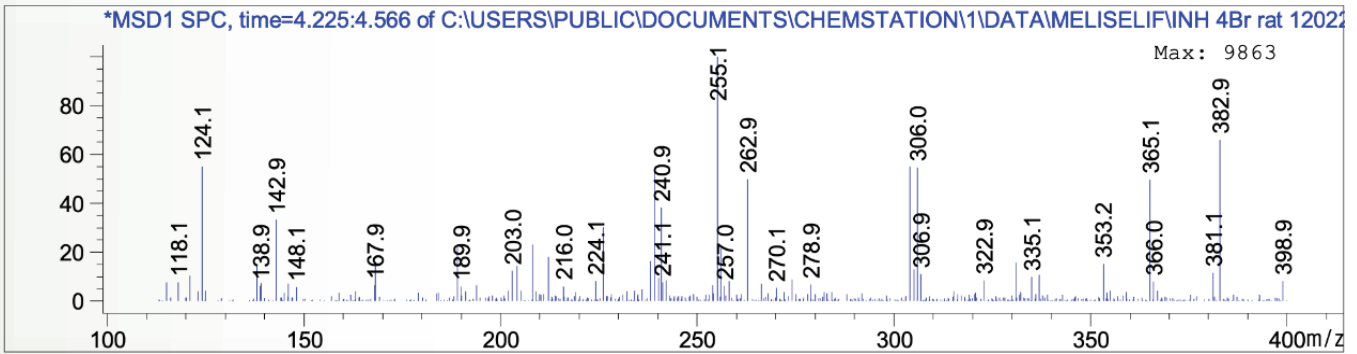
Şekil 6 4BrHYD bileşiğinin INH4Br test inkübasyonu sonucu vermiş olduğu kütle spektrumu

[INH] için 138.1 m/z'de [M+1] piki, 304 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 7)



Şekil 7 INH bileşiğinin INH4Br test inkübasyonu sonucu vermiş olduğu kütle spektrumu

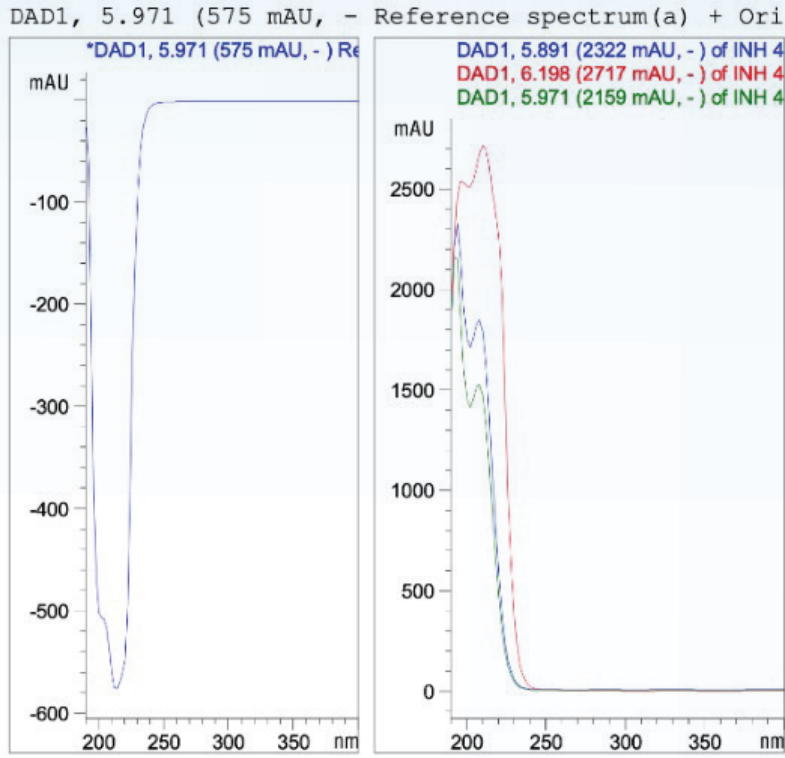
[4BrNO] için 322.9 m/z'de [M+1] piki, 255.1 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 8)



Şekil 8 4BrNO bileşiğinin INH4Br test inkübasyonu sonucu vermiş olduğu kütle spektrumu

UV spectrum sonuçları

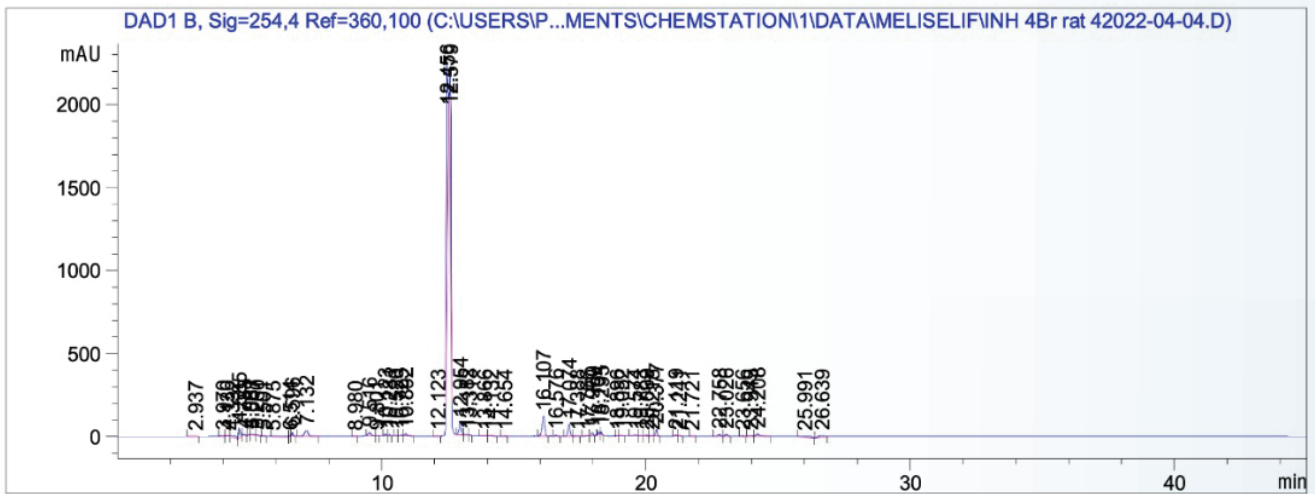
Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, test tüplerinde bulunan standart [INH4Br] ve [INH4Br] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 9)



Şekil 9 Test tüplerinde tespit edilen [INH4Br] UV spektrumu

Bu sonuçlar, mikrozoimler ve ko-faktör varlığında substratın önceden tahmin edilen metabolitlerin tümüne metabolize edildiğini göstermektedir. Ayrıca, bazı substratlar değişmeden kalmıştır.

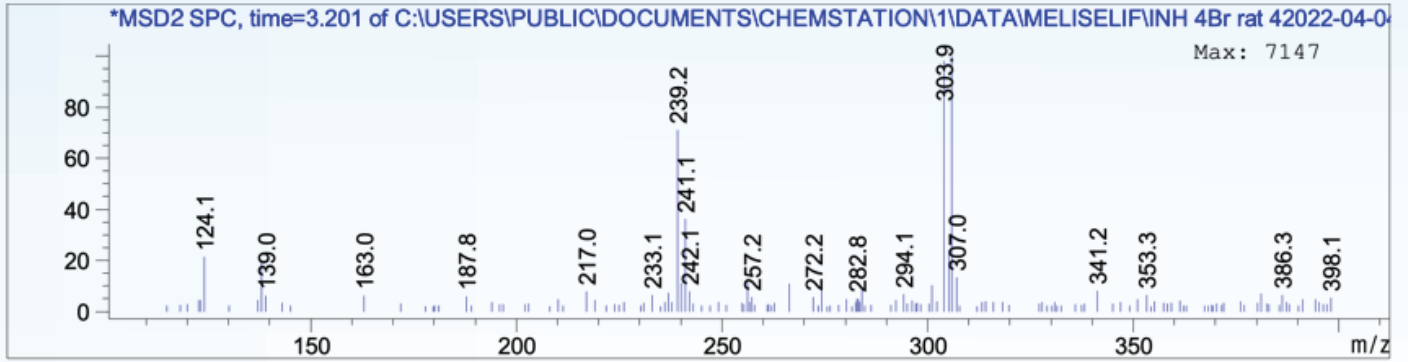
INH4Br bileşiğine ait control inkübasyon deneyleri (Denatüre Mikrozoim) HPLC kromatogramı



Şekil 10 Kontrol (denatüre) tüplerde tespit edilen INH4Br'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

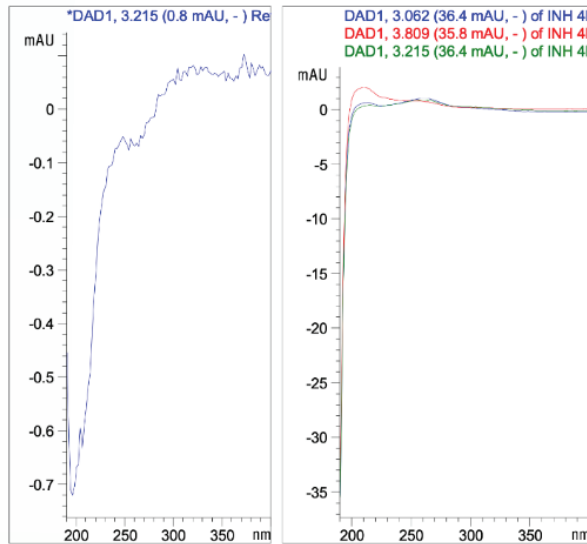
[INH4Br] için 303.9 m/z'de [M+]¹ piki, 303.9 m/z'de temel pik görülmüştür (Şekil 11)



Şekil 11 Kontrol (denatüre) tüplerindeki [INH4Br] negatif iyon modunda kütle spektrumu

UV spektrumu:

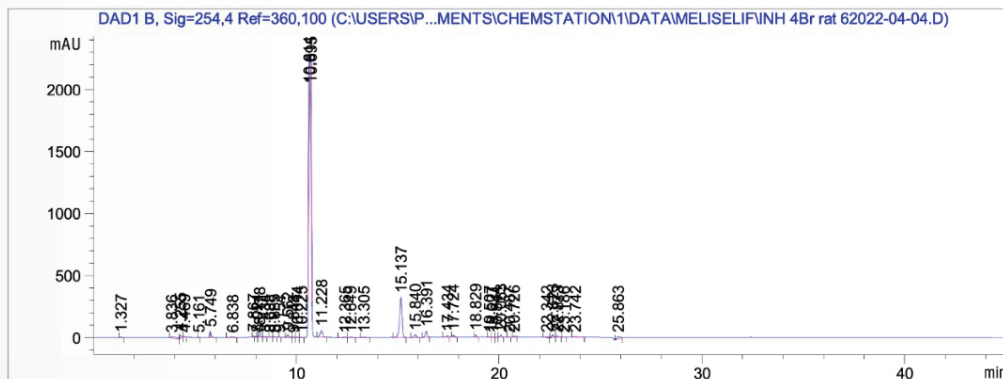
Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, kontrol (denatüre) tüplerinde bulunan standart [INH4Br] ve [INH4Br] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 12)



Şekil 12 Kontrol (denatüre) tüplerde tespit edilen [INH4Br] UV spektrumu

Denatüre mikrozom control deneylerinde izoniyazit hidrazonlarına ait metabolitler tespit edilmemiş olup, N-oksit ve hidrolitik ürünler yalnızca test deneylerinde görülmüştür.

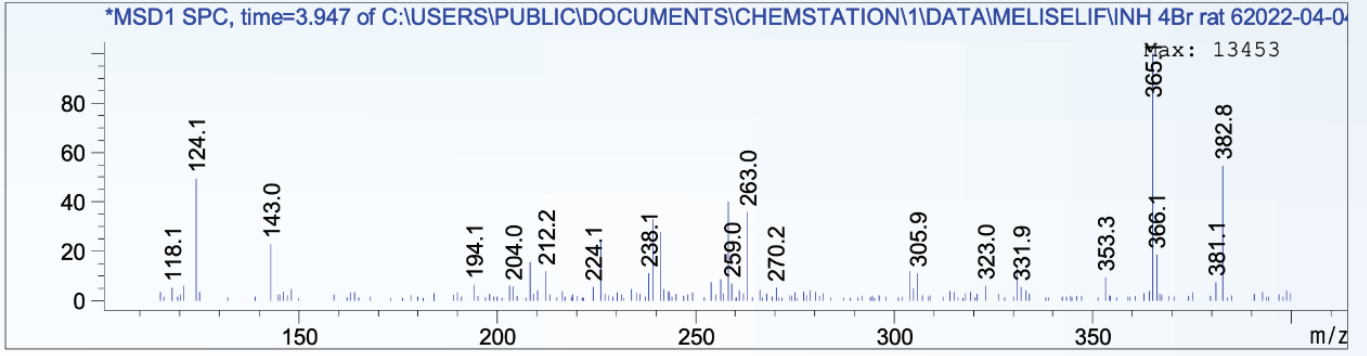
INH4Br bileşiğine ait control inkübasyon deneyleri (Kofaktörsüz ortam) HPLC kromatogram



Şekil 13 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH4Br]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

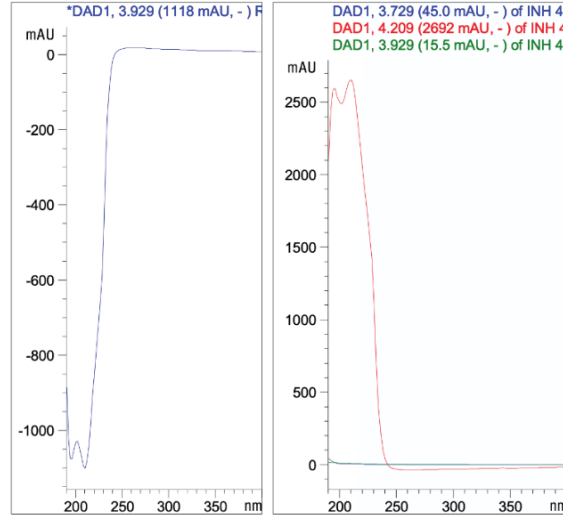
[INH4Br] için 305.9 m/z'de [M+1] piki, 365.1 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 14)



Şekil 14 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH4Br]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu

UV spektrumu:

Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, kontrol (kofaktörsüz) tüplerde bulunan standart [INH4Br] ve [INH4Br] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 15)



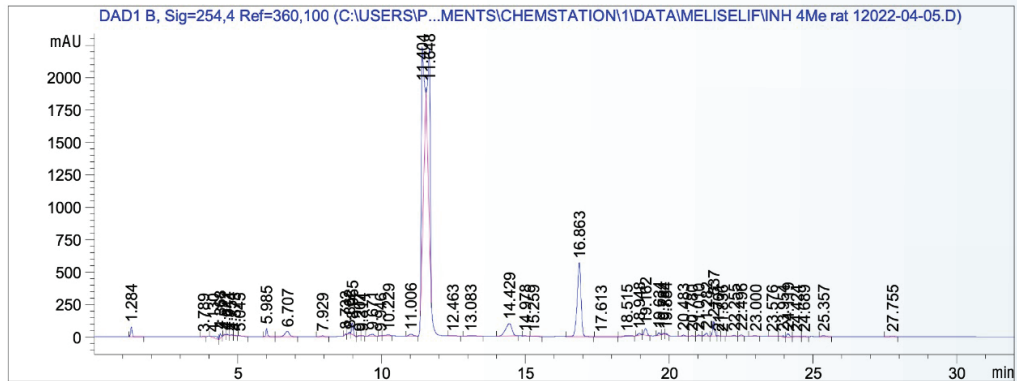
Şekil 15 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH4Br]'nin UV spektrumu

Ko-faktörsüz inkübasyon ortamında da INH4Br bileşiğinin herhangi bir metabolit vermediği gözlenmiştir.

N'-(E)-(4-metilfenil)metiliden] piridin-4-karbohidrazid [INH4Me]bileşiğinin inkübasyon sonuçları

Test inkübasyon deneyleri

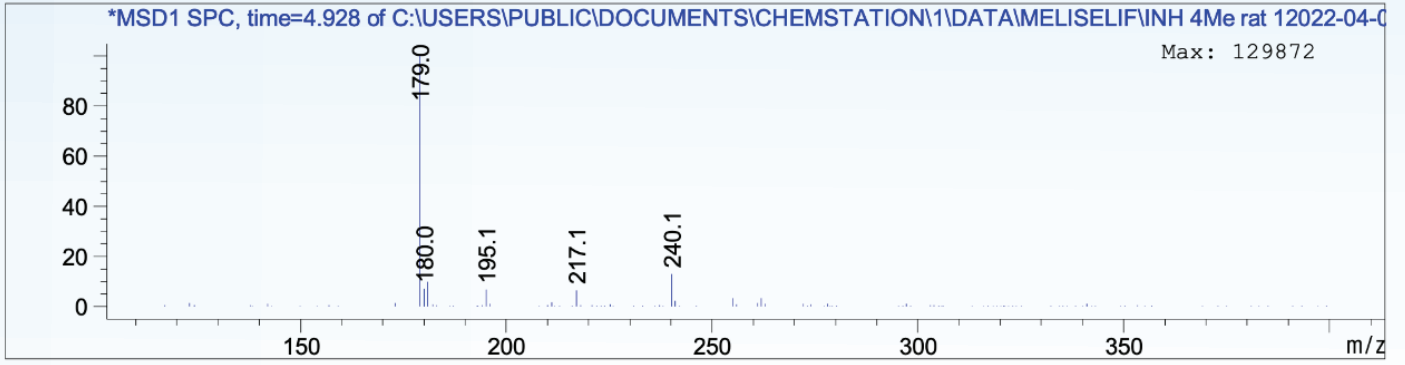
HPLC kromatogramı



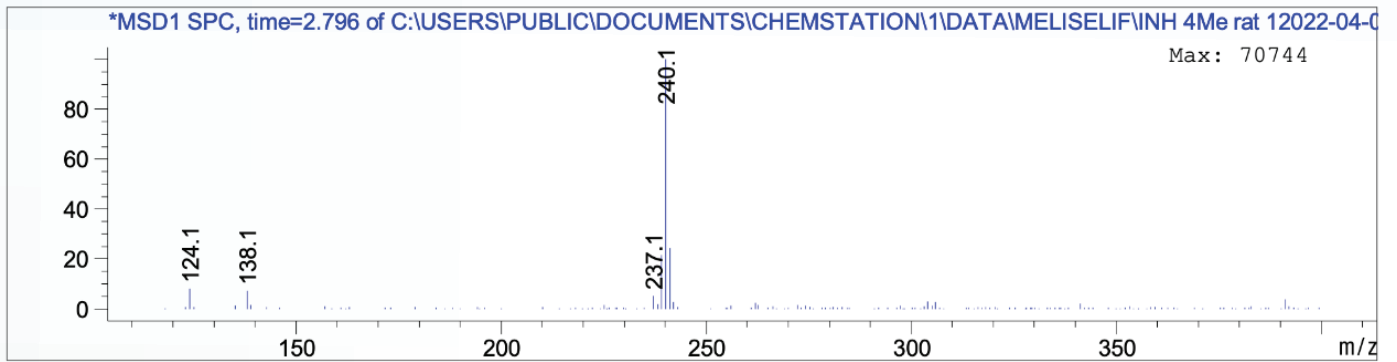
Şekil 16 Testlerde tespit edilen [INH4Br]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

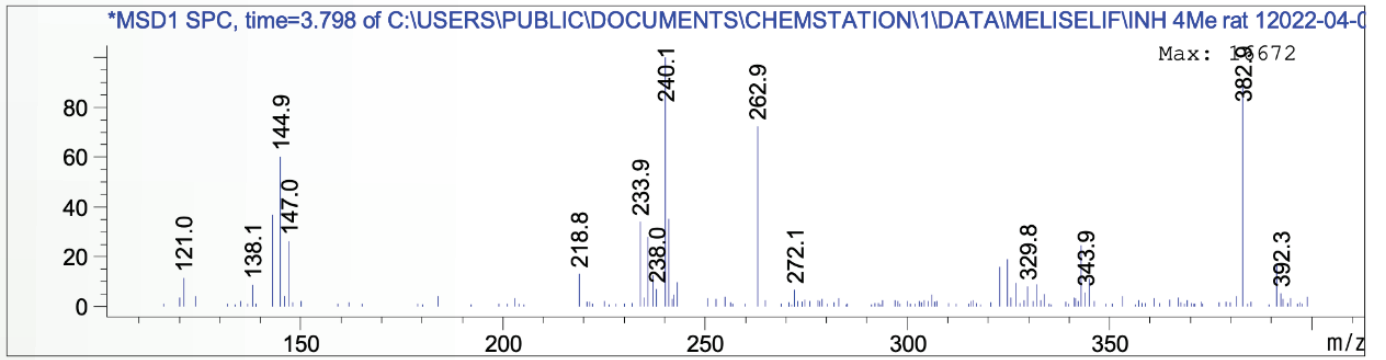
[INH4Me] için 200.4 m/z'de [M+1] piki, 179 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 17)



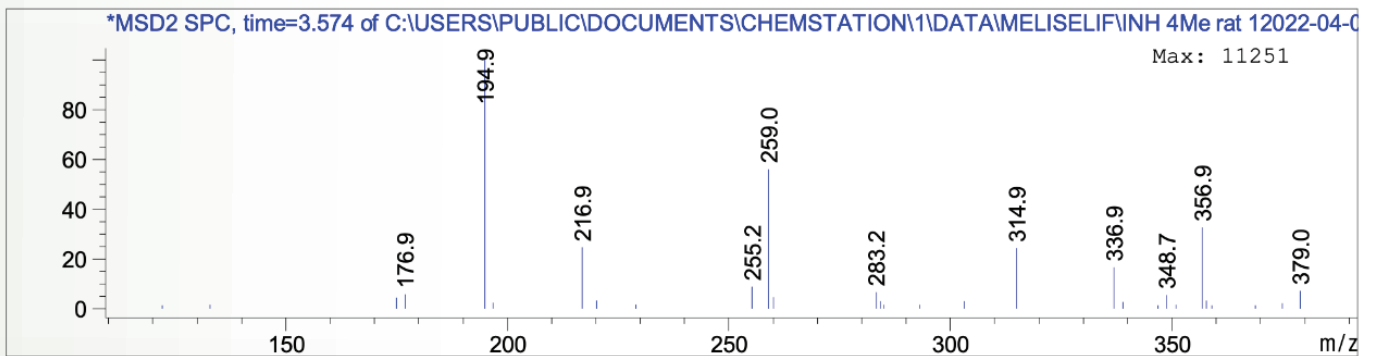
Şekil 17 Test tüplerde tespit edilen [INH4Me]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu [INH] için 138.1 m/z'de [M+1] piki, 240.1 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 18)



Şekil 18 Test tüplerde tespit edilen [INH]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu [4MeALD] için 121 m/z'de [M+1] piki, 328.9 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 19)



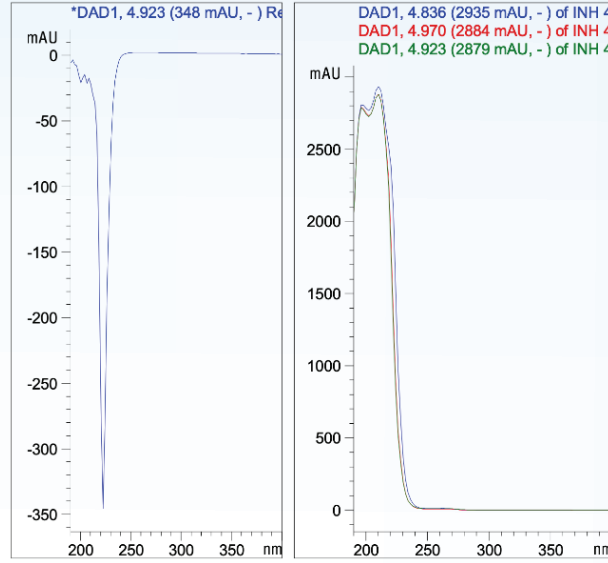
Şekil 18 Test tüplerde tespit edilen [4MeALD]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu [4MeNO] için 255.2 m/z'de [M+1] piki, 194.9 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 20)



Şekil 20 Test tüplerde tespit edilen [4MeNO]'nin negatif iyon modunda kütle spektrumu

UV spektrumu:

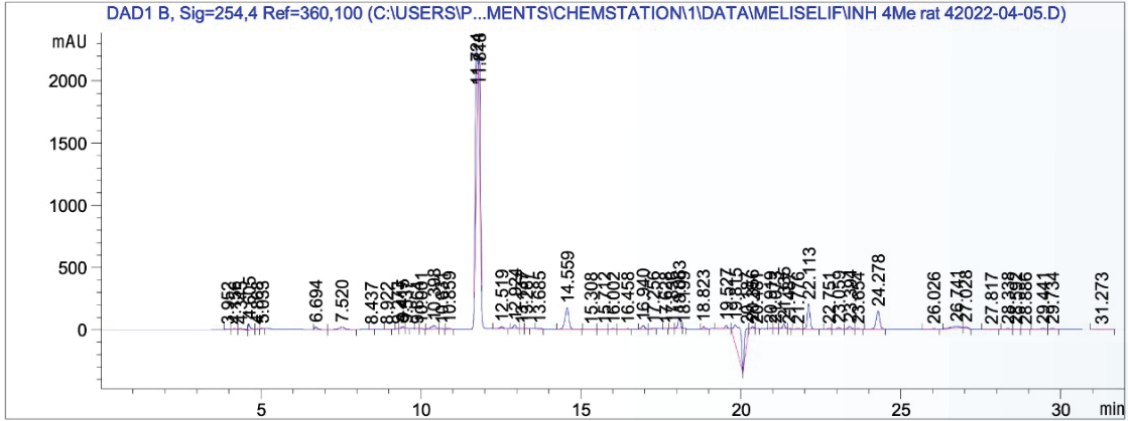
Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, test tüplerinde bulunan standart [INH4Me] ve [INH4Me] UV spektrumu eşleşmektedir (Şekil 21)



Şekil 21 Test tüplerinde tespit edilen [INH4Me] UV spektrumu

INH4Me substratı için de test inkübasyon deneylerinde N-oksit ve hidroliz ürünlerinin oluştuğu tespit edilmiştir.

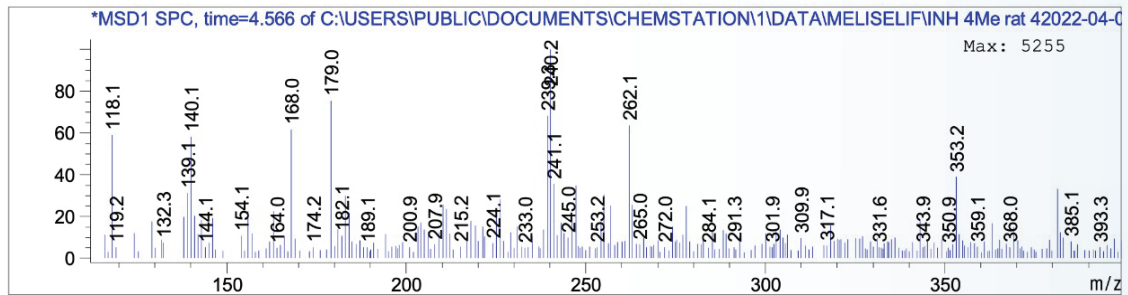
INH4Me bileşiğine ait control inkübasyon deneyleri (Denatüre mikrozom) HPLC kromatogramı



Şekil 22 Kontrol (denatüre) tüplerde tespit edilen [INH4Me]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

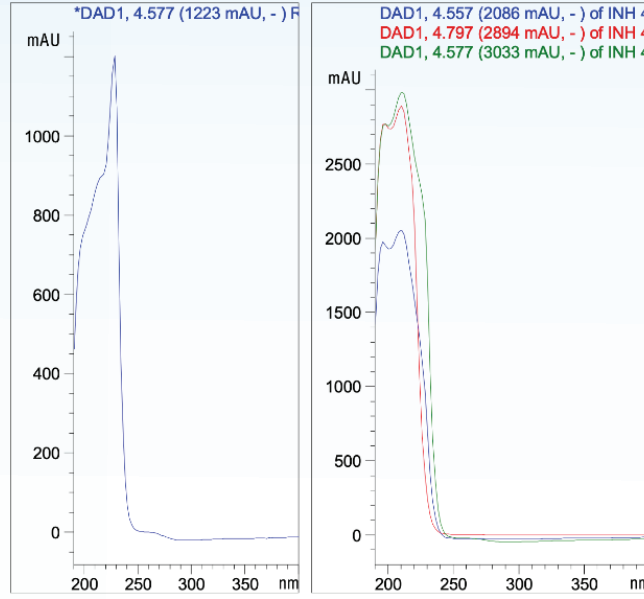
[INH4Me] için 240.2 m/z'de [M+1] piki, 240.2 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 23)



Şekil 23 Kontrol (denatüre) tüplerde tespit edilen [INH4Me]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu

UV spektrumu:

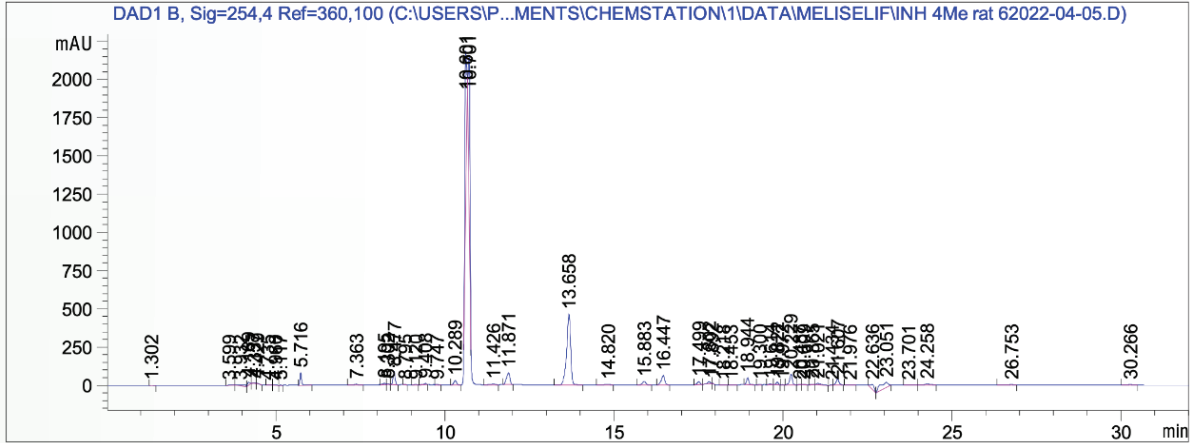
Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, kontrol (denatüre) tüplerde bulunan standart [INH4Me] ve [INH4Me] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 24)



Şekil 24 Kontrol (denatüre) tüplerde tespit edilen [INH4Me] UV spektrumu

Denatüre mikrozom ile yapılan inkübasyon deneylerinde INH4Me bileşiğinin metabolitlerine dönüşmediği tespit edilmiştir.

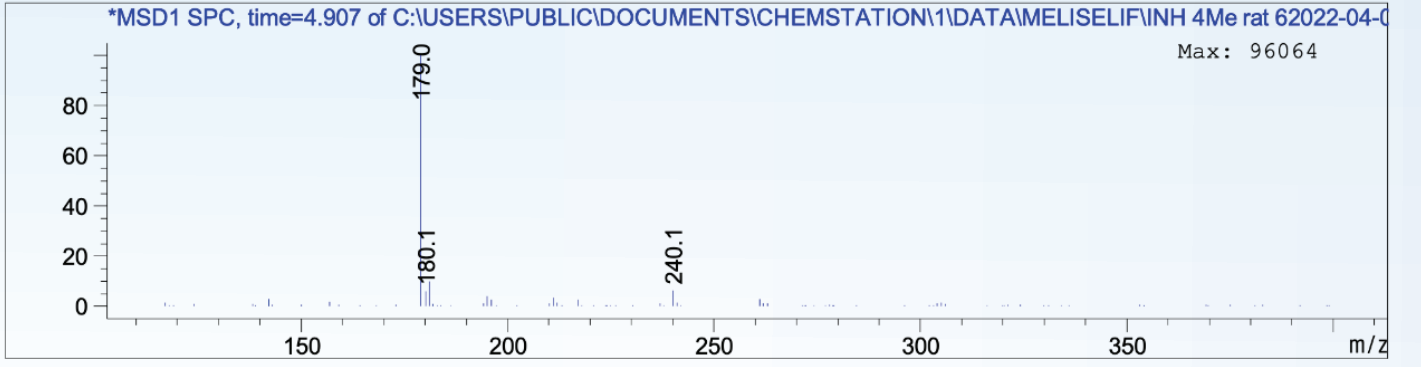
INH4Me bileşiğine ait control inkübasyon deneyleri (Kofaktörsüz ortam) HPLC kromatogramı



Şekil 25 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH4Me]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

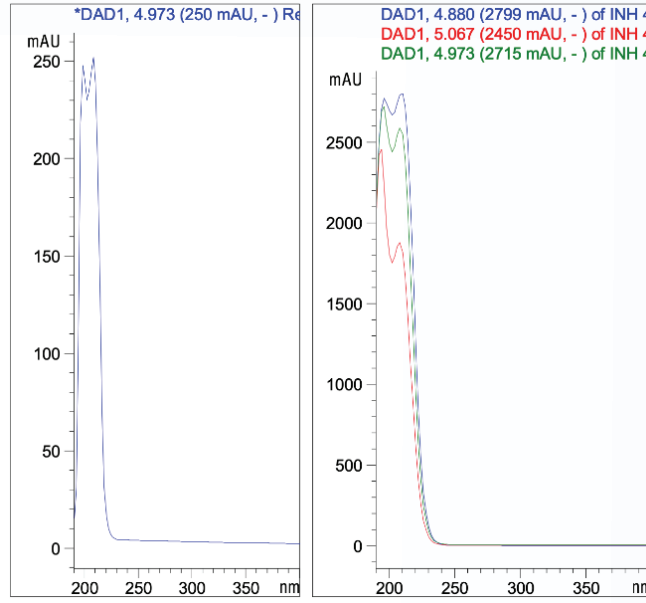
[INH4Me] için 240.2 m/z'de [M+1] piki, 179 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 26)



Şekil 26 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH4Me]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu

UV spektrumu:

Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, kontrol (kofaktörsüz) tüplerde bulunan standart [INH4Me] ve [INH4Me]'nin UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 27)



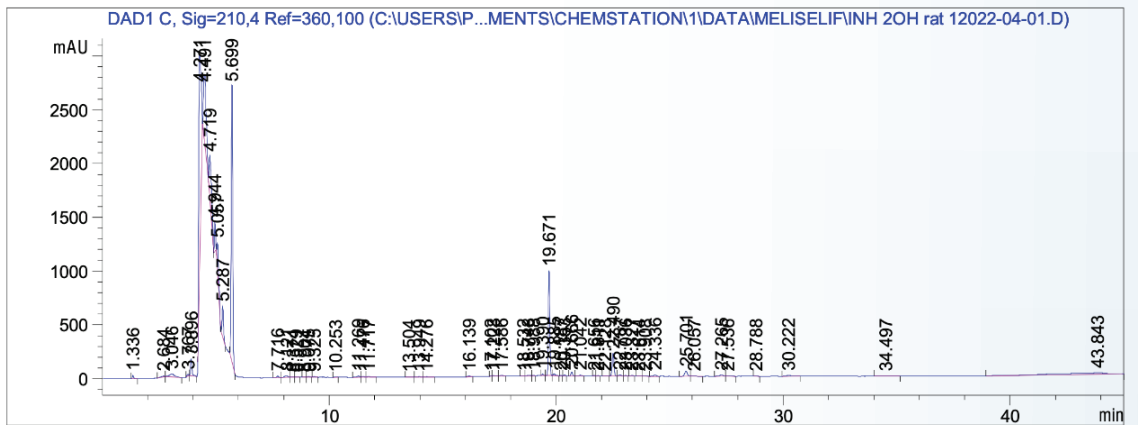
Şekil 27 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH4Me]'nin UV spektrumu

Kofaktörsüz inkübasyon ortamında INH4Me bileşiğinin herhangi bir metabolik ürün oluşturmadığı gözlenmiştir.

N'-(E)-(2-hidroksifenil)metiliden]piridin-4-karbohidrazid [INH2OH] bileşiğinin inkübasyon çalışmaları

Test
inkübasyon
çalışmaları

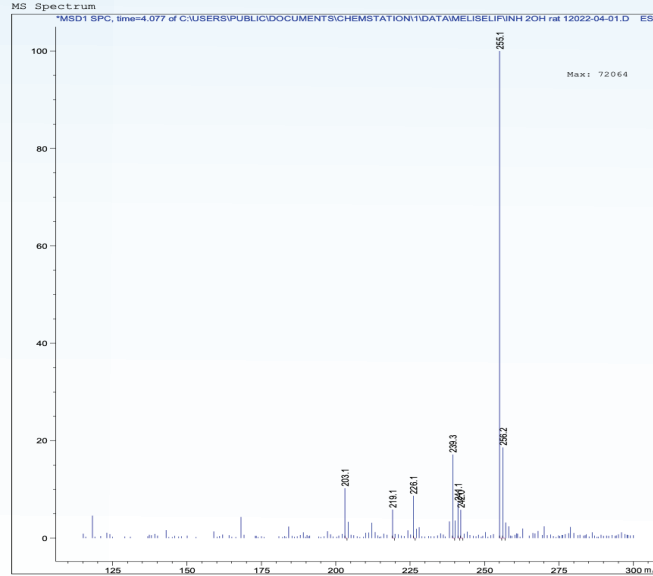
HPLC
kromatogram



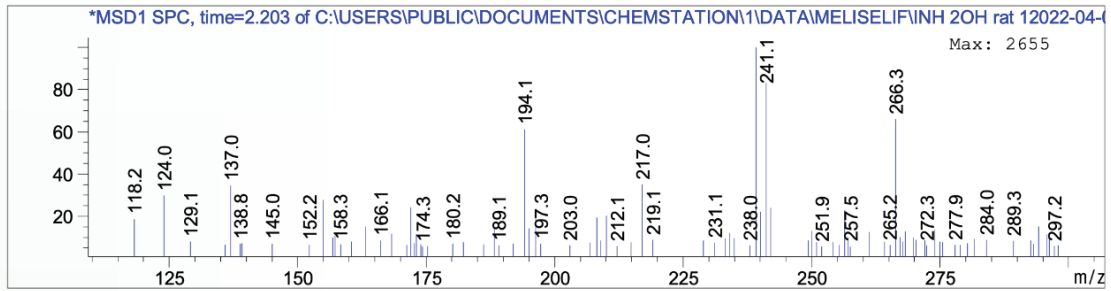
Şekil 28 Test tüplerinde tespit edilen [INH2OH]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

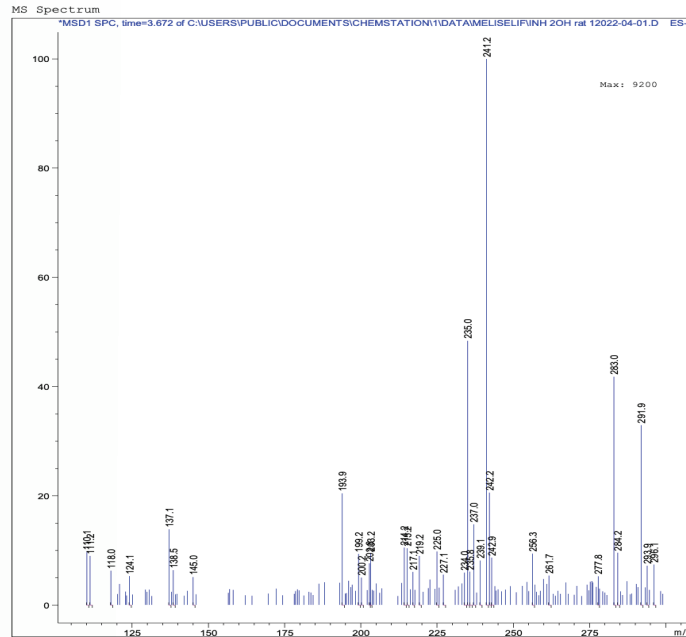
[INH₂OH] için 242.2 m/z'de [M+1] piki, 255 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 29)



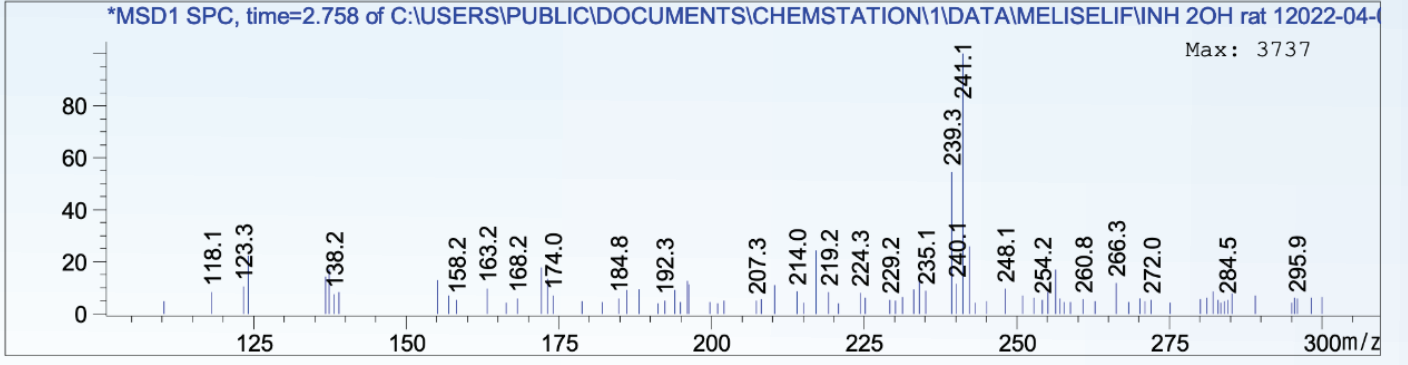
Şekil 29 Test tüplerde tespit edilen [INH₂OH]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu [2OH₂HYD] için 137 m/z'de [M+1] piki, 241.1 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 30)



Şekil 30 Test tüplerde tespit edilen [2OH₂HYD]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu [INH] için 138.5 m/z'de [M+1] piki, 241.2 m/z'de temel pik görülmüştür (Şekil 31)

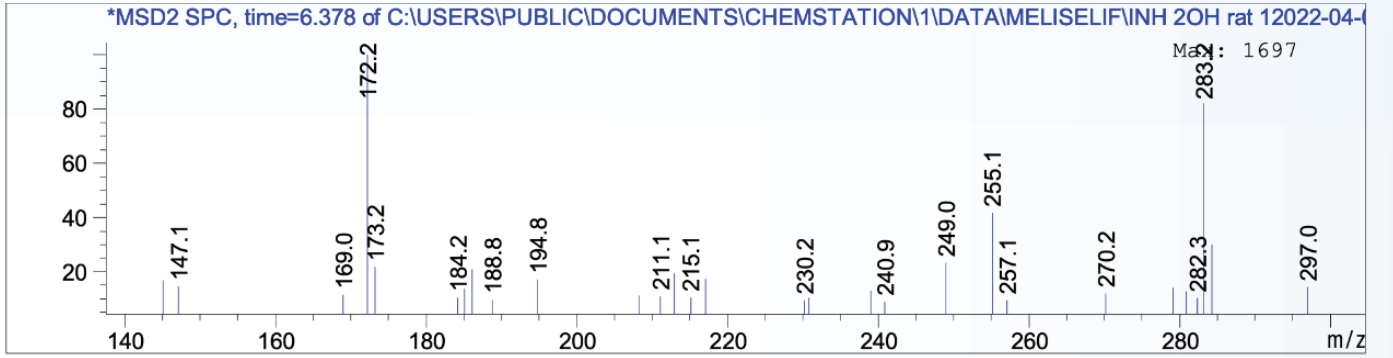


Şekil 31 Test tüplerde tespit edilen [INH]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu [2OHALD] için 123.3 m/z'de [M+1] piki, 241.1 m/z'de temel pik görülmüştür (Şekil 32)



Şekil 32 Test tüplerde tespit edilen [2OHALD]'nin pozitif iyon modunda kütle spektrumu

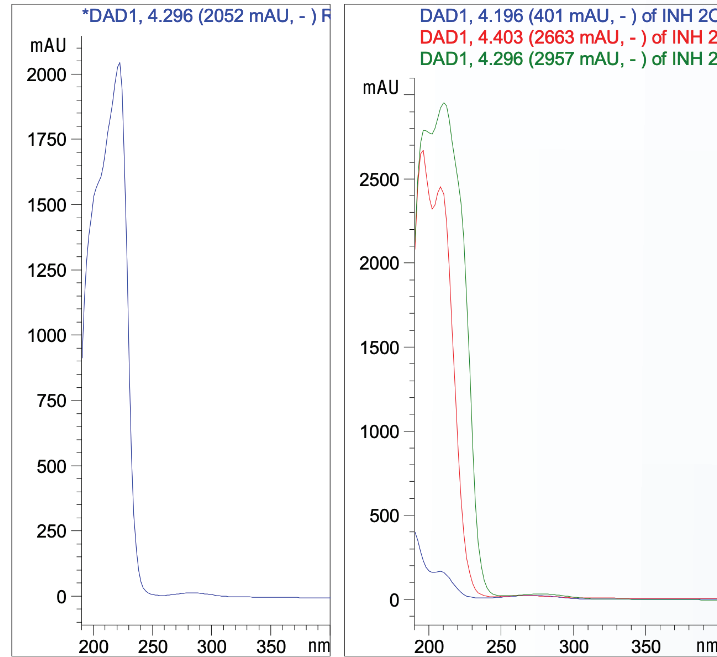
[2OHNO] için 257.1 m/z'de [M+1] piki, 172.2 m/z'de temel pik görülmüştür (Şekil 33)



Şekil 33 Test tüplerde tespit edilen [2OHNO]'nin negatif iyon modunda kütle spektrumu

UV spektrumu:

Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, test tüplerinde bulunan standart [INH2OH] ve [INH2OH] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 34)

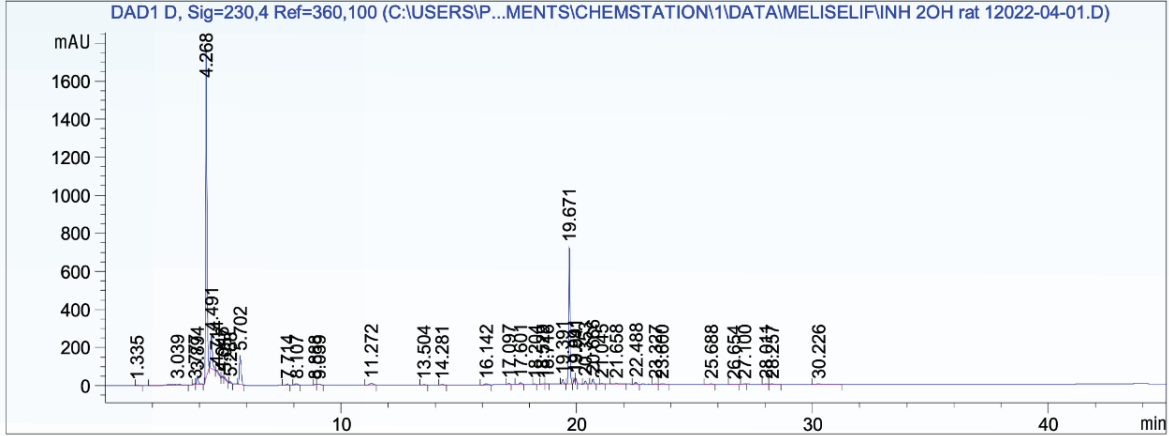


Şekil 34 Test tüplerinde tespit edilen [INH2OH] UV spektrumu

INH2OH bileşiminin in vitro mikrozomal metabolizma çalışmaları sonucu N-oksit ve hidrolitik metabolitlerine dönüştüğü gözlenmiştir.

INH2OH bileşimine ait kontrol inkübasyon deneyleri (Denatüre mikrozom)

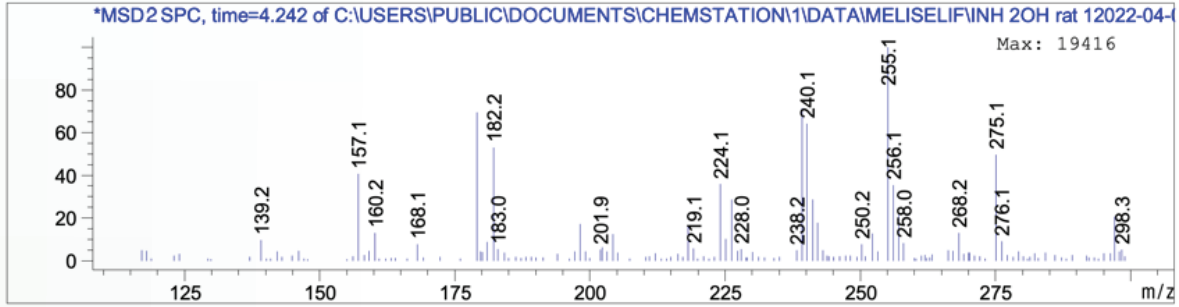
HPLC kromatogram



Şekil 35 Kontrol (denature) tüplerde tespit edilen [INH2OH]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

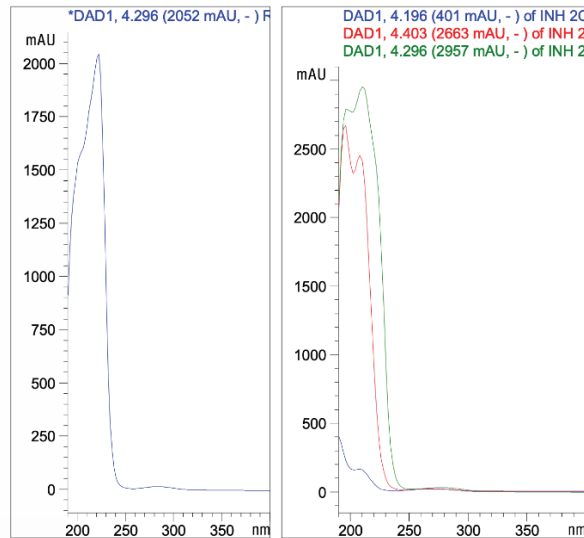
[INH2OH] için 240.1 m/z'de [M+1] piki, 255.1 m/z'de temel pik görülmüştür (Şekil 36)



Şekil 36 Kontrol (denature) tüplerde tespit edilen [INH2OH]'nin negative iyon modda kütle spektrumu

UV spektrumu:

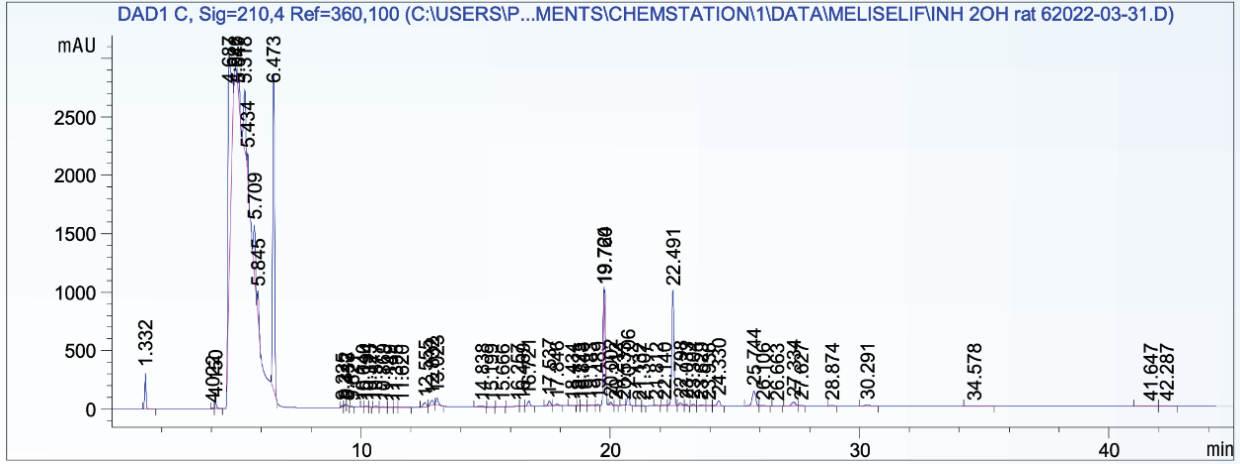
Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, kontrol (denatüre) tüplerde bulunan standart [INH2OH] ve [INH2OH] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 37)



Şekil 37 Kontrol (denatüre) tüplerde tespit edilen INH2OH'nin UV spektrumu

Denatüre mikrozom ile yapılan deneylerde INH2OH bileşiminin herhangi bir metabolic ürüne dönüşmediği gözlenmiştir.

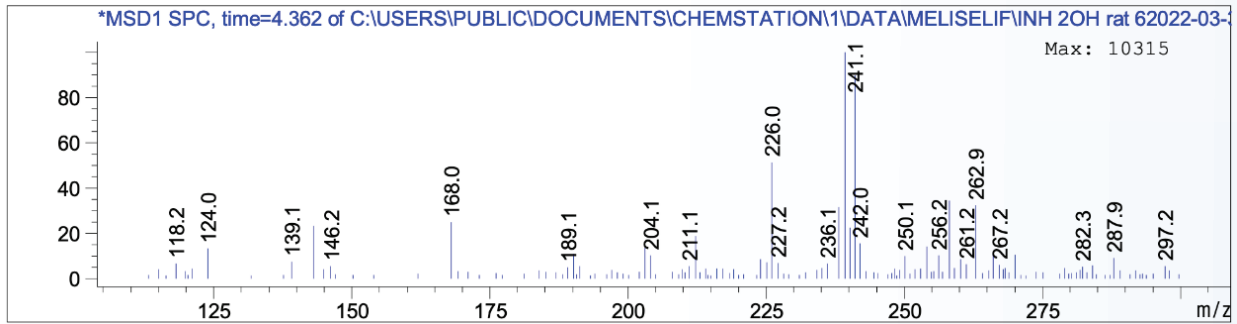
INH2OH bileşimine ait control inkübasyon deneyleri (Kofaktörsüz ortam) HPLC kromatogram



Şekil 38 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH2OH]'nin LC-MS spektrumu

Kütle spektrumu:

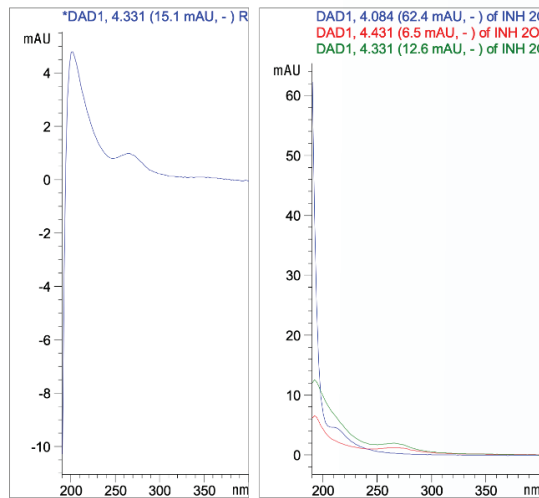
[INH2OH] için 242 m/z'de [M+1] piki, 241.1 m/z'de temel pik görülmüştür. (Şekil 39)



Şekil 39 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH2OH]'nin pozitif iyon modda kütle spektrumu

UV spektrumu:

Aşağıdaki spektrumdan görülebileceği gibi, kontrol (kofaktörsüz) tüplerde bulunan standart [INH2OH] ve [INH2OH] UV spektrumu eşleşmektedir. (Şekil 40)



Şekil 40 Kontrol (kofaktörsüz) tüplerde tespit edilen [INH2OH]'nin UV spektrumu

INH₂OH yapısının inkübasyon çalışmalarında kofaktörsüz ortamda herhangi bir metabolik ürüne dönüşmediği gözlenmiştir.

SONUÇLAR

Bu deneyde, izoniazidin üç farklı sübstitüe benzaldehit ile reaksiyonundan üç substrat sentezlenmiştir. Ek olarak, her substrat için iki olası metabolit sentezlenmiştir. Yapıları spektroskopik ve spektroskopik olmayan yöntemlerle aydınlatılmıştır. Sentezler tamamlandıktan sonra sıçan karaciğerinden hazırlanan mikrozomlar kullanılarak metabolizma çalışmaları yapılmıştır. Metabolizma periyodu sona erdikten sonra, metabolitler metabolizma ortamından dikkatlice ekstrakte edilmiş ve LC-MS ile analizleri yapılmıştır. Bu prosedürden elde edilen sonuçlar, standart bileşiklerin LC-MS sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu deneyin sonuçlarından, izoniazidden türetilen hidrazon bileşiklerinin metabolizmasında, N-oksit metabolitlerinin meydana geldiği, ancak sadece insan vücudunun koşullarını simüle eden mikrozomların varlığında görülebilir olduğu ispatlanmıştır. Karaciğer enzimlerinin yokluğunda hidrazon bileşiklerinin toksik olduğu bilinen N-oksit metabolitlerine metabolize olmadığı kontrol tüplerinden elde edilen sonuçlardan görülebilir. N-oksit metabolitlerinin yanı sıra beklenen izoniazid ve benzaldehitlerin de metabolizma sonucu oluştuğu görülmüştür. Bu yapıların varlığı LC-MS kromatografisi ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada ilk defa izoniyazit üzerinden geliştirilen hidrazonların original N-oksit metabolitleri sentezlenmiştir. Bu oksidasyon ürünlerinin de mikrozomal ve kofaktöre bağlı olarak oluştuğu gözlenmiştir.

KAYNAKÇA

[1] Cruz-Knight, W, Blake-Gumbs, L. (2013). Tuberculosis. Prim. Care. 2013; 40(3): 743-756.

[2] Kliegman, R, St Geme, J, Tasker, R, Shah, S, Blum, N, Wilson, K, Nelson. Textbook of pediatrics 2020; (21st ed., pp. 1560-1565). Philadelphia: Elsevier.

[3] Ulgen, M, Gorrod, JW. Microsomal formation of N-benzyl-4-hydroxymethylaniline from N-benzyl-4-methylaniline. J.Pharm Pharmacol, 1992; 44(10): 865-866.

TEŞEKKÜR

Bu proje TUBİTAK 2209-A 2021/1 1919B012103037 ile desteklenmiştir.

İBUPROFEN İLE SÜLFONAMİT KOMBİNASYONUyla OLUŞTURULAN KARŞILIKLI ÖN İLAÇLARIN (CO-DRUG) İN VİTRO MİKROZOMAL METABOLİZMA ÇALIŞMALARI

P27

Melis ÇETİN¹, Jülide Cansu KARAKOÇ¹, Başak TÜRK ERBUL¹, Göknil Pelin COŞKUN¹, Mert ÜLGEN¹

¹Acibadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 34668 İstanbul.
(e-posta: mert.ulgen@acibadem.edu.tr)

GİRİŞ

Co-drug veya “karşılıklı ön ilaç”, bir veya her iki ilacın farmasötik özelliklerini geliştirmek için tek bir moleküle kimyasal olarak bağlı iki sinerjistik ilaçtan oluşur. Yeni oluşturulan bağın basit metabolik reaksiyonlarla aktif ilaçları açığa çıkarmaları beklenir. Özellikle polifarmaside karşılıklı ön ilaçlar büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bir non steroid alerji önleyici ve bir antibakteriyel ilacın karşılıklı ön ilaç olarak geliştirilmesi araştırmanın en önemli teşvik unsuru olmuştur. Bu çalışmada, ibuprofen ve sülfonamid grubu ilaçlarla karşılıklı ön ilaç tasarımı yapılmıştır. Bu karşılıklı ön ilaçların in vitro mikrozomal ortamda aktif ilaçları açığa çıkarıp çıkarmadığı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç

Kromatografik analizler ince tabaka kromatografisi (TLC) ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS) yöntemleri ile yapılmıştır. TLC için adsorban olarak 0,2 mm kalınlığındaki 20x20 cm hazır silika jel plaklar (Merck-Silicagel TCC Aluminium Sheet ve HPTLC Silica gel 60 F254) kullanılmıştır. LC-MS çalışmaları Agilent 1260 Infinity II LC-MS cihazında yapılmış olup ACE C18 Kolon kullanılmıştır. Erime Derecesi Tayini: Stuart SMP50 Automatic Melting Point Cihazı ile belirlenmiştir.

Yöntem

Sentez

DCC (IBSMT ve IBSD) ile ibuprofen-sülfonamid karşılıklı ön ilaçların sentezi

İbuprofen (2 mmol) 30 ml diklorometan içerisinde çözülür ve üzerlerine eş-molar DCC eklenir. Beyaz çökeltiği görüldüğü zaman üzerine diklorometan içerisinde çözülmüş sülfonamid bileşikleri (sülfamerazin veya sülfadiazin) (2 mmol) eklenir. Çöken madde süzülür, kurutulur ve metanolden kristallendirilir. [1]

Kromatografik çalışmalar

Substrat ve metabolitlerin kromatografik çalışmaları Agilent 1260 Infinity II LC-MS cihazı ile belirlenmiştir. ACE C18 kolon kullanılmış ve asetonitril/su (3:1 v/v) izokratik akışta 0.6 ml/dk akış hızında çalışılmıştır. G7115A 1260DAD WR dedektör, G7311B 1260 Kuad pompa sistemi, G1328C 1260 manuel enjeksiyon ünitesi G6125B LC/MSD dedektörü kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 22°C ayarlanarak pikler DAD dedektörle tespit edilmiştir.

Biyolojik Çalışmalar

Mikrozomlar sıçan karaciğerinden hazırlanmıştır. Hayvanlar sakrifiye edilmeden önce 24 saat sadece su verilmiştir. Kullanılacak karaciğer %0.9 sodyum klorür çözeltisine koyularak kanından arındırılmış ve 0.25 M izotonik sukroz çözeltisinde (1 g karaciğer için 3 ml sukroz kullanılmıştır) homojenize edilmiştir. Mikrozomlar kalsiyum klorür çöktürme metodu ile literature uygun yöntemle hazırlanmıştır. [2]

İnkübasyon

Mikrozom, ko-faktör ve substratların inkübasyon işlemleri 3 tekrar test, 2'şer tekrar kontrol deneyleri ile yapılmıştır. Her bir inkübasyon tüpü içerisinde 1 ml mikrozom, 2 ml co-faktör ve 2 µM substrat eklenerek 37 °C su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi diklorometan eklenerek durdurulmuş ve inkübasyon ortamında bulunan substrat ve metabolitler DCM ile (3x5 ml) ekstre edilmiştir. Elde edilen organik faz azot gazı altında uçurularak 2-8 °C'de muhafaza edilmiştir. Analizler, tüp içeriklerinin 200 µl metanolde çözülerek LC-MS cihazına verilmesi ile yapılmıştır.

Tablo 1 Karşılıklı ön ilaçların inkübasyon prosedürü

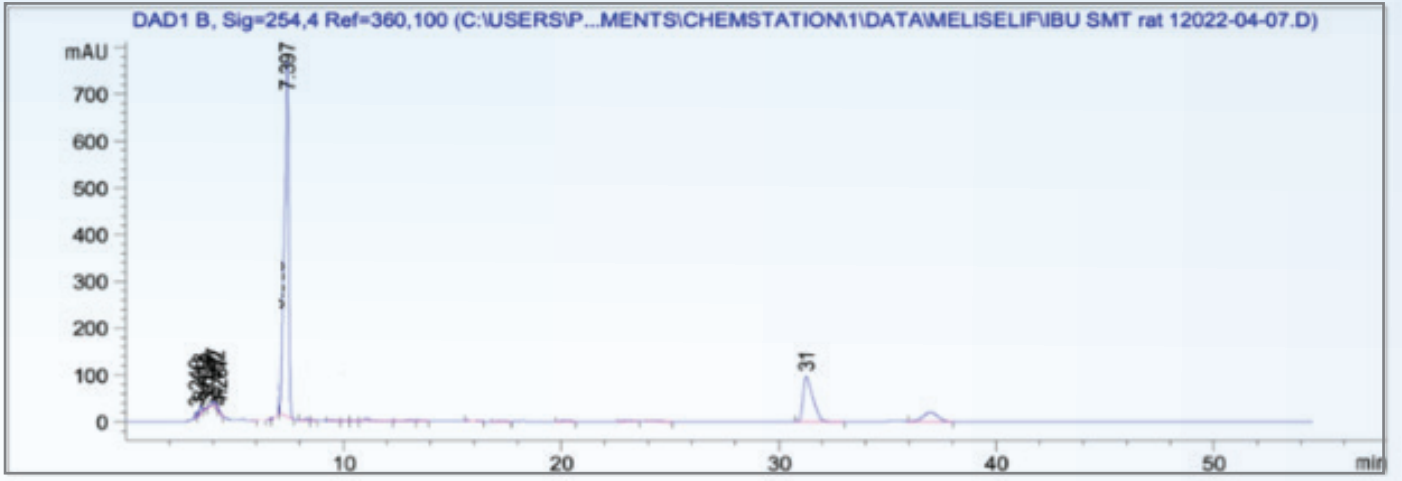
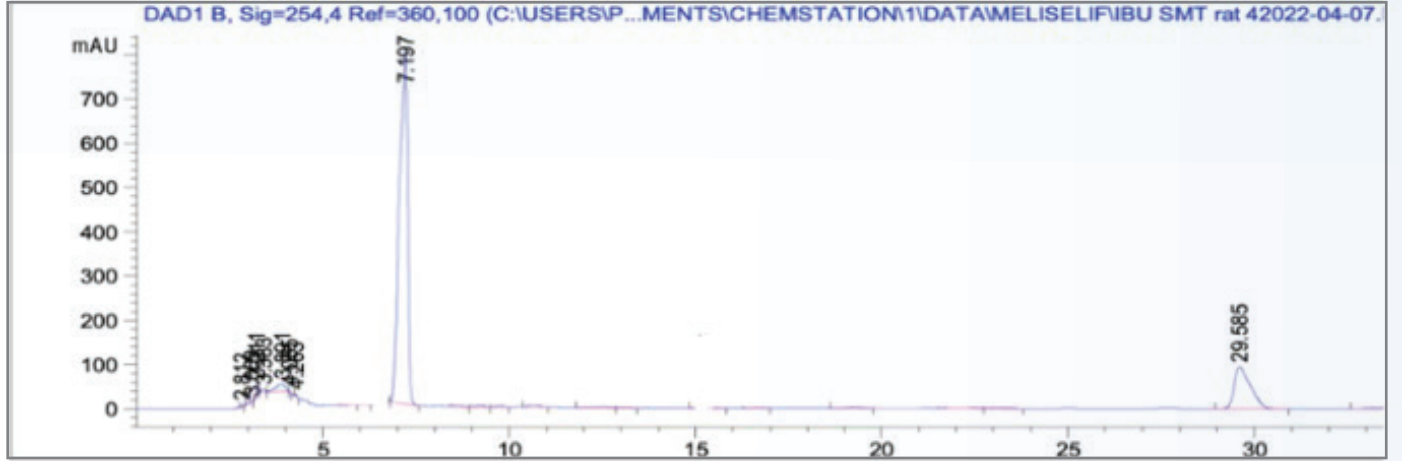
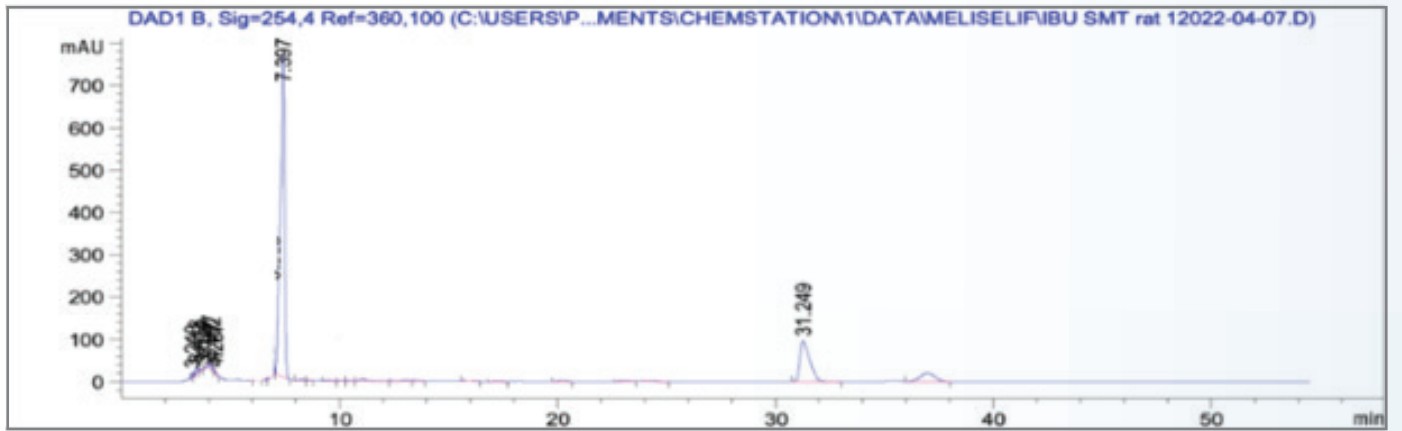
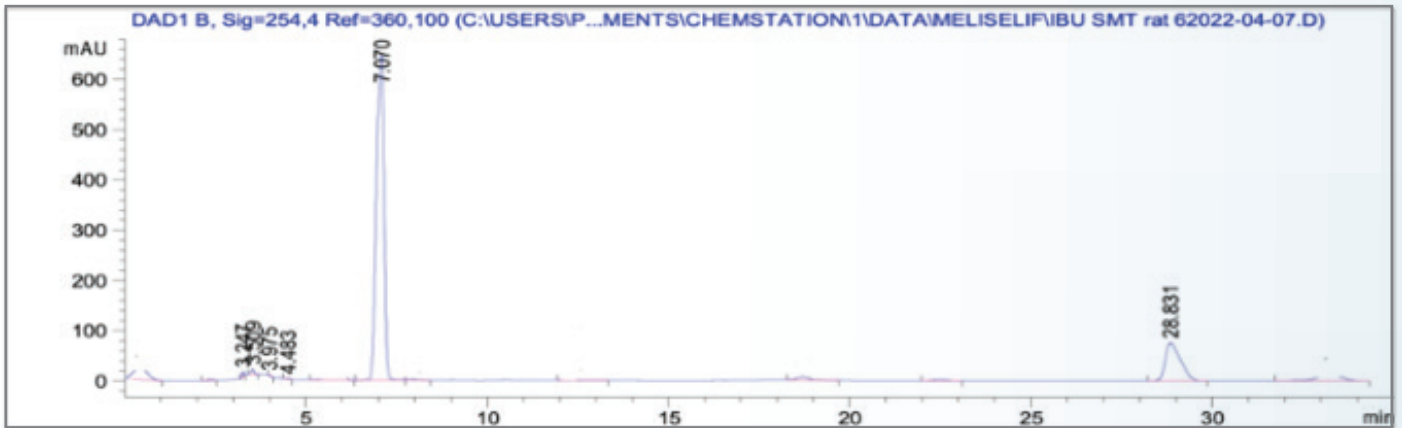
Kod	Tüp	Substrat	Mikrozom	Kofaktör
IBSMT 1 / IBSD 1	Test 1	+	+	+
IBSMT 2 / IBSD 2	Test 2	+	+	+
IBSMT 3 / IBSD 3	Test 3	+	+	+
IBSMT 4 / IBSD 4	Kontrol 4	+	Denatüre mikrozom	+
IBSMT 5 / IBSD 5	Kontrol 5	+	Denatüre mikrozom	+
IBSMT 6 / IBSD 6	Kontrol 6	+	+	Tampon
IBSMT 7 / IBSD 7	Kontrol 7	+	+	Tampon

BULGULAR VE TARTIŞMA

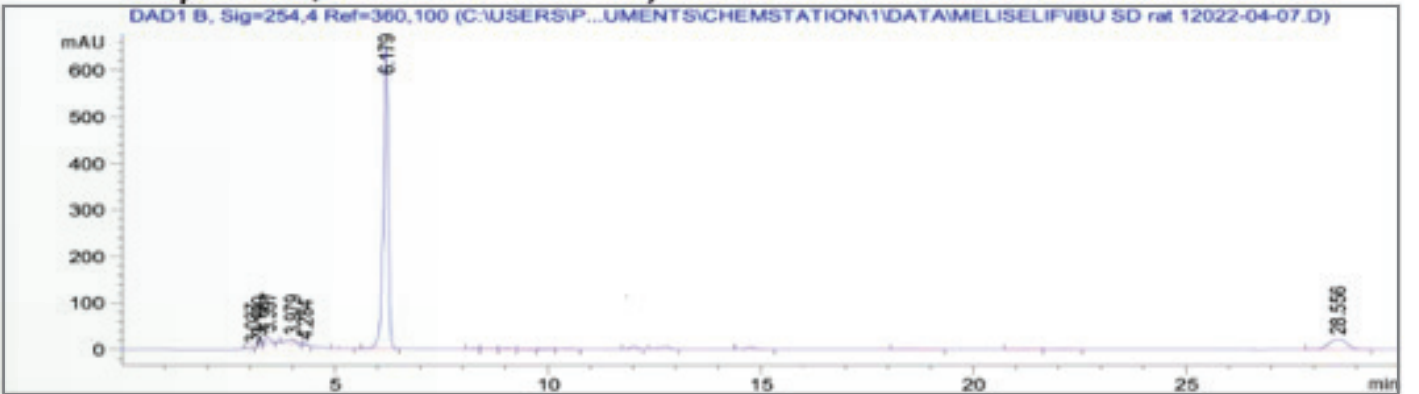
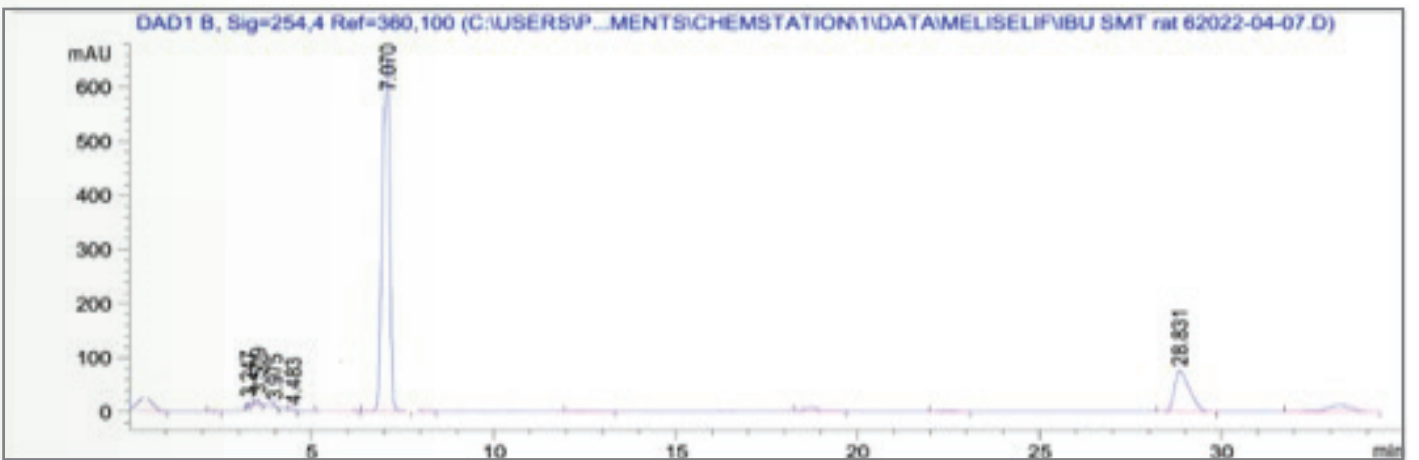
Sentezlenen karşılıklı ön ilaçların yapıları LC-MS yöntemi ile aydınlatılmıştır. Substrat ve metabolitlerin kromatografik ayrımları LC-MS sistemi ile yapıp standart pikler elde edilmiştir. İnkübatlar, daha sonrasında aynı LC-MS yöntemi ile sisteme verilerek kütle/yük oranlarına göre standart verilerle karşılaştırılmıştır.

Tablo 2 Bileşiklerin bazı analitik özellikleri

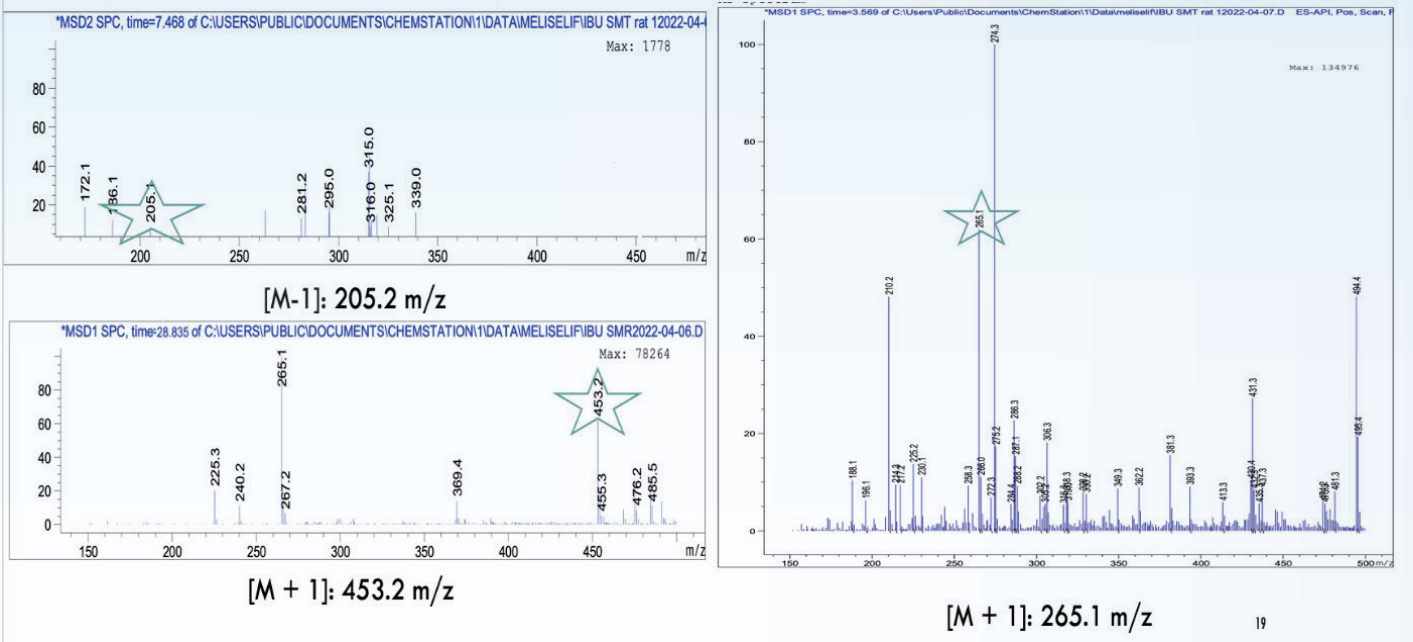
Bileşik	Molekül formülü	Molekül ağırlığı (g/mol)	Erime derecesi (°C)	R _f x 100	R _t (dk)	Molekül iyon piki
2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoyl chloride	C ₁₃ H ₁₇ ClO	224.73 g/mol	72.5	80 (Benzen: MeOH 9:1)	NT	225.9 m/z (M+1)
IBSMT	C ₂₄ H ₂₈ N ₄ O ₃ S	452.58 g/mol	151.8	40 (Hegzan: Etil asetat 5:5)	26	451 m/z (M-1)
IBSD	C ₂₃ H ₂₆ N ₄ O ₃ S	438.55 g/mol	177.8	41 (Hegzan: Etil asetat 5:5)	28	439.6 m/z (M+1)

a**b****c****d**

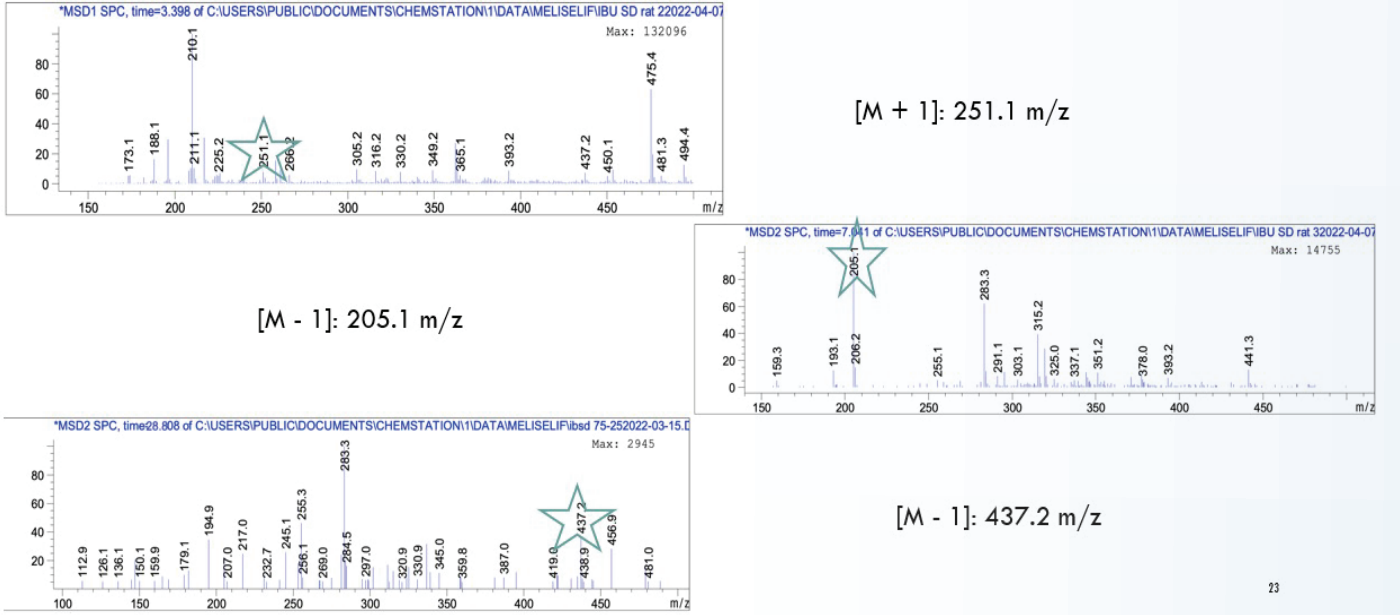
Şekil 1 IBSMT karşılıklı ön ilacına ait HPLC kromatogramı (a: standart ilaç ve metabolitleri, b: test inkübasyon örneği, c: kontrol (denatüre mikrozom) inkübasyon örneği, d: kontrol (ko-faktörsüz) inkübasyon örneği)

a**b****c****d**

Şekil 2 IBSD karşılıklı ön ilacına ait HPLC kromatogramı (a: standart ilaç ve metabolitleri, b: test inkübasyon örneği, c: kontrol (denatüre mikrozom) inkübasyon örneği, d: kontrol (ko-faktörsüz) inkübasyon örneği)



Şekil 3 IBSMT karşılıklı ön ilacına ait kütle spektrumu (a: ibuprofen pikine ait kütle spektrumu, b: sülfamerazin pikine ait kütle spektrumu, c: IBSMT pikine ait kütle spektrumu)



Şekil 4 IBSD karşılıklı ön ilacına ait kütle spektrumu (a: ibuprofen pikine ait kütle spektrumu, b: sülfadiazin pikine ait kütle spektrumu, c: IBSD pikine ait kütle spektrumu)

Yapılan çalışmalarda sentezlenen karşılıklı ön ilaçların enzimatik ve non-enzimatik olarak kendisini oluşturan 2 ana ilaca da dönüştüğü gözlenmiştir. Bileşiklerin hızlı ve kolay bir şekilde aktif ilaçları açığa çıkarmaları farmakolojik olarak bir avantaj olsa da stabilite açısından sorun yarattığı düşünülmektedir. Orijinal bileşiklerin amit bağı ile olan stabilitesinin, biyolojik sistemlerde düşük olacağı ön görülmüştür.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, farklı sübstitüentlere sahip iki yeni bileşik sentezlenmiştir. Safılıkları spektroskopik ve kromatografik teknikler kullanılarak doğrulanmıştır. İbuprofen-sülfamerazin ve ibuprofen-sülfadiazin metabolizmasını takiben, substratlar için hidrolitik reaksiyon gözlenmiştir. Reaksiyon, mikrozomlara veya kofaktörlere bağlı değildir. Bu sonuç, yeni bileşikler ibuprofen-sülfamerazin ve ibuprofen-sülfadiazin eşkarşılıklı ön ilacının, antibakteriyel ve antienflamatuar tedavi için olası bir ilaç hedef tasarımı olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, enzimatik koşullar olmadan ilgili hidrolitik ürünlere potansiyel dönüşümlerini saptamak için kararlılık çalışmaları yapılmalıdır.

KAYNAKÇA

- [1] Makhija, DT, Somani, RR, Chavan, AV. Synthesis and pharmacological evaluation of antiinflammatory mutual amide prodrugs. Indian J. Pharm. Sci.2013;75(3): 353-357.
- [2] Ulgen, M., & Gorrod, J. W. (1992). Microsomal formation of N-benzyl-4-hydroxymethylaniline from N-benzyl-4-methylaniline. J. Pharm. Pharmacol. 1992; 44(10): 865-866.

TEŞEKKÜR

Bu proje, TUBİTAK 2209-A 2021/1 1919B012102927 tarafından desteklenmiştir.

ARİLOKSİ BENZAMİT YAPISINDA SİRTUİN İNHİBİTÖRÜ P28 OLABİLECEK BİLEŞİKLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Semih YAĞCI¹, Mahmut GÖZELLE¹, Yeşim ÖZKAN², Filiz BAKAR-ATEŞ³, Gökçen EREN¹

¹SIRTeam Grubu, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara

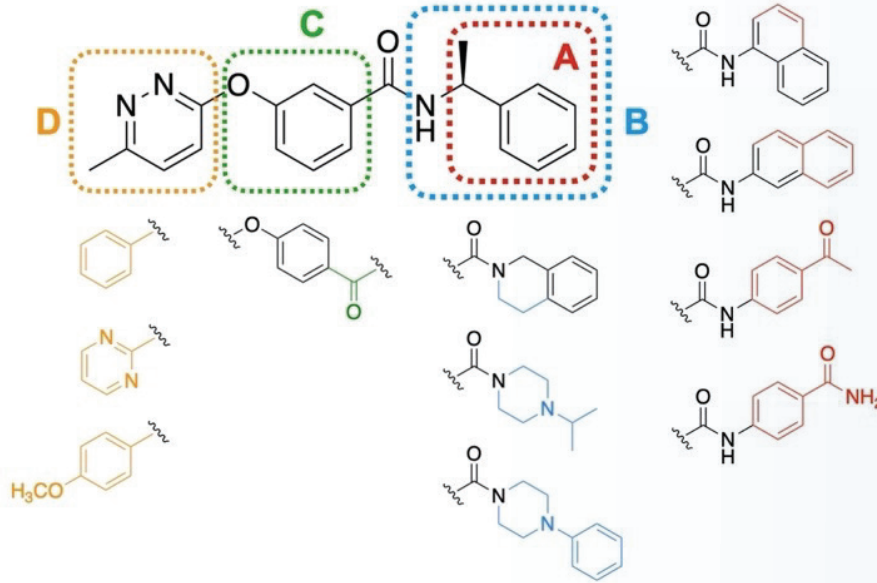
²Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06330 Ankara

³Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 06100 Ankara

(e-posta: smhygc55@gmail.com)

GİRİŞ

Sirtuinler (SIRT), bakteriden memeliye kadar tüm canlı gruplarında varlığını evrimsel olarak korumuş olan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) bağımlı histon deasetilaz (HDAC) enzim ailesine mensup bir gruptur. Bu enzim grubu, NAD⁺ kosubstratını kullanarak histon veya histon olmayan substratlardaki lizin kalıntıları geri dönüşümlü olarak deasetile etmektedir. Çok sayıda çalışma, sirtuinlerin anormal enzimatik aktivitesinin diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ile bağlantılı olduğunu göstermiştir [1]. Daha önceki çalışmamızda yeni SIRT inhibitörü bileşiklerin keşfi amacıyla gerçekleştirilen farmakofor temelli sanal tarama çalışması sonucu SIRT1/2 inhibitör etki gösteren ariloksibenzamit yapısında bir bileşiğine (A bileşiği: 300 µM'da inhibisyon, SIRT1: %31,45; SIRT2: %42,47) ulaşılmıştır [2]. Tez çalışmamızda, daha etkili türevlere ulaşmak amacıyla bu bileşik üzerinde moleküler docking ve farmakofor modelleme gibi yapı-temelli ilaç tasarımı tekniklerinin yardımıyla "öncü bileşik optimizasyonu" yapılarak on tanesi yeni olmak üzere on dört bileşik tasarlanmıştır (Şekil 1). Sentez çalışması tamamlanan on dört bileşik, in vitro SIRT1-3 inhibitör etkileri açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, GS01 (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %56,53; SIRT2: %10,80), GS02 (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %48,15; SIRT2: inhibisyon yok) ve GS11 (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %46,04; SIRT2: inhibisyon yok) kodlu bileşiklerde selektif SIRT1 inhibitör etki gözlenirken, seri içerisinde en yüksek SIRT2 inhibitör etki GS14 kodlu bileşik (100 µM'da inhibisyon, SIRT1: %47,16; SIRT2: %51,61) için gözlenmiştir. Ayrıca, GS01, GS02, GS11 ve GS14 kodlu bileşiklerin, yapısal modifikasyonlarla sağlanan SIRT1/2 inhibisyonundaki iyileşmenin sitotoksik özelliklerine etkisini belirlemek için MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına karşı in vitro sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkileri, SIRT1/2 inhibisyon değerleriyle ilişkili bulunmuştur. Sonuç olarak, çalışmanın başlangıç noktası olan ariloksibenzamit türevi bileşiğe göre daha etkili ve selektif SIRT inhibitörlerine ulaşılmıştır.

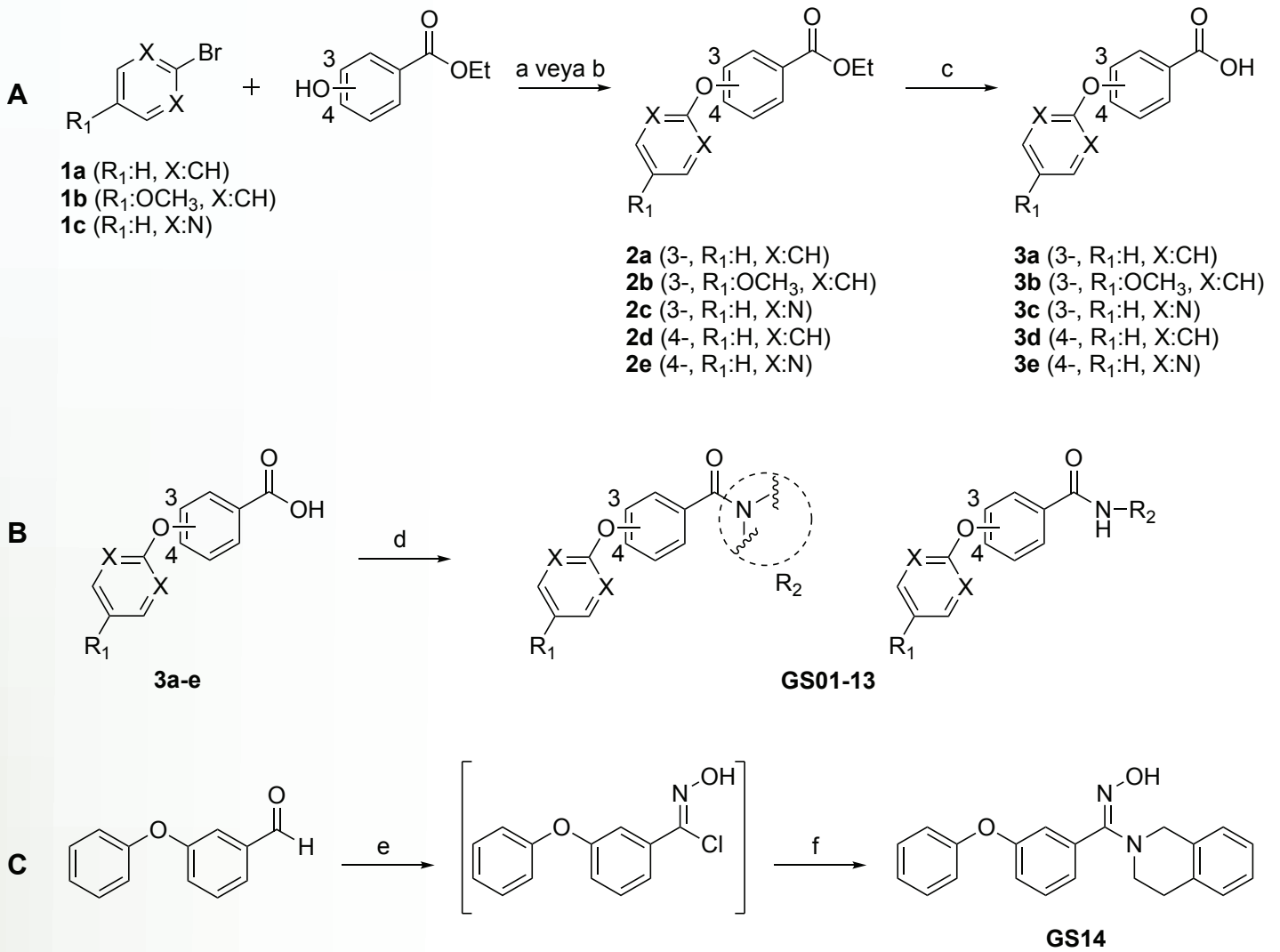


Şekil 1 Bileşik A üzerinde gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonlar

GEREÇ VE YÖNTEM

Sentez

Tasarlanan **GS01-14** kodlu bileşiklerinin sentezi için izlenen yol Şema 1'de özetlenmiştir. Etil arilbenzoat türevleri (**2a**, **2b**, **2d**), bromobenzen (**1a**) veya 4-bromoanisolün (**1b**), etil 3-/4-hidroksibenzoat ile CuI ve N,N-dimetilglisin varlığında verdiği kenetlenme reaksiyonu sonucu %48-85 arasında değişen verimlerle elde edilmiştir [3]. Diğer etil arilbenzoat türevleri (**2c**, **2e**) için ise, 2-bromopirimidin (**1c**) ile etil 3-/4-hidroksibenzoat, Pd(dba)₂ ve t-BuXPhos kullanılarak reaksiyona sokulmuş, %79-81 verimle kenetlenme ürünleri elde edilmiştir [4]. Daha sonra, Bileşik 2a-e'nin bazik hidrolizi ile ariloksibenzoik asit türevlerine (**3a-e**) ulaşılmıştır. Elde edilen **3a-e** kodlu bileşikler sonrasında 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC) ve 4-dimetilaminopiridin (DMAP) varlığında uygun aminlerle reaksiyona sokularak %40-92 arasında değişen verimlerle **GS01-13** kodlu final bileşikler elde edilmiştir. Bileşik **GS14** için öncelikle 3-fenoksibenzaldehit ve NH₂OH.HCl arasındaki reaksiyon sonucu, 3-fenoksibenzaldehit oksim ara ürünü elde edilmiş, ileri bir saflaştırma işlemi uygulanmadan N-klorosüksinimit (NCS) ile reaksiyona sokularak 3-fenoksibenzohidroksiminol klorür ara ürününe ulaşılmıştır. Son basamakta ise, 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin ile 3-fenoksibenzohidroksiminol klorürün trietilamin (TEA) varlığında verdiği reaksiyon sonucu %72 verimle **GS14** kodlu bileşik elde edilmiştir [5]. Tez kapsamında sentez çalışmaları tamamlanan [6] ara ürünlerin yapı aydınlatma çalışmalarında HRMS verileri, final bileşiklerde ise ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve HRMS verileri kullanılmıştır.



Şema 1. **GS01-14** kodlu bileşiklerin sentez şeması. (a) **2a**, **2b**, **2d**: CuI, CS₂CO₃, N,N-dimetilglisin, 1,4-dioksan, DMF, 100 °C, 24 saat; (b) **2c**, **2e**: Pd(dba)₂, t-BuXPhos, K₃PO₄, toluen, reflaks, 6-8 saat; (c) i. NaOH, H₂O, THF, etanol, reflaks, 1-2 saat, ii. der. HCl; (d) uygun amin türevi, EDC, DMAP, DCM, oda sıcaklığı, 24 saat; (e) i. NH₂OH.HCl, NaOH, H₂O, etanol, oda sıcaklığı, 1 saat, ii. NCS, DMF, oda sıcaklığı, 4 saat; (f) 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin, TEA, DCM, 0 °C →oda sıcaklığı, 1 saat.

SIRT1-3 inhibisyon alışmaları

Sentezlenen bileşiklerin in vitro SIRT inhibitör etkilerinin belirlenmesinde FLUOR DE LYS® Fluorometric Drug Discovery Kiti (BML-AK555-0001 SIRT1; BML-AK556-0001 SIRT2; BML-AK557-0001 SIRT3, Enzo Life Sciences) üretici firmanın belirlediği protokole uyularak kullanılmıştır [2]. Referans bileşik olarak SIRT inhibitörü suramin ve selektif SIRT1 inhibitörü EX-527 seçilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları

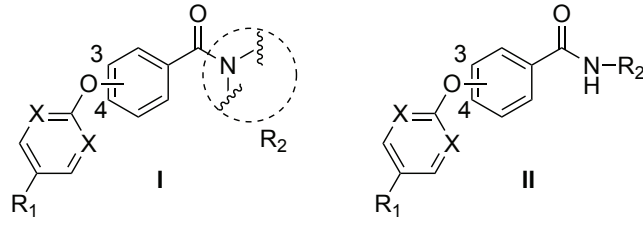
SIRT1/2 enzim aktivitesine etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin sitotoksik etkileri, insan meme kanser hücre hattı MCF-7 üzerinde MTT yöntemiyle [7, 8] belirlenmiştir.

Moleküler docking alışmaları

Moleküler docking alışmaları, Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2020-2 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020) yazılımının Glide modülü ile insan SIRT1 (PDB: 4I5I) [9] ve insan SIRT2 (PDB: 5DY4) [10] enzimlerinin x-ray kristal yapıları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIşMA

Sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan **GS01-14** kodlu bileşiklerin SIRT1-3 enzimleri üzerine etkileri %inhibisyon değerleri üzerinden Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1 Test edilen moleküllerin SIRT1-3 %inhibisyon değerleri

Kod	Tür	R ₁	X	Konum	R ₂	% İnhibisyonu		
						SIRT1	SIRT2	SIRT3
GS01	I	H	CH	3	3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il	56.53±3.84	10.80±1.62	i.y.
GS02	I	H	CH	3	4-izopropilpiperazin-1-il	48.15±3.68	i.y.	i.y.
GS03	I	H	CH	3	4-fenilpiperazin-1-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS04	I	OCH ₃	CH	3	4-fenilpiperazin-1-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS05	II	H	CH	3	4-(COCH ₃)fenil	i.y.	11.06±0.91	5.79±1.16
GS06	I	H	N	3	3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS07	II	H	N	3	1-naftil	i.y.	i.y.	i.y.
GS08	II	H	N	3	2-naftil	36.08±2.74	17.12±2.05	i.y.
GS09	I	H	CH	4	3,4-dihidroizokinolin-2(1H)-il	21.50±5.13	i.y.	i.y.
GS10	II	H	CH	4	4-(COCH ₃)fenil	36.12±1.01	i.y.	i.y.
GS11	II	H	CH	4	4-(CONH ₂)fenil	46.04±7.31	i.y.	i.y.
GS12	I	H	N	4	4-izopropilpiperazin-1-il	i.y.	i.y.	i.y.
GS13	II	H	N	4	1-naftil	i.y.	i.y.	i.y.
GS14						47.16±1.49	51.61±0.14	i.y.
A ^b						31.45±1.73	42.47±1.42	18.23±2.61
EX-527						97.56±2.89	76.39±2.49	44.61±3.81
Suramin						94.52±0.92	98.37±0.25	96.82±3.26

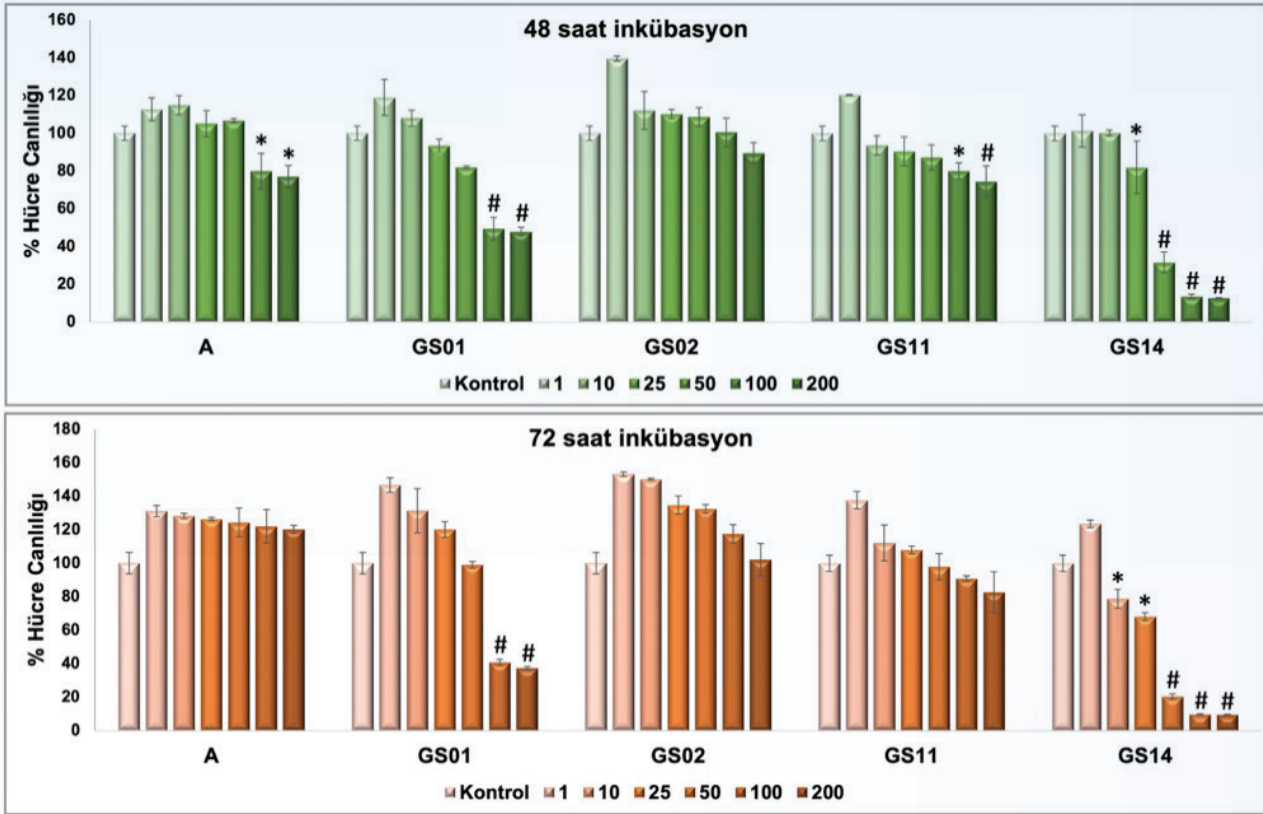
^a% İnhibisyon değerleri "ortalama değer±standart sapma" olarak verilmiştir. n=2 olarak test edilmiştir.

i.y.: inhibisyon yok.

^b300 µM konsantrasyonda test edilmiştir.

Sentez ve yapı aydınlatma çalışmaları tamamlanan on dört final bileşik 100 µM konsantrasyonda SIRT1, SIRT2 ve SIRT3 enzimlerine karşı etkinliğinin belirlenmesi için test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, öncü bileşik yapısındaki 1-feniletıl grubunun 4-asetilfenil (GS10) ve 4-karbamoilfenil (GS11) ile değiştirilmesiyle ulaşılan bileşiklerin çok kuvvetli olmasa da öncü bileşiğe kıyasla selektif SIRT1 inhibisyon (%36-46) etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Merkezi fenil halkasındaki sübstitusyonların para pozisyonunda olduğu GS10 kodlu bileşiğin meta analogu (GS05), test edilen hiçbir SIRT izoformu için etkili bulunmamıştır. Yapısında 1-naftil ve pirimidin (GS07, GS13) içeren bileşiklerin, test edilen tüm SIRT izoformlarına karşı etkisiz olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, GS07 kodlu bileşiğin 2-naftil analogu (GS08), zayıf da olsa SIRT1 ve SIRT2 inhibisyonu göstermiştir. Yapıya 1,2,3,4-tetrahidroizokinolin ve 4-izopropilpiperazinin eklenmesi ve böylece öncü bileşikteki sekonder amit grubunun tersiyer ve siklik amit yapısına dönüştürülmesiyle elde edilen bileşiklerden GS01 ve GS02 öncü bileşiğe kıyasla artmış selektif SIRT1 inhibisyonu (sırasıyla %56 ve %48) göstermiştir. Bu bileşiklerin pirimidin taşıyan GS06 ve GS12 analogları ise SIRT enzimlerine karşı etkisiz bulunmuştur. Bununla birlikte 4-fenilpiperazin grubu taşıyan bileşikler için de (GS03, GS04) test edilen hiçbir SIRT izoformuna karşı etki gözlenmemiştir. GS01 kodlu bileşikten türevlendirilen GS14 kodlu bileşik, test edilen bileşikler içerisinde en aktif bulunan bileşik olup, öncü bileşik için gözlenen inhibisyon gücü önemli derecede artmıştır. Moleküler modelleme sonuçları doğrultusunda GS01 yapısındaki amit grubunun N-hidroksiimidamit yapısına çevrilmesi, beklenildiği gibi SIRT1 inhibisyonu korurken SIRT2 inhibisyon gücünün artmasına neden olmuştur.

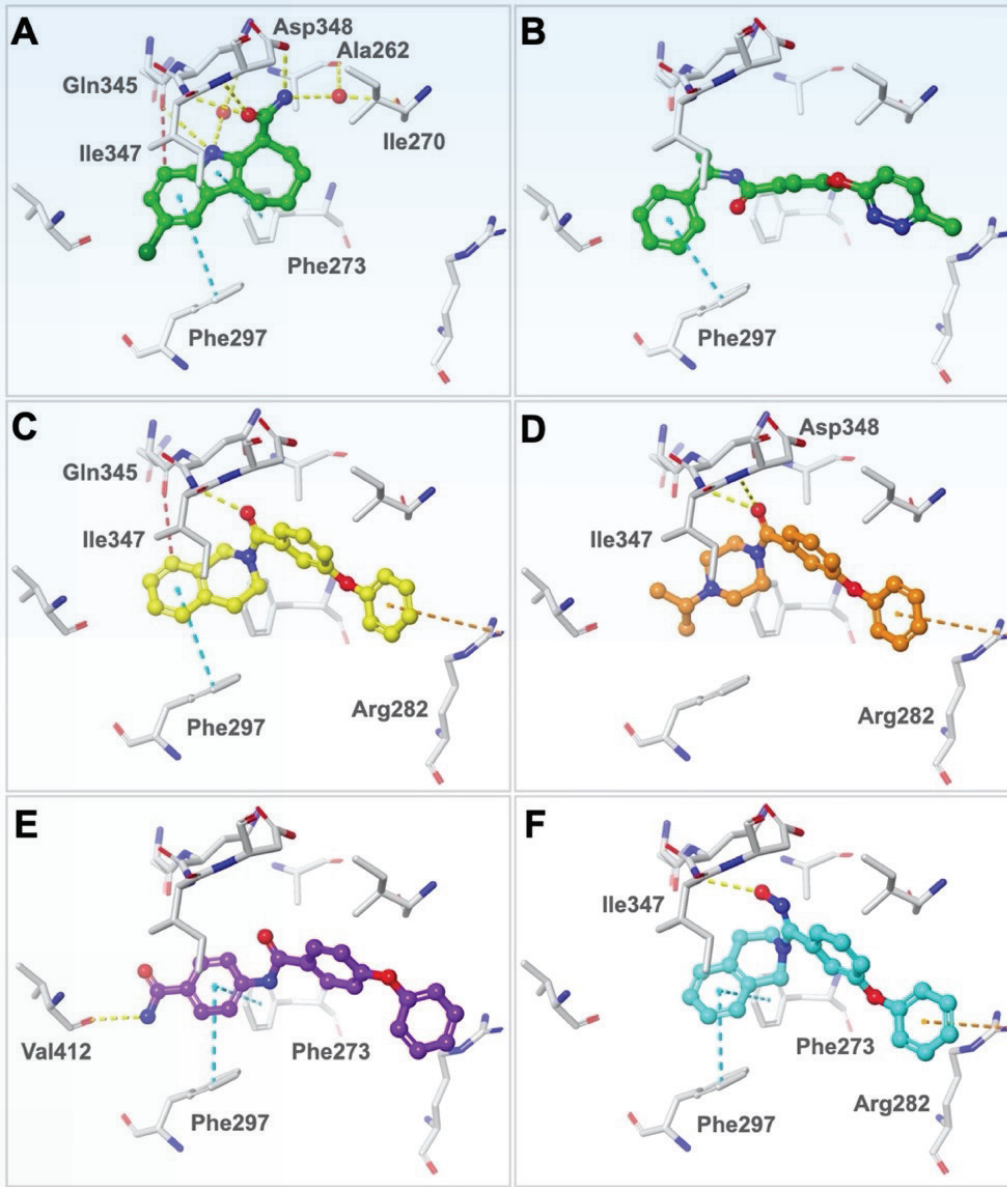
SIRT1/2 enzim aktivitesi üzerine etkili olarak bulunan bileşiklerin in vitro sitotoksik etkileri MCF-7 hücre hattı kullanılarak 48 ve 72 saat olmak üzere iki farklı zaman dilimi için belirlenmiş, bileşiklerin % hücre canlılığına olan etkileri Şekil 2’de sunulmuştur.



Şekil 2 Değişik konsantrasyonlardaki bileşiklerle muamele edilen MCF-7 hücre hattında tespit edilen % hücre canlılığı değerleri. *p<0.05, #p<0.0001.

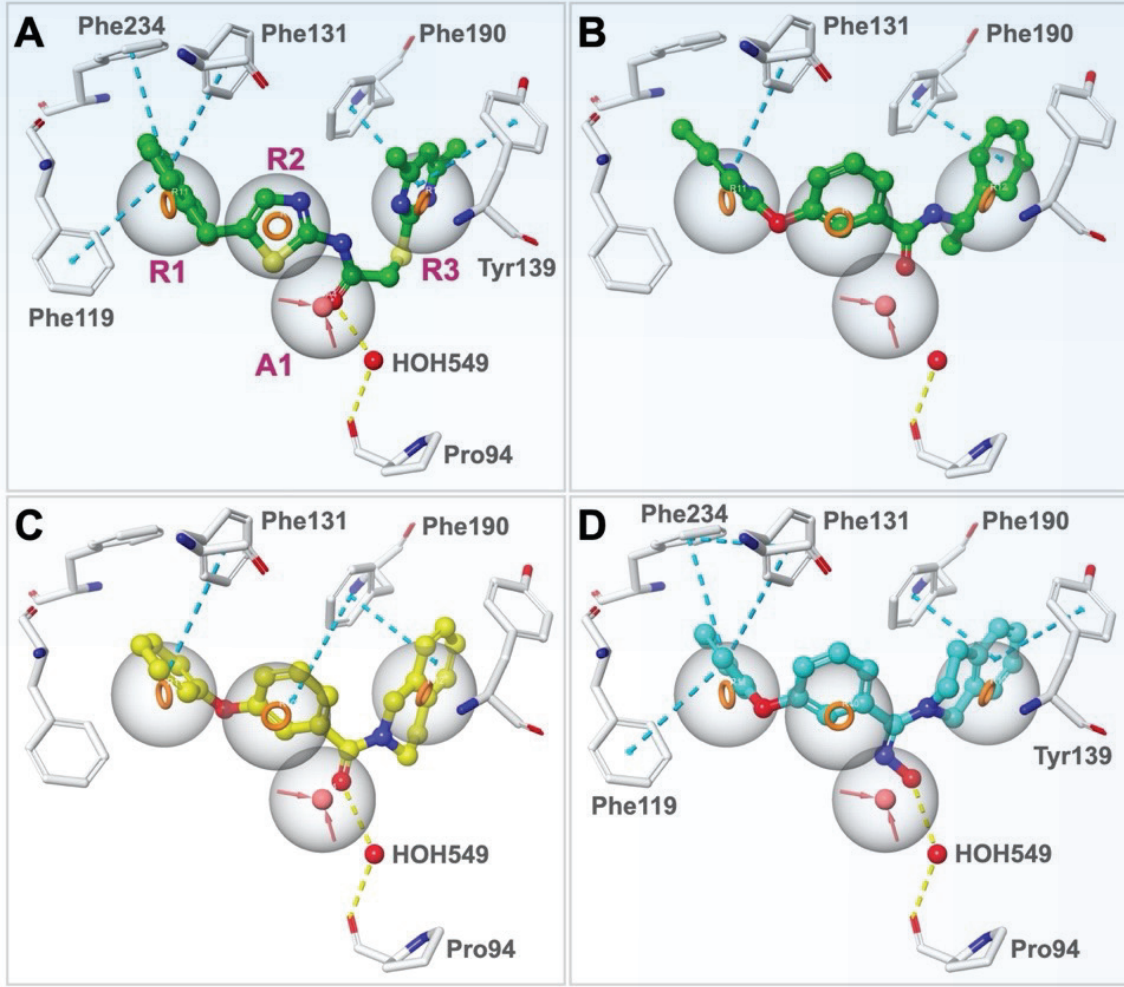
SIRT1 enziminin yüksek ekspresyonu ile meme kanseri hücrelerinin artmış yayılımı ve metastazı arasında önemli bir bağlantının olduğu bilinmekte [11, 12], bunun yanında selektif SIRT2 inhibitörlerinin meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini gösteren çalışmalar [13-15] bulunmaktadır. Bu nedenle, SIRT1/2 inhibisyonu gösterdiği tespit edilen **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkileri belirlenen zaman aralıklarında doza bağımlı bir şekilde test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, **GS14** kodlu bileşik, MCF-7 hücrelerinin canlılığını 48 saat ($IC_{50}=41,05 \mu M$) ve 72 saat ($IC_{50}=33,12 \mu M$) sonra, Bileşik A'ya (IC_{50} değerleri 48 saat için $327,76 \mu M$; 72 saat için $>1 mM$) kıyasla konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaltmış, SIRT1/2 enzim aktivitesini etkili bir şekilde inhibe ettiği konsantrasyonlarda hücre canlılığını da inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı durum, **GS14** kadar güçlü olmasa da öncü bileşiğe göre daha iyi bir inhibisyon profili (IC_{50} değerleri 48 saat için $159,32 \mu M$; 72 saat için $14,54 \mu M$) sergileyen **GS01** için de gözlenmiştir. **GS01** ve **GS14** kodlu bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki inhibisyon oranları karşılaştırıldığında, iki bileşiğin de benzer SIRT1 inhibisyon değerine sahip olduğu için SIRT2 inhibisyonunun varlığının sitotoksik etkiyi arttırdığı yönünde yorum yapılabilir. Orta düzeyde selektif SIRT1 inhibisyonu gösteren **GS02** ve **GS11** kodlu bileşik için, 48 saat sonrasında öncü bileşiğinkine benzer bir sitotoksik etki (IC_{50} değerleri **GS02** için $464,94 \mu M$; **GS11** için $523,84 \mu M$) gözlenirken, 72 saat sonrasında sitotoksik etkileri Bileşik A'ya oranla biraz daha artmıştır (IC_{50} değerleri **GS02** için $320,98 \mu M$; **GS11** için $356,18 \mu M$). Sonuç olarak, elde edilen sitotoksik etki düzeyleri ile SIRT1/2 inhibisyon değerleri uyumlu bulunmuştur.

SIRT1 enzim aktivitesini %46,04-56,53 arasında değişen yüzdelerde inhibisyon yaptığı tespit edilen **GS01**, **GS02**, **GS11** ve **GS14** kodlu bileşikler için, SIRT1 aktif bölgesinde Bileşik A ile benzer bağlantı modları elde edilmiştir (Şekil 3). Bileşik A yapısında bulunan ve hiçbir etkileşme meydana getirilmeden SIRT1 aktif bölgesinin giriş kısmına yönelen metilpiridazin grubu, fenil grubu ile değiştirildiğinde Arg282 ile π -katyon etkileşimi yakalanmıştır. Bileşik **GS01** ve **GS02**'nin karbonil oksijeni, EX-527 analogundaki karboksamit yapısıyla benzerlik göstererek Ile347 ve Asp348 amino asitleriyle H bağı üzerinden etkileşime girmiştir. Aynı durum Bileşik **GS14** için N-hidroksil imidamit yapısında gözlenmiştir. Bileşik **GS11** için, amit yapısına komşu fenil halkasındaki karboksamit sübstitüsyonu ile Phe273 ve Phe297 amino asitleriyle meydana gelen π - π etkileşimlerine ek olarak Val412 ile H bağı oluşumu sağlanmış, böylece SIRT1 aktif bölgesinin hidrofobik cebine diğer bileşiklere nazaran daha sıkı bağlandığı gözlenmiştir. Moleküler docking çalışmaları yapılan bileşiklerin, koligand EX-527 analogunun indol azotu ve karboksamit grubu ile sağladığı H bağı ağını meydana getirememesi, SIRT1 aktivitesini orta düzeyde inhibe etmelerinin göstergesi olarak düşünülmüştür.



Şekil 3 SIRT1 aktif bölgesi (PDB: 415). (A) EX-527 analogunun x-ray kristal yapısındaki bağlantı modu. (B) Bileşik A için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -6,789 kcal/mol). (C) Bileşik GS01 için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -10,018 kcal/mol). (D) Bileşik GS02 için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -7,280 kcal/mol). (E) Bileşik GS11 için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -7,785 kcal/mol). (F) Bileşik GS14 için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -8.650 kcal/mol). H bağları, aromatik H bağları, π -katyon ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı, kırmızı, turuncu ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir.

SIRT2 x-ray yapısında koligant olarak yer alan SirReal analogu, aktif bölgenin substrat kanalında fenil halkası ile Phe119, Phe131 ve Phe234 amino asitleri arasında π - π etkileşimleri, selektivite cebinde 4,6-dimetilpirimidin halkası ile Tyr139 ve Phe190 amino asitleri arasında π - π etkileşimleri, karbonil oksijeni ile Pro94 amino asidi arasında yapısal su HOH549 köprülü H bağı meydana getirmektedir. Bileşik GS14 için belirlenen bağlantı modu incelendiğinde, koligant yapısındaki 4,6-dimetilpirimidin halkasının yerine geçen izokinolin kalıntısının selektivite cebine yönlendiği ve bu bölgede beklenen π - π etkileşimleri gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Bileşik GS01 yapısında da izokinolin halkası olmasına rağmen selektivite cebinde Tyr139 ile etkileşim göstermemiş, bu durum karbonil oksijeni ile Pro94 amino asidi arasında HOH549 köprülü H bağı oluşması için bileşiğin diğer bileşiklere göre daha bükülmüş bir konformasyon almasıyla açıklanabilmektedir. Bileşik GS01'deki karbonil oksijeninin, Bileşik GS14'te N-hidroksil grubu ile değiştirilmesiyle bileşiğin daha rahat bir konformasyonla Pro94 amino asidi ile H bağına oluşturmasına olanak verilmiş, izokinolin halkasının selektivite cebinde Try139 amino asidine doğru yönelerek π - π etkileşimine girmesi sağlanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4 SIRT2 aktif bölgesi (PDB: 5DY4). (A) SirReal analogunun x-ray kristal yapısındaki bağlantı modu. (B) Bileşik A için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -9,032 kcal/mol). (C) Bileşik GS01 için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -9,787 kcal/mol). (D) Bileşik GS14 için belirlenen bağlantı modu (XP Glidescore: -11,877 kcal/mol). H bağları, aromatik H bağları, π -katyon ve π - π etkileşimleri sırasıyla sarı, kırmızı, turuncu ve turkuaz renkte kesikli çizgilerle gösterilmiştir. Selektif SIRT2 inhibitörleri için geliştirilen dört üyeli farmakofor model. R1, R2, R3: aromatik halka, A1: H bağı akseptör.

SONUÇLAR

Tez kapsamında, öncü bileşiğe göre SIRT enzimlerine daha iyi bağlanan ve dolayısıyla bu enzimlere karşı daha güçlü inhibisyon etkisi gösteren bileşiklere ulaşmak amacıyla moleküler modelleme tekniklerinin de yardımıyla öncü bileşik üzerinde kimyasal modifikasyonlar yapılarak bir “öncü bileşik optimizasyonu” çalışması yürütülmüştür. Belirlenen kimyasal modifikasyonlar sonucu bir seri ariloksibenzamit türevi bileşik sentezlenmiş, yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır. SIRT1-3 enzimlerine karşı 100 μ M konsantrasyonda etkinlikleri test edilen bileşikler arasında GS01 (%56,53), GS02 (%48,15) ve GS11 (%46,04) selektif SIRT1 inhibitörü olarak bulunmuştur. Çalışmaların başlangıç noktasını oluşturan öncü bileşiğin 300 μ M konsantrasyonda SIRT1 enzimini %31,45 oranında inhibe ettiği düşünüldüğünde, yürütülen öncü bileşik optimizasyonunun başarılı olduğu görülmüştür. Ayrıca, SIRT2 inhibisyon gücünün artırılmasına yönelik kimyasal modifikasyonlar da başarılı bulunmuş, GS01 kodlu bileşikten bu amaçla türetilen GS14 kodlu bileşiğin SIRT2 inhibisyonunu %10,80 oranından %51,61 oranına çıkardığı görülmüştür. Gerçekleştirilen kimyasal modifikasyonların SIRT1/2 enzim inhibisyonu üzerine etkilerinin sitotoksik etki üzerine yansımaları görebilmek amacıyla GS01, GS02, GS11 ve GS14 kodlu bileşiklerin MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, bu bileşikler için gözlenen SIRT inhibisyon değerleri ile sitotoksik etkileri arasında korelasyon bulunmuş, SIRT1 ve SIRT2 inhibisyonundaki artışın, hücre canlılığına karşı etkiden sorumlu olabileceği sonucu çıkarılmıştır. Sonuç olarak, antikanser ilaç geliştirilmesinde ümit vaat eden bir hedef olarak görülen ve gün geçtikçe ilgi odağı haline gelen SIRT enzimlerine karşı inhibitör etkili yeni bileşikler keşfetmek amacıyla yapılan bu çalışmaya ait sonuçlar, yeni güçlü ve selektif SIRT inhibitörlerinin tasarlanması ve geliştirilmesi için katkı sağlamaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Yang LL, Wang HL, Zhong L, Yuan C, Liu SY, Yu ZJ, Liu S, Yan YH, Wu C, Wang Y, Wang Z, Yu Y, Chen Q, Li GB. X-Ray crystal structure guided discovery of new selective, substrate-mimicking sirtuin 2 inhibitors that exhibit activities against non-small cell lung cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018;155:806-823.
- [2] Eren G, Bruno A, Guntekin-Ergun S, Cetin-Atalay R, Ozgencil F, Ozkan Y, Gozelle M, Kaya SG, Costantino G. Pharmacophore modeling and virtual screening studies to identify novel selective SIRT2 inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2019;89:60-73.
- [3] Ma D ve Cai Q. N,N-Dimethyl glycine-promoted ullmann coupling reaction of phenols and aryl halides. *Organic Letters*. 2003;5(21):3799-3802.
- [4] Zhang Y, Ni G, Li C, Xu S, Zhang Z, Xie X. The coupling reactions of aryl halides and phenols catalyzed by palladium and MOP-type ligands. *Tetrahedron*. 2015;71(30):4927-4932.
- [5] Liu KC, Shelton BR, Howe RK. A particularly convenient preparation of benzohydroximinoyl chlorides (nitrile oxide precursors). *Journal of Organic Chemistry*. 1980;45:3916-3918.
- [6] Yagci S, Gozelle M, Kaya SG, Ozkan Y, Aksel AB, Bakar-Ates F, Dundar Y., Eren G. Hit-to-lead optimization on aryloxybenzamide derivative virtual screening hit against SIRT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2021;30:115961.
- [7] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*.1983;65(1-2):55-63.
- [8] Kuźma Ł, Wysokińska H, Różalski M, Krajewska U, Kisiel W. An unusual taxodione derivative from hairy roots of *Salvia Austriaca*. *Fitoterapia*. 2012;83(4):770-773.
- [9] Zhao X, Allison D, Condon B, Zhang F, Gheyi T, Zhang A, Ashok S, Russell M, MacEwan I, Qian Y, Jamison JA, Luz JG. The 2.5 Å crystal structure of the SIRT1 catalytic domain bound to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) and an indole (EX527 Analogue) reveals a novel mechanism of histone deacetylase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;56(3):963-969.
- [10] Schiedel M, Rumpf T, Karaman B, Lehotzky A, Oláh J, Gerhardt S, Ovádi J, Sippl W, Einsle O, Jung M. Aminothiazoles as potent and selective Sirt2 inhibitors: A structure activity relationship study. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;59(4):1599-1612.
- [11] Sinha S, Sharma S, Vora J, Shrivastava N. Emerging role of sirtuins in breast cancer metastasis and multidrug resistance: Implication for novel therapeutic strategies targeting sirtuins. *Pharmacological Research*. 2020;158:104880.
- [12] Jin X, Wei Y, Xu F, Zhao M, Dai K, Shen R, Yang S, Zhang N. SIRT1 promotes formation of breast cancer through modulating Akt activity. *Journal of Cancer*. 2018;9(11):2012-2023.
- [13] Jing H, Hu J, He B, Negrón-Abril YL, Stupinski J, Weiser K, Carbonaro M, Chiang YL, Southard T, Giannakakou P, Weiss RS, Lin H. A SIRT2-selective inhibitor promotes c-Myc oncoprotein degradation and exhibits broad anticancer activity. *Cancer Cell*. 2016;29(3):297-310.
- [14] Zhang L, Kim S, Ren X. The clinical significance of SIRT2 in malignancies: A tumor suppressor or an oncogene. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:1721.
- [15] Shah AA, Ito A, Nakata A, Yoshida M. Identification of a selective SIRT2 inhibitor and its anti-breast cancer activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2016;39(10):1739-1742.

TEŞEKKÜR

Bioorganic & Medicinal Chemistry (2021, 30, 115961) dergisinde yayınlanan bu tez çalışması, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK Proje No: 118S673) tarafından desteklenmiştir.

YAZAR İNDEKSLERİ

A

Ahmet Çağrı KARABURUN, 256
Arif BOZDEVECİ, 76
Arzu BEŞİKÇİ, 61
Asaf Evrim EVREN, 137, 139, 252, 256
Aslı ŞAHİNER, 225
Aylin ŞENDEMİR, 102
Aysun PABUÇÇUOĞLU, 17
Ayşe Burçin UYUMLU, 45

B

Barkın BERK, 49
Basri SATILMIŞ, 45
Başak TÜRK ERBUL, 143, 258, 273
Bedia KAYMAKÇIOĞLU, 107
Begüm Nurpelin SAĞLIK, 45, 256
Berna GÜVEN, 61
Betül AYDIN, 70, 179
Beyzanur TUTUŞ, 128
Burcu ÇALIŞKAN, 14, 39, 57
Burcu KARAYAVUZ, 160
Burcu KILIÇ, 66, 131

C

Cemil Caner ARIKAN, 221
Cemre ACAR, 61

D

Demokrat NUHA, 252
Deniz LENGERLİ, 14
Deniz S. DOĞRUER, 66, 81, 131
Dharmarajan SRIRAM, 76
Didem KART, 160
Duygu ALTIPARMAK, 28

E

Ece AKHAN GÜZELCAN, 39
Ece BAYIR 102
Ecem Fatma KARAMAN, 143
Elif Göksu ALGIN, 258
Emine Merve ERTUĞRUL, 170
Emine ŞALVA, 107
Emir GÜZEL, 139
Emre CANBOLAT, 162
Emre Kadir AYAN, 93
Erden BANOĞLU, 14, 39, 57, 193
Ersin GÜNER, 42
Esmâ ÖZCAN, 196
Esra NALBAT, 39, 57
Ezgi Nurdan YENİLMEZ TUNOĞLU, 239

F

Fadime AYDIN KÖSE, 17
Fatıma DOĞANÇ, 21
Fatih TOK, 107
Fatma AKSAKAL, 131
Fikriye ÖZGENCİL, 119
Filiz BAKAR, 157
Filiz BAKAR-ATEŞ, 279
Füsün GÖKTAŞ, 143

G

Gamze ÇİFTÇİ, 233
Gizem BAYAZIT, 139
Gökçen EREN, 21, 119, 279
Göknıl Pelin COŞKUN, 258, 273
Gözde ULTAV, 107
Gözde Yenice ÇAKMAK, 209
Güliz ARMAĞAN, 102
Gülşah BAYRAKTAR, 102
Gülşah KARAKAYA, 8
Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ, 252

H

Hakan GÖKER , 21, 61
Halide Edip TEMEL, 252
Hande SİPAHİ, 49
Harun USLU, 45

I

Işıl GÜLTEKİN, 157

İ

İlkay KÜÇÜKGÜZEL, 76, 221, 233
İrem DURMAZ ŞAHİN, 28
İsmail ÇELİK, 21, 61

J

Jülide Cansu KARAKOÇ, 258, 273

K

Kadir BATÇIOĞLU, 45
Kadriye BENKLİ, 45
Kemal YELEKÇİ, 233
Kenneth A. JACOBSON, 49
Kübra İBİŞ, 57

L

Leyla AÇIK, 170, 179
Leyla YURTTAŞ, 49, 128, 137, 252

M

M. Alper ERDOĞAN, 102
Mahmut GÖZELLE, 279
Marcel KAISER, 21
Mecit Orhan ULUDAĞ, 193
Mehmet Murat KIŞLA, 148
Melike YAVUZ, 199
Melis ÇETİN, 273
Meral TUNÇBİLEK, 28, 239
Mert ÜLGEN, 258, 273

Merve BARDAKKAYA, 81
Merve GÜRBOĞA, 233
Merve SAYLAM, 17
Metin Fikret GENÇ, 45
Muhammed İhsan HAN, 196
Muhittin AYGÜN, 17
Murat YAMAN, 148
Mustafa ERGÜL, 239
Mutlu AYTEMİR, 8

N

Nebahat Aytuna ÇERÇİ, 170, 179
Necla KULABAŞ, 76, 233
Nur Banu BAL, 193

O

Oya BOZDAĞ-DÜNDAR, 157
Oya Unsal TAN, 160

Ö

Ömer ERDOĞAN, 229
Özge AKBULUT, 14
Özge ÇEVİK, 229
Özge ERYİĞİT, 179
Özge KUYRUKÇU, 154
Özgür ÖZKAN, 42
Özgür ŞAHİN, 14
Özgür YILMAZ, 113
Özlem AKGÜL, 225
Özlem BİNGÖL ÖZAKPINAR, 233
Özlen KONU, 148

P

Pınar KUL, 239
Pınar POYRAZ YILMAZ, 76

R

Rahşan ILIKÇI SAĞKAN, 131, 162
Rengül ÇETİN ATALAY, 28, 39,57
Reto BRUN, 21

S

Sedanur EKREK, 229
Selma CRNIŠANIN, 233
Semih YAĞCI, 279
Semra UTKU, 162, 170, 179
Serap YILMAZ, 209
Serkan LEVENT, 45
Sevde Nur BİLTEKİN, 49
Sevil ŞENKARDEŞ, 229
Shakila SHAKILA, 131
Shoruq Ahmed NAJI, 256
Sibel ÖZDEN, 143
Suat KAMIŞLI, 45
Sülünay PARLAR COŞKUN, 102
Sümeyye TURANLI, 39
Sümeyye YURT, 204
Süreyya ÖLGEN, 42

Ş

Şengül ALPAY KARAOĞLU, 76
Şengül Dilem DOĞAN, 196
Şeref DEMİRAYAK, 49
Şirin UYSAL, 199, 204

T

Tuncagül ALTUNTAŞ, 61

U

Ufuk İNCE, 196
Ulviye ACAR ÇEVİK, 139

Ü

Ülküye Dudu GÜL, 139

V

Vagolu Siva KRISHNA, 76, 160
Varol PABUÇÇUOĞLU, 17
Vildan ALPTÜZÜN, 102

Y

Yağmur ÖZHAN, 49
Yasemin DÜNDAR, 154
Yeşim ÖZKAN, 119, 279
Yusuf KAPTANOĞLU, 193
Yusuf ÖZKAY, 45, 139
Yusuf TUTAR, 239

Z

Zafer Asım KAPLANCIKLI, 139
Zafer ŞAHİN, 49
Zefine UĞRAŞ, 107
Zehra Tuğçe GÜR MAZ, 193
Zennure Şevval ÇİYANCI, 252
Zeynep ATEŞ ALAGÖZ, 148
Zeynep SOYER, 93, 199, 204
Zhan-Guo GAO, 49

KATILIMCI LİSTESİ

KONGRE KATILIMCI LİSTESİ

Adı	Soyadı	E-posta	Çalıştığı Kurum
Cemre	ACAR HALICI	acarc@ankara.edu.tr	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
Özlem	AKGÜL	Ozlem.akgul@ege.edu.tr	Ege Üniversitesi
Hülya	AKGÜN	hakgun@yeditepe.edu.tr	Yeditepe Üniversitesi
Ahmet Buğra	AKSEL	abaksel@ktu.edu.tr	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Zeynep	ALAGÖZ	zates@pharmacy.ankara.edu.tr	Ankara Üniversitesi
Yasmin	ALJENDY	yasmin.j.95@hotmail.com	
Duygu	ALTIPARMAK	duygusac@gmail.com	Ankara Üniversitesi
Cemil Caner	ARIKAN	canerarikan@marun.edu.tr	Atabay Kimya
Emre Kadir	AYAN	eka293@gmail.com,	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Mutlu	AYTEMİR	mutlud@hacettepe.edu.tr	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Ayla	BALKAN	abalkan@ciu.edu.tr	Uluslararası Kıbrıs Üniv.
Erden	BANOĞLU	ebanoglu@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Merve	BARDAKKAYA	merve1392@gmail.com	Biruni Üniversitesi
Gülşah	BAYRAKTAR	bayraktargulsah@gmail.com	Ege Üniversitesi
Sultan	BAYTAŞ	sbaytas@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Kadriye	BENKLİ	badakbas@gmail.com	
Oya	BOZDAĞ DÜNDAR	oyabozdagdundar@gmail.com	Ankara Üniversitesi
Ebru Didem	COŞAR	ed.cosar@gmail.com	İstanbul Üniversitesi
Göknil Pelin	COŞKUN	goknilpelincoskun@gmail.com	Acıbadem Üniversitesi
Selma	CRNIŞANIN	selma.crnisanin94@gmail.com	
Burcu	ÇALIŞKAN	ebanoglu@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Enis	DEMİR	Enis.Demir@ashland.com	Ashland Özel Kimy. Ltd. Şti.
Şeref	DEMİRAYAK	sdemirayak@mwdipol.edu.tr	Medipol Üniversitesi

İnci Selin	DOĞAN	selinci@gmail.com	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fatıma	DOĞANÇ	doganc@ankara.edu.tr	Ankara Üniversitesi
Deniz Songül	DOĞRUEK	dsdogruer@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Beyza	DÜZLEYEN	beyza.duzleyen@ikc.edu.tr	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Nurdan	EBRU IRMAK	neirmak@ankara.edu.tr	Ankara Üniversitesi
Sedanur	EKREK	sedaekrek@gmail.com	Marmara Üniversitesi
Ayşenur	ER	aysenurer7@gmail.com	Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Gökçen	EREN	gokcene@gazi.edu.tr	Gazi Üniversitesi
Asaf Evrim	EVREN	asafevrimevren@anadolu.edu.tr	Bilecik Üniversitesi
Fusun	GÖKTAŞ	fusung@istanbul.edu.tr	İstanbul Üniversitesi
Mahmut	GÖZELLE	mgozelle@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Işıl	GÜLTEKİN	isl.yuce@hotmail.com	Ankara Üniversitesi
Ersin	GÜNER	eczersinguner@gmail.com	Konya Numune Hastanesi
Habibe Beyza	GÜNİNDİ	beyzagunindi@hotmail.com	Gazi Üniversitesi
Emir	GÜZEL	emirguzel33@gmail.com	
M. İhsan	HAN	hanihsan@gmail.com	Erciyes Üniversitesi
Kübra	İBİŞ	kub.ibis1992@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Hüseyin	İSTANBULLU	istanbulluh@gmail.com	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Yusuf	KAPTANOĞLU	yusuf.kptngl@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Çiğdem	KARAASLAN KIRMIZIOĞLU	cigdemka@gmail.com	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülşah	KARAKAYA	gulsah.karakaya@ikcu.edu.tr	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Sevgi	KARAKUŞ	skaracus@marmara.edu.tr	Marmara Üniversitesi
Mehmet	KARATAŞ	karatasmhmt2@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Burcu	KARAYAVUZ	karayavuzburcu@gmail.com	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Selen Gözde	KAYA	selenkaya@gazi.edu.tr	Gazi Üniversitesi
Bedia	KAYMAKÇIOĞLU	bkaymakcioglu@marmara.edu.tr	Marmara Üniversitesi
Burcu	KILIÇ	burcukahya@gazi.edu.tr	Gazi Üniversitesi
Mehmet Murat	KIŞLA	mmkisla@ankara.edu.tr	Ankara Üniversitesi
Selin	KORKMAZ	selinnorkmazz97@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Meriç	KÖKSAL AKKOÇ	merickosal@yeditepe.edu.tr	Yeditepe Üniversitesi

Pınar	KUL	pkul@ankara.edu.tr	Ankara Üniversitesi
Necla	KULABAŞ	necla.kulabas@marmara.edu.tr	Marmara Üniversitesi
Özge	KUYRUKÇU	ozgekuyrukcu@gazi.edu.tr	Gazi Üniversitesi
Ş. Güniz	KÜÇÜKGÜZEL	guniz.kucukguzel@fbu.edu.tr	Fenerbahçe Üniversitesi
İlkay	KÜÇÜKGÜZEL	ikucukguzel@marmara.edu.tr	Marmara Üniversitesi
Deniz	LENGERLİ	deniz.lengerli@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Shoruq A O	NAJI	Shoruqnagi1996@gmail.com	Anadolu Üniversitesi
Demokrat	NUHA	demokratnuha@gmail.com	Eskişehir Teknik Üniversitesi
Azime Berna	ÖZÇELİK	azime@gazi.edu.tr	Gazi Üniversitesi
Fikriye	ÖZGENCİL	fikriyeozgencil@gazi.edu.tr	Gazi Üniversitesi
M. Varol	PABUÇÇUOĞLU	varol.pabuccuoglu@ege.edu.tr	Ege Üniversitesi
Pınar	POYRAZ YILMAZ	pinarpoyraz@hotmail.com	Viatrix İlaç
Merve	SAYLAM	merve.saylam@ikc.edu.tr	İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi
Shakıla	SHAKILA	shaks977@gmail.com	Gazi Üniversitesi
Zafer	ŞAHİN	Zafer.sahin@sbu.edu.tr	Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Sevil	ŞENKARDEŞ	sevil.aydin@marmara.edu.tr	Marmara Üniversitesi
İrem	TATAR	iremtatar91@gmail.com	Ege Üniversitesi
Pervin Betül	TEKİNER GÜLBAŞ	btekiner@gmail.com	Ankara Üniversitesi
Fatih	TOK	fatih.tok@marmara.edu.tr	Marmara Üniversitesi
Meral	TUNÇBİLEK	tuncbile@gmail.com	Ankara Üniversitesi
Sümeyye	TURANLI	sumeyyeturanli@gmail.com	Adıyaman Üniversitesi
Beyzanur	TUTUŞ	beyzanurt4480@gmail.com	Anadolu Üniversitesi
Sevda	TÜRK	sevdaturk61@gmail.com	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Başak	TÜRK ERBUL	basak.turk@acibadem.edu.tr	Acibadem Üniversitesi
Zefine	UĞRAŞ	zefineugras@outlook.com	Marmara Üniversitesi
Harun	USLU	huslu@firat.edu.tr	Fırat Üniversitesi
Semra	UTKU	utkusemra@mersin.edu.tr	Mersin Üniversitesi
Şirin	UYSAL	sirin.uyosal@ege.edu.tr	Ege Üniversitesi
Semih	YAĞCI	smhygc55@gmail.com	Samsun Bafra Devlet Hastanesi

Tansu	YALÇIN	tnsyalcin@gmail.com	Çukurova Üniversitesi
Gözde	YENİCE ÇAKMAK	gozdeyenice@trakya.edu.tr	Trakya Üniversitesi
Nisa Nur	YILDIRIM	ecz.nisa@icloud.com	Gazi Üniversitesi
Özgür	YILMAZ	yilmaz.ozgur@tubitak.gov.tr	TÜBİTAK - MAM
Hilal	ZIVALI	hilalzivali@ktu.edu.tr	Karadeniz Teknik Üniversitesi
Nejat	ARÇELİK	narcelik@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Mehmet Reşit	AYHAN	rayhan@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Bilge	BEBEK	bbebek@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Özgür	KAYA	okaya@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Elif	KESKİN	elkeskin@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Ömer Adil	KORKMAZ	okorkmaz@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Cansu	KÜÇÜKPOLAT	cansukp33@gmail.com	Deva Holding A.Ş.
Melike Ceren	MİSER	mmiser@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Burcu	OKTAR	burcuoktar@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Okşan	SOYER CAN	ocan@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Alper	ŞANLI	alpersanlii@gmail.com	Deva Holding A.Ş.
Merve	UĞUR	mugur@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Ali Osman	YILMAZ	aliyilmaz@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.
Tuğba	YORULMAZ	tyorulmaz@deva.com.tr	Deva Holding A.Ş.