

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI İNDOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ,  
YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİ  
ÜZERİNDEKİ ÇALIŞMALAR**

Ecz. Selin ZİREK VEKİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Öztekin ALGÜL

MERSİN-2010

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FARMASÖTİK KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI İNDOL TÜREVİ BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ,  
YAPILARININ AYDINLATILMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİ  
ÜZERİNDEKİ ÇALIŞMALAR**

Ecz. Selin ZİREK VEKİL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Öztekin ALGÜL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE FK(SZ) 2008-8 YL numaralı proje ile desteklenmektedir.

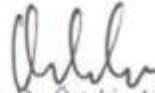
Tez No:.....

MERSİN-2010

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Bazı İndol Türevi Bileşiklerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Biyolojik Etkileri Üzerindeki Çalışmalar" başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

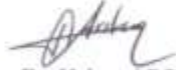
Tez Savunma Tarihi 25/02/2010



Doç. Dr. Öztekin ALGÜL

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı



Doç. Dr. Hakan ARSLAN

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

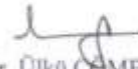


Yrd. Doç. Dr. Semra UTKU

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ülkü ÇEMELEKOĞLU



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında ve çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, sorunlarımla yakından ilgilenen, her zaman, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen, tez hazırlama aşamamda moralimi yüksek tutmaya çalışan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Öztekin ALGÜL'e tüm içtenliğimle teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında her zaman, her konuda yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Semra UTKU'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Aktivite çalışmalarının yapılmasında yardımcı olan Heinrich-Heine Üniversitesi Farmasötik ve Medisinal Kimya Enstitüsünden (Düsseldorf / Almanya) Prof. Dr. Joachim Jose ve Doktora Öğrencisi Andre Kaessler'e,

Büyük fedakârlıklar göstererek bugünlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen canım anneme, canım babama ve canım kardeşim ile tez yazım aşamamda yanımda olan biricik eşime içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin araştırma projesi olarak desteklenmesini sağlayan Mersin Üniversitesi Araştırma Fonu'na da (BAP-SBE FK(SZ) 2008-8YL) teşekkür ederim.

Ecz. Selin ZİREK VEKİL

# İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b>	ii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iv
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	viii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	x
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xi
<b>ÖZET</b>	xii
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	4
2.1. İndol Halkasının Genel Özellikleri	4
2.2. İndollerin Sentez Yöntemleri ve Reaksiyon Mekanizmaları	6
2.2.1. Sigmatropik Rearanjman Reaksiyonları	7
2.2.1.1 Fischer İndol Sentezi	7
2.2.1.2 Gassman İndol Sentezi	8
2.2.1.3 Bartoli İndol Sentezi	10
2.2.1.4 Thyagarajan İndol Sentezi	13
2.2.1.5 Julia İndol Sentezi	15
2.2.2 Nükleofilik Siklizasyon Reaksiyonları	15
2.2.2.1 Madelung İndol Sentezi	15
2.2.2.2 Wender İndol Sentezi	17
2.2.2.3 Smith İndol Sentezi	18
2.2.2.4 Kihara İndol Sentezi	18
2.2.2.5 Nenitzescu İndol Sentezi	19
2.2.2.6 Engler İndol Sentezi	20
2.2.2.7 Saegusa İndol Sentezi	21
2.2.3 Elektrofilik Siklizasyon Reaksiyonları	21
2.2.3.1 Bischler İndol Sentezi	22

2.2.3.2 Nitren Siklizasyonu	23
2.2.3.2.1 Cadoan-Sundberg İndol Sentezi	23
2.2.3.2.2 Sundberg İndol Sentezi	24
2.2.3.2.3 Hemetsberger İndol Sentezi	25
2.2.3.3 Iwao İndol Sentezi	26
2.2.3.4 Magnus İndol Sentezi	27
2.2.3.5 Feldman İndol Sentezi	28
2.2.4 Redüktif Siklizasyon Reaksiyonları	28
2.2.4.1 O, $\beta$ - Dinitrostiren Redüktif Siklizasyonu	28
2.2.4.2 Reissert İndol Sentezi	29
2.2.4.3 Leimgruber-Batcho İndol Sentezi	30
2.2.4.4 Makosa İndol Sentezi	31
2.2.5 Oksidatif Siklizasyon Reaksiyonları	32
2.2.5.1 Watanebe İndol Sentezi	32
2.2.6 Radikal Siklizasyon Reaksiyonları	32
2.2.6.1 Kalaylı Ortamda Siklizasyon	32
2.2.6.2 Fukuyama İndol sentezi	33
2.2.6.3 Murphy İndol-İndolin Sentezi	34
2.2.7 Palladyumlu Ortamda Kimyasal Reaksiyonlar	34
2.2.7.1 Hegedus-Mori-Heck İndol Sentezi	34
2.2.7.2 Yamanaka-Sakamoto İndol Sentezi	35
2.2.7.3 Larock İndol Sentezi	36
2.2.8 Bakırlı Ortamda Kimyasal Reaksiyonlar	36
2.2.8.1 Castro İndol Sentezi	36
2.2.9 Japp-Klingemann İndol Sentezi	37
2.2.10 Baeyer-Emmerling İndol Sentezi	38
2.3. Hiyaluronik Asitin Özellikleri, Sentezi, Yıkımı	40
2.4. Hiyaluronik Asitin Medikal Kullanımları	43
2.5. Hiyaluronidaz Enzimi, Biyolojisi ve Tedavi Edici Özellikleri	46
2.6. Hiyaluronidaz Enziminin Kansere Gelişimi Üzerindeki Rolü	47

2.7. Doğal ve Sentetik Hiyaluronidaz Enzim İnhibitörü Bileşikler	48
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	54
3.1. Kimyasal Çalışmalar	54
3.1.1. Materyal	54
3.1.2. Yöntem	54
3.1.2.1. Di veya Tri Süstitüe İndol Türevlerinin Sentez Yöntemi	54
3.2. Analitik Çalışmalar	55
3.2.1. Erime Noktası Tayini	55
3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi ve Kolon Kromatografisi ile Yapılan Kontroller	55
3.2.2.1. Materyal	55
3.2.3. Spektroskopik Kontroller	56
3.2.3.1. IR Spektrumları	56
3.2.3.2. <sup>1</sup> H NMR Spektrumları	56
3.3. Biyolojik Çalışmalar	57
3.3.1. Metod	57
3.3.1.1. Morgan-Elson Testi	57
3.3.1.2. Stain-all Testi	58
<b>4. BULGULAR</b>	
4.1. Kimyasal Bulgular	59
4.1.1. 3-Metil-2-fenil-1 <i>H</i> -indol	59
4.1.2. 3,5-Dimetil-2-fenil-1 <i>H</i> -indol	60
4.1.3. 1,3-Dimetil-2-fenil-1 <i>H</i> -indol	61
4.1.4. 4-(3-Fenil-1 <i>H</i> -indol-2-il)fenol	62
4.1.5. 4-(5-Metil-3-fenil-1 <i>H</i> -indol-2-il)fenol	63
4.1.6. 2-(4-Klorofenil)-5-metil-3-fenil-1 <i>H</i> -indol	64
4.1.7. 2-(4-Bromofenil)-5-metil-3-fenil-1 <i>H</i> -indol	65
4.2. Biyolojik Bulgular	66

<b>5. TARTIŞMA</b>	67
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	70
<b>7. KAYNAKLAR</b>	72
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	82



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Reaksiyon Denklem 1 :	İndol halkasının genel özellikleri	5
Reaksiyon Denklem 2 :	İndol halkasının genel özellikleri	6
Reaksiyon Denklem 3 :	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	7
Reaksiyon Denklem 4 :	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	8
Reaksiyon Denklem 5 :	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	8
Reaksiyon Denklem 6 :	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	10
Reaksiyon Denklem 7 :	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	11
Reaksiyon Denklem 8:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	12
Reaksiyon Denklem 9:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	13
Reaksiyon Denklem 10:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	14
Reaksiyon Denklem 11:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	14
Reaksiyon Denklem 12:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	15
Reaksiyon Denklem 13:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	16
Reaksiyon Denklem 14:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	16
Reaksiyon Denklem 15:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	17
Reaksiyon Denklem 16:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	17
Reaksiyon Denklem 17:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	18
Reaksiyon Denklem 18:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	18
Reaksiyon Denklem 19:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	19
Reaksiyon Denklem 20:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	19
Reaksiyon Denklem 21:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	20
Reaksiyon Denklem 22:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	21
Reaksiyon Denklem 23:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	22
Reaksiyon Denklem 24:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	22
Reaksiyon Denklem 25:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	22

Reaksiyon Denklem 26:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	23
Reaksiyon Denklem 27:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	24
Reaksiyon Denklem 28:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	24
Reaksiyon Denklem 29:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	25
Reaksiyon Denklem 30:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	26
Reaksiyon Denklem 31:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	27
Reaksiyon Denklem 32:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	27
Reaksiyon Denklem 33:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	28
Reaksiyon Denklem 34:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	29
Reaksiyon Denklem 35:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	29
Reaksiyon Denklem 36:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	30
Reaksiyon Denklem 37:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	31
Reaksiyon Denklem 38:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	32
Reaksiyon Denklem 39:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	33
Reaksiyon Denklem 40:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	33
Reaksiyon Denklem 41:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	34
Reaksiyon Denklem 42:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	34
Reaksiyon Denklem 43:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	35
Reaksiyon Denklem 44:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	35
Reaksiyon Denklem 45:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	36
Reaksiyon Denklem 46:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	36
Reaksiyon Denklem 47:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	37
Reaksiyon Denklem 48:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	37
Reaksiyon Denklem 49:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	38
Reaksiyon Denklem 50:	İndol sentez yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları	39
Şekil 1: Bileşiklerin Sentez Şeması		68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Doğal ve sentetik hiyaluronidaz enzim inhibitörü bileşikler	49
Çizelge 2: Sentezlenen bileşiklerin hiyaluronidaz inhibitör etkileri	66
Çizelge 3: Sentezlenen bileşiklerin formülleri	67

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Glikozaminoglikan	(GAG)
Hyaluronik asit	(HA)
Dimetil sülfoksit	(DMSO)
Dötero dimetilsülfoksit	(DMSO-d <sub>6</sub> )
Dimetil formamit	(DMF)
<i>Transforming growth factor-β</i>	(TGF-β)
<i>Tumor necrosis factor</i>	(TNF)
<i>Bovin aortic endothelial cell</i>	(BAEC)
<i>cis</i> -Hinokiresinol	(CHR)
Bovine serum albumin	(BSA)
Bovine testis hyaluronidases	(BTH)
İnce tabaka kromatografisi	(ITK)
Dimetil amino benzaldehit	(DMAB)
İnfrared Spektroskopisi	(IR)
Nükleer Manyetik Rezonans	(NMR)
Hyaluronan sentetaz	(HAS)
Ekstraselüler matriks	(ECM)
D-glukuronik asit	(GlcA)
<i>N</i> -asetil-D-glukozamin	(GlcNac)
Hyaluronan aracılı motilite reseptörü	(RHAMM)
Lenfatik damar endotelial HA reseptörü	(LYVE-1)
Karaciğer endotelial hücre reseptörü	(LEC)
Endositozis için reseptör	(HARE)

## ÖZET

### Bazı İndol Türevi Bileşiklerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Biyolojik Etkileri Üzerindeki Çalışmalar

Tümör hücrelerinin büyümesi, gelişmesi ve tümör metastazı olayları ekstraselüler matriks bileşenleri ile sağlanmaktadır. Özellikle tümör hücrelerinde endotel tabakası çok hızlı değişmektedir. Hiyaluronik asitin endotel hücrelerin yapısında yer aldığı ve bu hücrelerde önemli rolünün olduğu bilinmektedir. Hiyaluronik asitin vücutta sentezi hiyaluronan sentetaz (HAS) enzimi tarafından yapılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, tümör metastazının sadece hiyalüronidaz bulunan hücrelerde meydana geldiği ancak hiyalüronidaz bulunmayan hücrelerinde ise gerçekleşemediğinin tespit edilmesi, bu enzimin inhibisyonunun yeni bir kanser tedavi yaklaşımı olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Tümör metastazı üzerinde yapılan çalışmalarda araştırmacıların dikkatini çeken heterosiklik halkalardan birisi de indol halkasıdır. İndol halkası yaşam için gerekli olan bazı biyolojik moleküllerin yapısında yer almaktadır.

Henüz günümüzde antimetastazik etkili yeni bir indol türevi bileşik tedaviye girmemişse de, son yıllarda indol türevi bileşiklerin antitümör aktiviteleri üzerine birçok araştırmanın yapıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada, indol halkasının 1, 2, 3 ve 5 numaralı konumunda değişik sübstitüentler taşıyan 7 adet indol türevi bileşik, hiyaluronidaz enzim inhibitör etkileri karşılaştırılmak amacıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen indol türevi bileşikler ve standart madde olarak kullanılan askorbik asidin palmitat tuzu pH 3.5 ve 7'de "Morgan-Elson" ve "Stains-all" testleri kullanılarak antihiyaluronidaz etkileri tespit edilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin 100 mM konsantrasyonda % inhibisyon değerleri incelendiğinde, Bileşik 1-7 pH 7'de %16-86 arasında pH 3.5'te ise %8-103 aralığında olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada sentezlenen 4-(3-fenil-1*H*-indol-2-il)fenol (Bileşik No: 4) bileşiğinin en yüksek antihiyaluronidaz etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Diğer bileşiklerin ise protonizasyondan dolayı IC<sub>50</sub> değerleri belirlenememiştir. Antihiyaluronidaz aktiviteye sahip bileşiklerin in vitro antihiyaluronidaz etkilerinin daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** İndol, hiyaluronidaz, hiyaluronik asit, metastaz ve anjiyojenez

## ABSTRACT

### Studies on Synthesis, Identification of Their Structure and Biologic Activities of Some Indol Derived Compounds

Components of extracellular matrix support growth and development of tumor cells and tumor metastasis. The endothelium layer especially in tumor cells changes very rapidly. It is well known that hyaluronic acid exists and plays an important role in the endothelium cells. Synthesis of hyaluronic acid in the organism is performed by hyaluronidase enzyme. Furthermore, a strong assumption can be made that inhibition of this enzyme may be a new approach for cancer treatment, as it was determined in the related studies that tumor metastasis occurs only in the cells having hyaluronidase, but not in those lacking this enzyme.

One of the significant heterocyclic rings in the studies carried out on tumor metastasis is indole ring. This ring exists in the structure of some essential biological molecules that are necessary for life.

Although a new indole derived compounds with antimetastatic activity have not been used in treatment yet, in recent years, a numerous study has been carried out on anti-tumor activity of indoles.

In this study, seven indole derived compounds, which have different substitutes at the 1, 2, 3 and 5 positions of the indole ring were synthesized, in order to compare their hyaluronidase enzyme inhibitory effects. The anti-hyaluronidase effects of the synthesized indole derived compounds and palmitate salt of ascorbic acid the reference substance, was investigated at pH 3.5 and 7 using “Morgan-Elson” and “Stains-all” tests.

The percent inhibition values for the synthesized compounds at a concentration of 100 mM, were found to be in the range of % 16-86 at pH 7, in the range of % 8-103 at pH 3.5 for compound 1-7.

In this study, it was determined that the newly synthesized compound of 4-(3-phenyl-1*H*-indol-2-il)phenol (Compound: 4) exhibited the highest anti-hyaluronidase activity. IC<sub>50</sub> values of other compound were not determined due to protonization of these compounds. In vitro anti-hyaluronidase effect of the compounds should be investigated by further studies.

**Key words:** Indole, hyaluronidase, hyaluronic asit, metastasis ve angiogenes

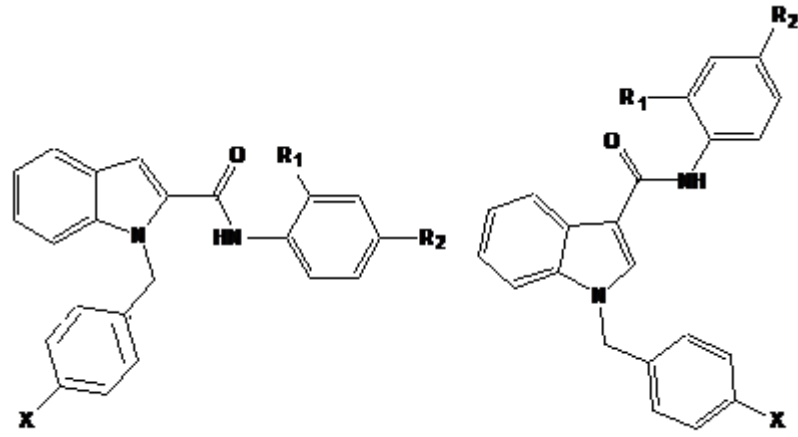
# 1. GİRİŞ

Tümör metastazı tam olarak aydınlatılmamış karmaşık bir olaydır. Tümör hücresinin büyüyüp gelişmesi, tümörü besleyecek olan yeni damarların oluşmasına; kan desteği ve oksijene bağlıdır. Bu olayların tamamı ekstraselüler matriks bileşenleri ile sağlanmaktadır. Fibroblastları, makrofaj hücrelerini, mast hücrelerini barındıran ekstraselüler matriks içinde yüksek miktarda hiyalüronik asitin de (HA) bulunduğu glikozaminoglikanlar (GAG) da yer almaktadır. HA lineer polisakkaritlerden oluşan bir GAG'dır (1-3). HA'nın sentezi hiyaluronan sentetaz enzimleri tarafından gerçekleştirilirken HA'nın vücutta yıkımına neden olan enzim ise hiyaluronan sentetaz enzimleridir (2,4-6). Bu enzimler üzerinde yapılan çalışmalar 1928 yıllarına kadar dayanmaktadır. Tümör hücrelerinin kemoterapiye dirençli olduğu durumlarda devreye hiyaluronidaz enziminin girmesi ile tümör hücrelerinin duyarlılığı artmaktadır. Bu enzimin tümör içi basıncını azalttığı bu sayede verilen ilacın tümör hücresi içine girmesini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Literatüre göre göğüs, akciğer, prostat kanserlerinin ilerlemesinde hiyalüronidaz enziminin rol oynadığı görülmektedir (4,5,7,8).

Ayrıca yapılan çalışmalarda, metastazın sadece hiyalüronidaz bulunan hücrelerde meydana geldiği, hiyalüronidaz bulunmayan tümör hücrelerinde ise gerçekleşemediğinin tespit edilmesi, bu enzimin inhibisyonunun yeni bir kanser tedavi yaklaşımı olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Tümör metastazının tedavisinde yararlanmak üzere araştırmacıların dikkatini çeken heterosiklik halkalardan biri de indol halkasıdır. İndol halkası yaşam için gerekli olan bazı biyolojik moleküllerin (triptofan, serotonin ve melatonin) yapısında yer almaktadır. Henüz günümüzde antimetastazik etkili yeni bir indol türevi bileşik tedaviye girmemişse de son yıllarda indol türevi bileşiklerin antihiyaluronidaz aktiviteleri üzerinde yeni çalışmalara literatürde rastlanmaktadır (9,10).

2007 yılında Olgen ve ark. ları (9) tarafından yayınlanan bir çalışmada, indol-2- ve indol-3-karboksamid türevlerinin antihiyaluronidaz aktiviteleri araştırılmış ve indol azotuna bağlı *p*-floro veya klorobenzil grubu taşıyan bileşiklerin yüksek aktiviteye sahip oldukları bildirilmiştir (Formül 1).



X= H,F

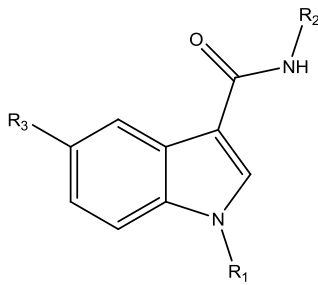
R<sub>1</sub>=H,F, Cl

R<sub>2</sub>=H, F, Cl

### Formül 1

2008 yılında Kaesler ve ark. ları (10) tarafından yapılan bir çalışmada indol türevi bazı bileşiklerin antihiyalüronidaz aktiviteleri belirlenmiştir. Bu moleküllerde indol halkasına 1. , 3. ve 5. konumlardan değişik süstitüsyonlar yapılarak karboksamit ve asetamit türevlerinin aktiviteleri araştırılmıştır (Formül 2).

#### Karboksamit türevleri

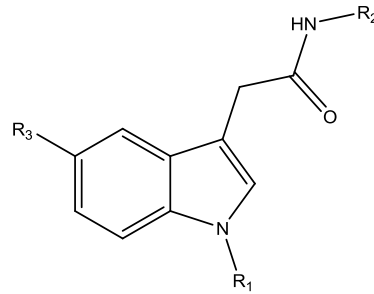


R<sub>1</sub>= metil, *p*-florobenzil

R<sub>2</sub>= piridil-2-il, piridil-4-il

R<sub>3</sub>= hidrojen, brom

#### Asetamit türevleri



R<sub>1</sub>= hidrojen, etil, benzil, *p*-florobenzil

R<sub>2</sub>= piridil-2-il, piridil-4-il

R<sub>3</sub>= hidrojen

### Formül 2



Bu çalışmada hiyaluronidaz inhibisyon değerleri Morgan-Elson (pH = 7) ve Stains-All (pH = 3.5) testinde iki farklı pH'da değerlendirilmiştir. pH 7'de en aktif indol türevi bileşiği %86 inhibisyon değeri ile 2-(4-Bromofenil)-5-metil-3-fenil-1*H*-indol, pH 3.5'te ise en aktif indol türevlerinin %103 inhibisyon değeri ile 4-(5-Metil-3-fenil-1*H*-indol-2-il)fenol ve 2-(4-Klorofenil)-5-metil-3-fenil-1*H*-indol bileşiklerinin olduğu bulunmuştur.

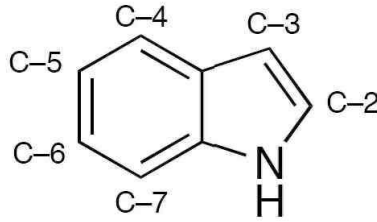
Literatürde apigenin, biryoantratiyofen, 1,8-dihidroantrakinon, SU5416, *cis*-hinokiresol gibi moleküller ile çalışma grubumuzun benzimidazol, benzoksazol, indol türevi bileşiklerin hiyalüronidaz enzim inhibitörü etkilerinin incelendiği bileşiklerde yer almaktadır (10-15). Bu çalışmada da 1. , 2. , 3. ve 5. konumlarda di veya tri süstitüe indol türevi bileşiklerin sentezi ve hiyaluronidaz enzim inhibisyonu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İndol Halkasının Genel Özellikleri

İndol sözcüğü indigo (çivit) ve oleum (yağ) sözcüklerinin bileşiminden meydana gelmiştir. Çivit boyasının yağ ile muamelesi sonucu elde edilmiştir.

İndol halkası, pirol ve benzen halkalarının kaynaşmasından oluşmuş bir halka sistemidir. Bu halka sisteminde numaralandırmaya pirol halkasında yer alan azot atomundan başlanır. Numaralandırmaya pirol halkası üzerinden devam edilir (Formül 3). İndol yapısı; 2,3-benzopirol; 1-benzazol; 1-*H* indol; 1-benzol beta pirol şeklinde de isimlendirilmektedir (16).



**Formül 3**

$C_8H_7N$  kapalı formülüne ve 117.15 g/mol molekül ağırlığına sahip olan indol (17), doğada bolca bulunan aromatik bir heterosiklik halkadır. İndol halkası, 5 üyeli pirol halkası ve 6 üyeli benzen halkasının kondenzasyonundan oluşan bisiklik bir yapıdır. İndol halkasında yer alan azot atomunun sahip olduğu elektron çifti aromatik halkasının elektron sistemine katılmasından dolayı basit amin yapıları gibi güçlü baz özelliği göstermez.

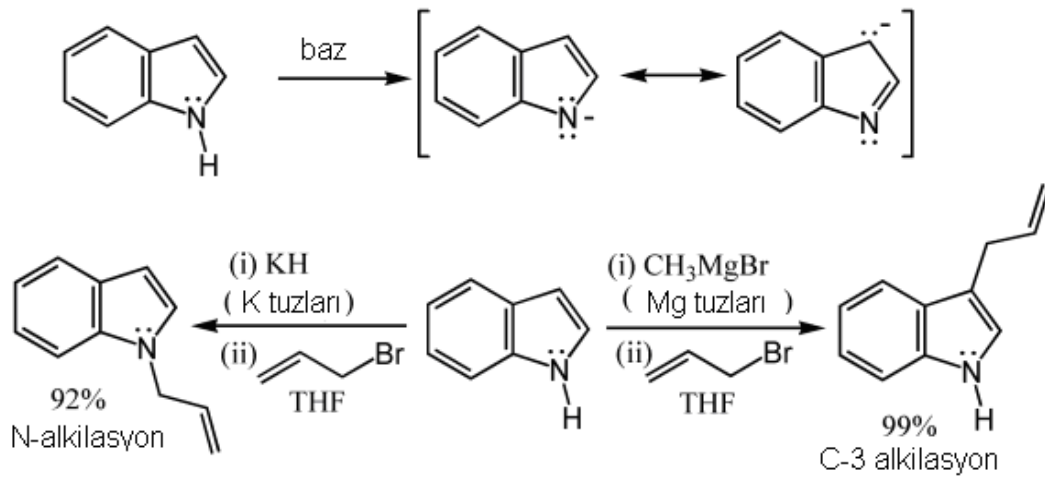
İndol halkası oda sıcaklığında katıdır. 52-54 °C'de (326 °K) erir; 253-254 °C'de (526°K) kaynar. İndoller sıcak suda çok iyi çözünürler. 20 °C'deki sudaki çözünürlükleri 0.19 g/ 100 mL dir (17).

Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde indolün asitliği ( $pK_a$ ) 16.2 iken bazikliği ( $pK_b$ ) 17.6'dır (17).

Süstitüe indoller, nörotransmitter serotonin ve melatonin gibi triptamin içeren hormonların yapısında yer alırlar. Bitki hormonu olan Auksin (indolil-3-asetik asit), antienflamatuar bir ilaç olan indometazin ve betablokör pindolol diğer indol taşıyan bileşiklere örnek olarak verilebilir.

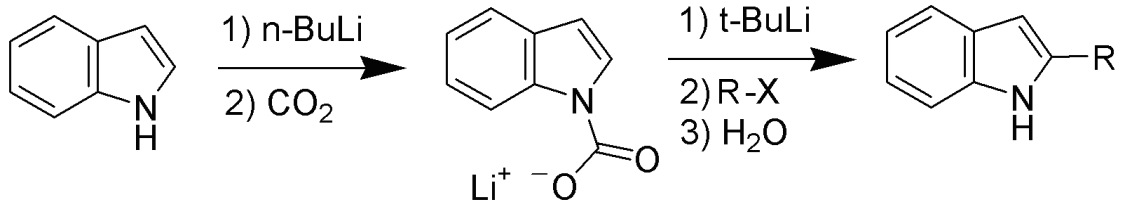
İndol halkasındaki azot atomunun ortaklanmamış bir çift elektronu bulunmaktadır. Bu nedenle indol, amin ve anilinler kadar bazik özellik göstermez. Çünkü indol yapısındaki ortaklanmamış elektron çiftleri halkaya delokalize olmaktadır. İndolün HCl ile protonlanmış formunun pKa'sı 3.6'dır. Birçok indol yapısı taşıyan bileşiklerin (triptamin gibi) asidik ortamda kolayca protonlandıkları bilinmektedir.

İndol halkasında yer alan N-H protonunun DMSO içerisindeki pKa değeri 21'dir. Susuz ortamda NaH ve LiAlH<sub>4</sub> gibi güçlü bazlarla deprotonize edilebilir. Deprotonizasyon sonucu elde edilen indol anyonu tuzlarla iki farklı yolla reaksiyona girmektedir. Na ve K bileşiklerinin güçlü iyonik tuzları ile 1. konumdan elektrofilik reaksiyonlar verme eğiliminde iken magnezyum bileşikleri ile (Grignard rejanları) ve özellikle Zn kompleksleri ile 3 numaralı karbon atomu üzerinden reaksiyon vermektelerdir (Reaksiyon Denklemi 1). Aynı sebepten dolayı polar aprotik çözücülerle (dimetilformamit (DMF) ve DMSO gibi) 1. konuma atak ederken, nonpolar çözücülerle yapılan reaksiyonlarda (toluen gibi) 3. konumu tercih ederler (18).



**Reaksiyon Denklemi 1**

İndol halkasının azot hidrojeninden sonra 2. konuma bağlı H atomu en asidik protonudur. İndol halkasının 1. numaralı azot atomu n-LiBu veya Li diisopropilamid ile kapatılmasının ardından reaksiyonlar 2. konumdan yürür (Reaksiyon Denklemi 2). Daha sonra güçlü nükleofiller diğer elektrofiller gibi bu reaksiyonda kullanılabilir. Bunun yanında Bergman ve Venemalm süstitüe olmayan indollerin 2. konumdan lityumlanarak elde edilebildiği yöntem geliştirmişlerdir (19).



**Reaksiyon Denklemi 2**

## 2.2. İndol Sentez Yöntemleri ve Reaksiyon Mekanizmaları

İndol kimyası, indigo boyası ile yapılan çalışmalarla gelişmeye başlamıştır. Bu öncelikle izatin'e daha sonra da oksiindol'e çevrilmiştir (20). 1866'da Adolf von Baeyer çinko tozu kullanarak oksiindolu indole indirgemıştır. 1869'da indolün bugün kabul edilen formülünü önermiştir (21).

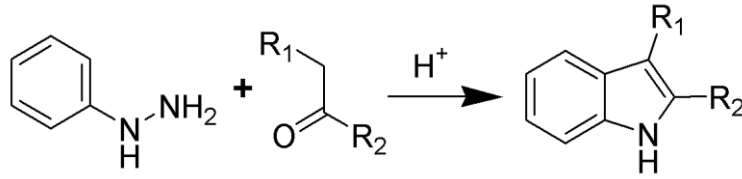
Baeyer'in indol halkası için orjinal yapısı; 1869 yılında ortaya konmuştur.

Şüphesiz, 19. yüzyılın sonlarına kadar indol türevleri önemli birer boyar madde olmuştur. 1930'lu yıllarda indol çekirdeğinin birçok önemli alkaloidlerde, triptofanda, auksin'de bulunduğu belirlendikten sonra indole ilgi artmış ve bugünkü araştırmalar için aktif bir araştırma sahası haline dönüşmüştür (22). İndol kömür katranının majör bileşenidir ve 220-260 °C'deki distilasyon fraksiyonu materyallerin temel endüstriyel kaynağıdır. İndol ve türevleri birçok metodla sentez edilebilmektedir (23-25).

## 2.2.1. Sigmatropik rearanjman reaksiyonları

### 2.2.1.1. Fischer İndol Sentezi

1883 yılında Emil Fischer tarafından süstitüe indol türevlerini sentezlemek için geliştirilen en eski ve en güvenilir yöntemdir. Buna rağmen nonsüstitüe indol sentezlemekte tercih edilmeyen bu yöntem, genelde 2. ve 3. konumlardan süstitüe indollerini sentezlemekte kullanılmaktadır (Reaksiyon denklemi 3) (26) .



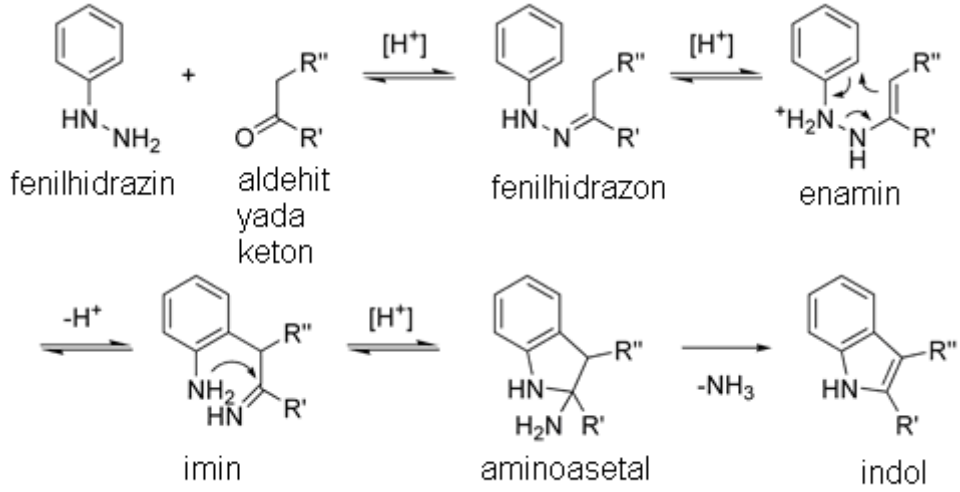
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = aril veya alkil grupları

### Reaksiyon Denklemi 3

Bu sentez yönteminde asit katalizör seçimi çok önemlidir. HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, polifosforik asit ve *p*-toluensülfonik asit gibi bronsted asitleri başarıyla kullanılabilir. Bor triflorür, çinko klorür, demir klorür ve alüminyum klorür gibi katalizörler de kullanılabilir (26-28).

#### Reaksiyon Mekanizması:

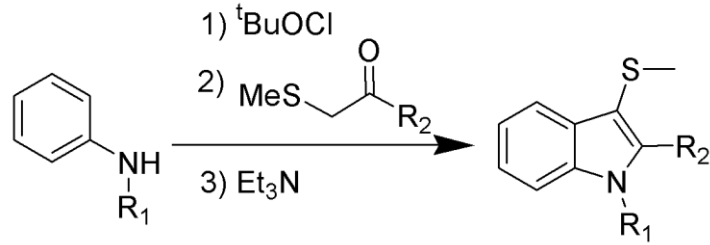
Süstitüe veya nonsüstitüefenilhidrazin türevleri uygun aldehit veya ketonla reaksiyon girerek başlangıçta enamini (veya en-hidrazin) izomeri olan fenilhidrazonu oluşturur. Ortamda bulunan asidik hidrojenin enamini protonlanmasından sonra, imin oluşturmak üzere bir siklik [3,3]-sigmatropik rearanjmanlar meydana gelir. Sonuç ürünü imin siklik bir amino asetal formu oluşturur ki; bu da asit katalizörü varlığında NH<sub>3</sub> ortamdan çıkar, uygun aromatik indollerin oluşmasıyla sonuçlanır (Reaksiyon Denklemi 4).



#### Reaksiyon Denklemi 4

##### 2.2.1.2. Gassman İndol Sentezi

Gassman indol sentezi anilinden sübtitüe indollerini sentezlemek için kullanılan bir kimyasal reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 5) (29, 30).



#### Reaksiyon Denklemi 5

Tek basamaklı bir reaksiyon olan Gassman indol sentezinde hiçbir ara ürün izole edilememektedir.  $R_1$  sübtitüsüyonu hidrojen veya alkil,  $R_2$  sübtitüsüyonu aril veya alkil iken bu reaksiyon yüksek verimle yürümektedir. Ancak, 4-metoksianilin bu reaksiyonu vermemektedir. Bu reaksiyonda 3. konumda tiyometil grubu uzaklaştırılmak istenirse raney nikeli kullanılmakta ve 3*H*-indol elde edilmektedir.

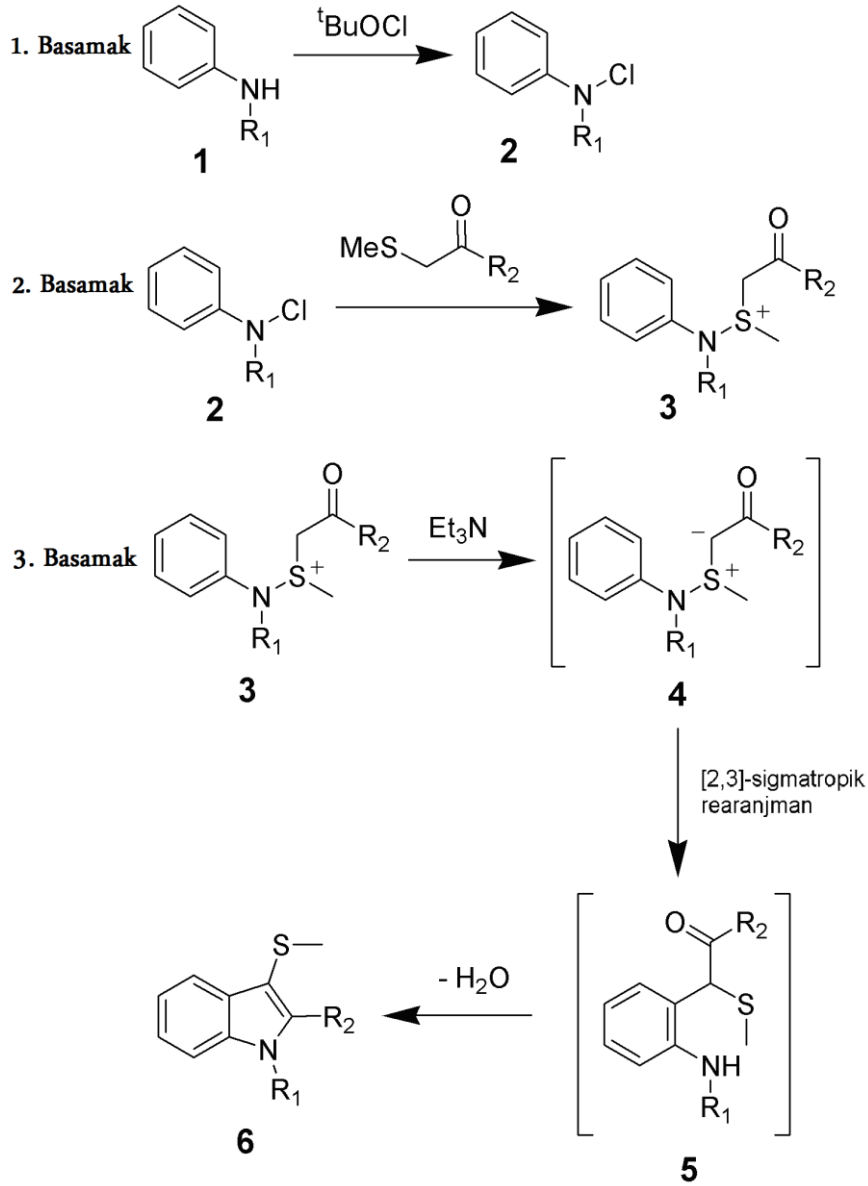
### Reaksiyon Mekanizması:

Gassman indol sentezinin reaksiyon mekanizması 3 basamaktan oluşmaktadır.

İlk basamak kloramin (2) oluşturmak üzere tert-bütül hipoklorit kullanılarak anilinin (1) oksidasyonudur.

İkinci basamak, sülfonyum iyonu (3) vermesi için keton ilave edilmesidir. Bu tipik olarak düşük sıcaklıklarda yapılır (-78 °C ).

Üçüncü ve son basamak bir baz olan trietilamin eklenmesidir. Oda sıcaklığına kadar ısıtmayla baz, sülfonyum iyonunu deprotonize eder ve sülfonyumilid (4) oluşur ve bu madde çok hızlı bir şekilde keton (5) oluşturmak üzere [2,3]-sigmatropik reorganizasyona girer. Keton (5) tasarlanan 3-tiyometilindolu (6) oluşturmak üzere kondenzasyon reaksiyonuna girer (Reaksiyon Denklemi 6 ) (31, 32).

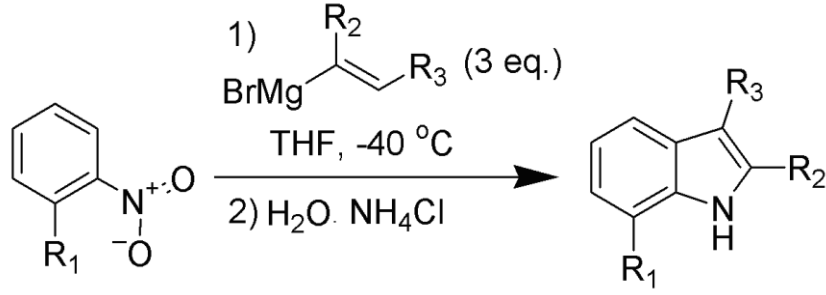


**Reaksiyon Denklemi 6**

### 2.2.1.3. Bartoli İndol Sentezi

Bartoli İndol sentezi veya Bartoli reaksiyonu sübstitüe indol oluşturmak üzere, o-sübstitüe nitroarenlerin ve vinil grignard reaktiflerinin reaksiyonu ile indol sentezinin yapıldığı kimyasal bir tepkimedir (Reaksiyon Denklemi 7) (33-35).





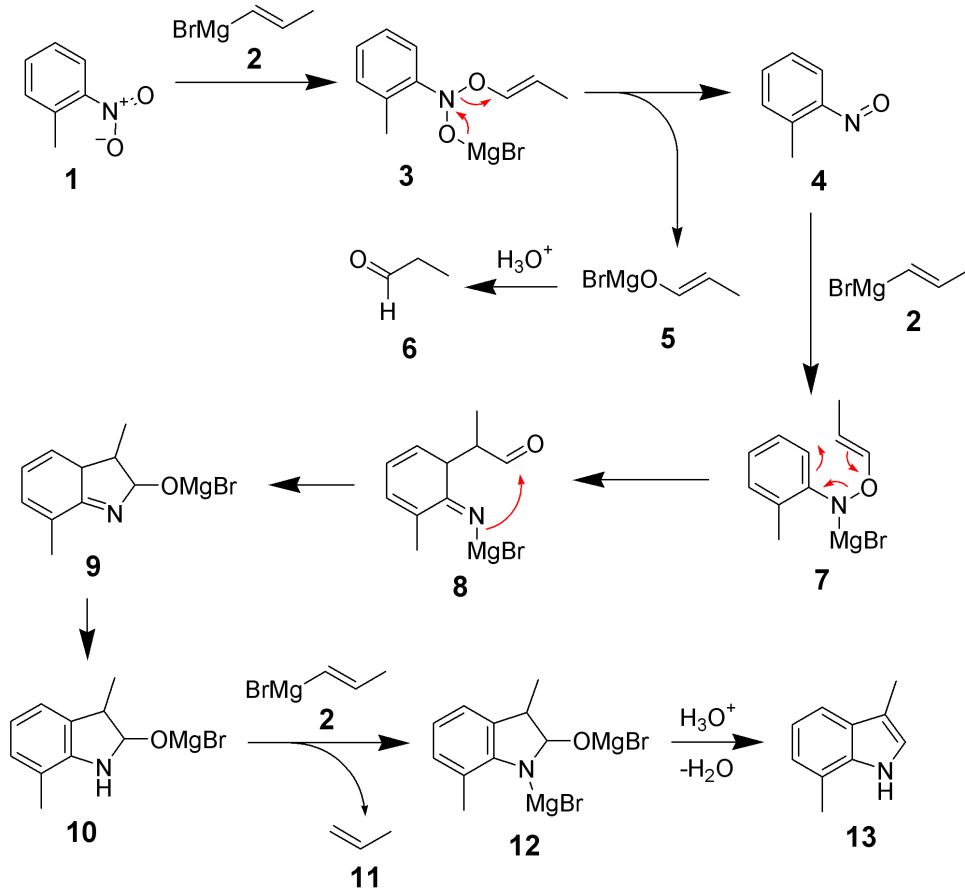
### Reaksiyon Denklemi 7

Başlangıç bileşiğinde orto konumunda nitro grubunun yer alması reaksiyonun gerçekleşmesi için gereklidir. Sübstitüsü olmazsa reaksiyon başarısız olmaktadır. Vinil grignard reaktifinin 3 kat kullanılması yüksek verimde ürün elde edilebilmesi için gereklidir.

Bartoli reaksiyonu, 7-sübstitüe indoller için en kısa ve en kolay uygulanabilir bir sentez yöntemidir (36, 37). Leimgruber-Batcho indol sentezi de indol türevleri için aynı özelliğe sahiptir. Bartoli indol sentezinin bir avantajı; hem karboksilik halkadan hem de pirol halkasından sübstituent taşıyan türevlerin sentezini gerçekleştirilebilirken bu Leimgruber-Batcho İndol sentezinde zordur.

Reaksiyon Denklemi:

Bartoli İndol sentezinin reaksiyon mekanizması (38) aşağıda örneklendirilmiştir. o-nitrotoluen (1) ve propenil grignard (2) kullanılarak 3,7-dimetilindole (13) sentezlenmiştir (Reaksiyon Denklemi 8 ).



### Reaksiyon Denklemi 8

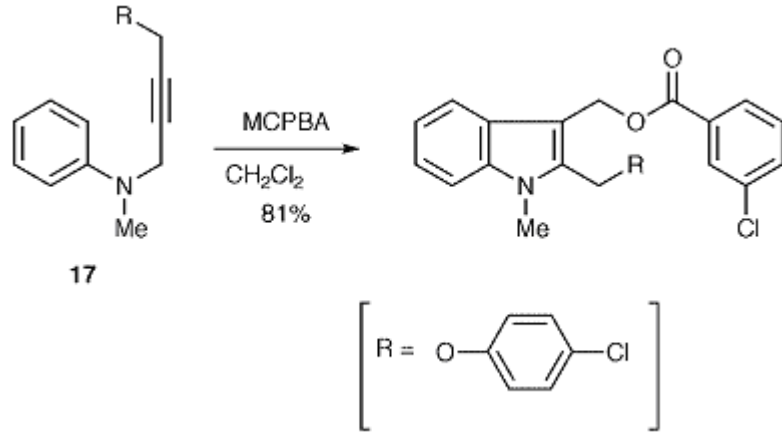
Mekanizma ara ürün (3)'ü oluşturmak üzere grignard reaktifinin (2) nitroaren (1) üzerine süstitüsüyonu ile başlar. Ara ürün (3) kendiliğinden nitrozoaren (4) ve magnezyum tuzu (5) oluşturmak üzere ayrışır. Daha sonra karbonil bileşiği (6) ayrılır. Nitrozoarenin (4) 2. grignard reaktifıyla (2) reaksiyona girmesiyle ara ürün (7) oluşur. Orto grubunun neden olduğu sterik engelden dolayı [3,3]-sigmatropik rearanjman ara ürün (8)'i meydana getirir. Siklizasyon ve tautomerizasyon sonucu ara ürün (10) oluşur. Bu ara ürün de 3. eş grignard reaktifıyla (2) dimagnezyum indol tuzunu (12) vermek üzere reaksiyona girer. Reaksiyon üzerinde çalışıldıktan sonra su ortamdan ayrılır ve tasarlanan indolün (13) sentezi gerçekleşir.

Bu nedenle, grignard reaktifinin 3 kat kullanılması gereklidir. Birincisi karbonil bileşiği olur. (6) İkincisi alken (11) oluşturmak üzere protonlanır. Üçüncüsü de indol halkasına dahil olur.

Nitrozo ara ürünü (4) reaksiyondan izole edilir. Ayrıca nitrozo ara ürünün (4) iki eşdeğer grignard reaktifıyla tepkimesi sonucu istenilen indol oluşur.

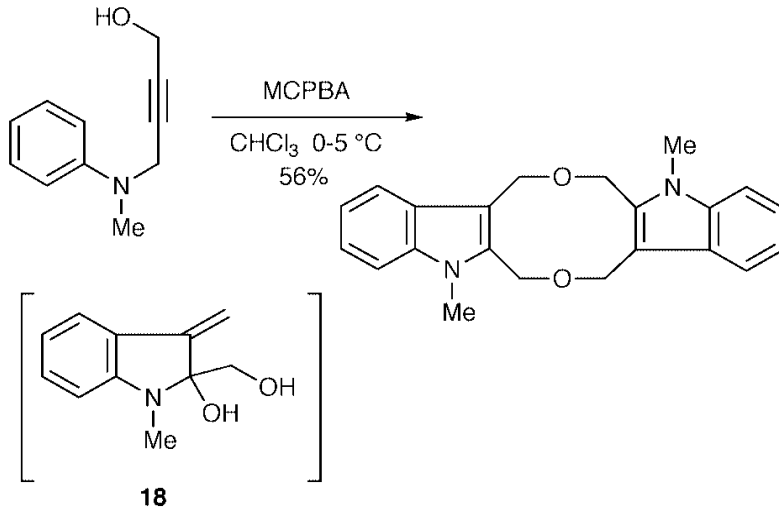
#### 2.2.1.4. Thyagarajan İndol Sentezi

Thyagarajan ve ark.ları indol halka yapısı elde edilen yeni bir reaksiyon bulmuşlardır. Bu mekanizma aril propanilaminin azotunun okside edilmesiyle sıralı olarak [2,3]- ve [3,3]-sigmatropik rearanjmanlar içerir ( Reaksiyon Denklemi 9 ) (39).



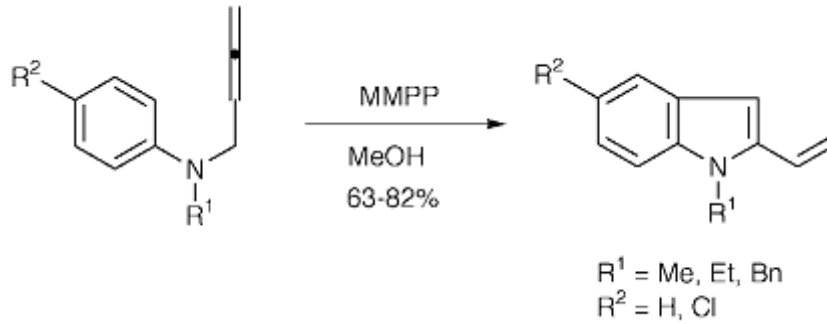
#### Reaksiyon Denklemi 9

Çalışmaların devamında Majudar ve ark.ları bu reaksiyonu iki indol birimi içeren siklik biesterler (Reaksiyon denklemi 10) ve dihidro-1*H*-pirano[3,2-*e*]indol-7- on türevleri elde etmek üzere geliştirmişlerdir. Bu mekanizma 3-metilenindolinin dimerizasyonunu içermesi üzerine kurulmuştur (40).



### Reaksiyon Denklemi 10

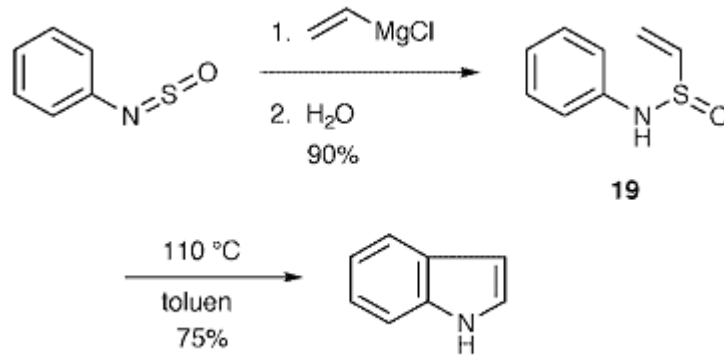
Birbiri ardına gerçekleşecek olan [2,3]- ve [3,3]- sigmatropik rearanjmanların düzeninin, *N* – alkil- *N*-allenmetilanilinden *N*-alkil-2–vinilindollerin oluşumunu açıklayacağı söylenmektedir ( Reaksiyon Denklemi 11 ) (41).



### Reaksiyon Denklemi 11

### 2.2.1.5. Julia İndol Sentezi

Julia ve ark.ları [3,3]- sigmatropik rearanjmanı içeren ve kükürt kullanımına hazır yeni bir indol halkası sentez yöntemi ortaya çıkarmışlardır (Reaksiyon Denklemi 12). Yakın bir tarihte, bu araştırmacılar kendi çalışma alanlarıyla ilgili bütün bilgileri ve birçok etkili reaksiyonları içeren dökümanlar vermişlerdir (42).

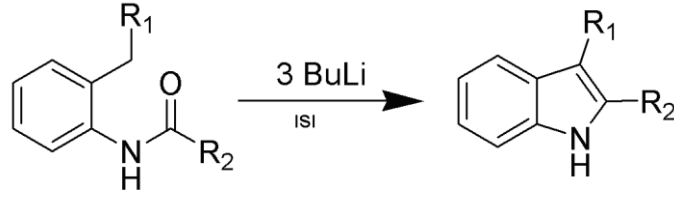


Reaksiyon Denklemi 12

## 2.2.2. Nükleofilik Siklizasyon Reaksiyonları

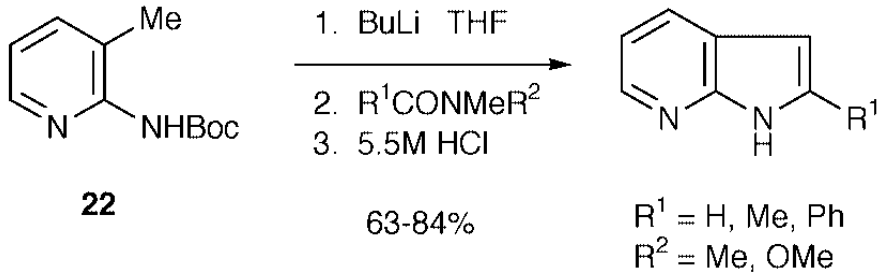
### 2.2.2.1. Madelung İndol Sentezi

Madelung indol sentezi, yüksek sıcaklıkta, güçlü bir baz kullanılarak *N*-fenilamitlerin intramoleküler siklizasyonu ile sübstitüe veya nonsübstitüe indollerin sentezlendiği bir kimyasal reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 13) (43).



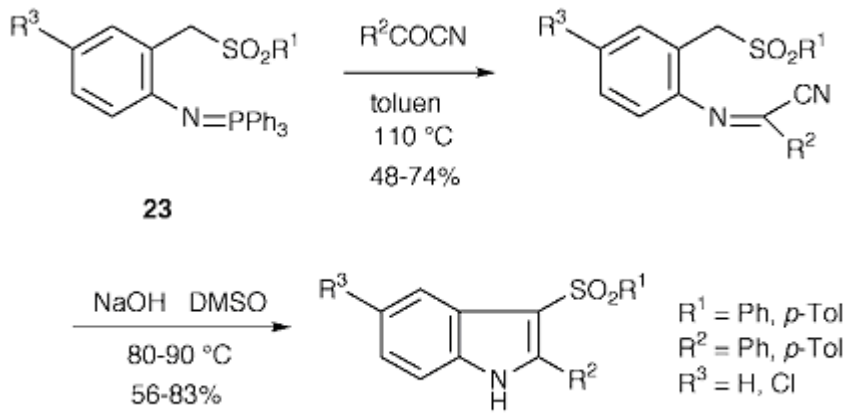
### Reaksiyon Denklemi 13

Elektrofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonlarının bu metotla yürütülmesinin zor olması nedeniyle esas olarak 2-alkinildollerin senteziyle sınırlanmaktadır. Fosfonyum tuzu uygun benzil metil eterden üretilebilmektedir. Bu reaksiyon özellikle 2-perfloroalkilindollerin sentezlenmesi için değerlidir ki elde edilen ürünler de önem taşımaktadır. Bu reaksiyonun baz katalizli şekli katı faz sentezine uygun hale getirilmiştir. Piridinden hareketle sentezlen ara ürün olan dianyon amitlerle doyurulur. Sonuçta azaindol ürünü elde edilir ki bu da Madelung-Houlihan değişimi ile tanımlanmaktadır (Reaksiyon Denklemi 14) (44). Bu reaksiyon etkili yeni dopaminerjik ajanlar olan pirano [2,3-*e*] indollerin sentezinde ilk olarak Clarck ve ark. ları tarafından kullanılmıştır (45).

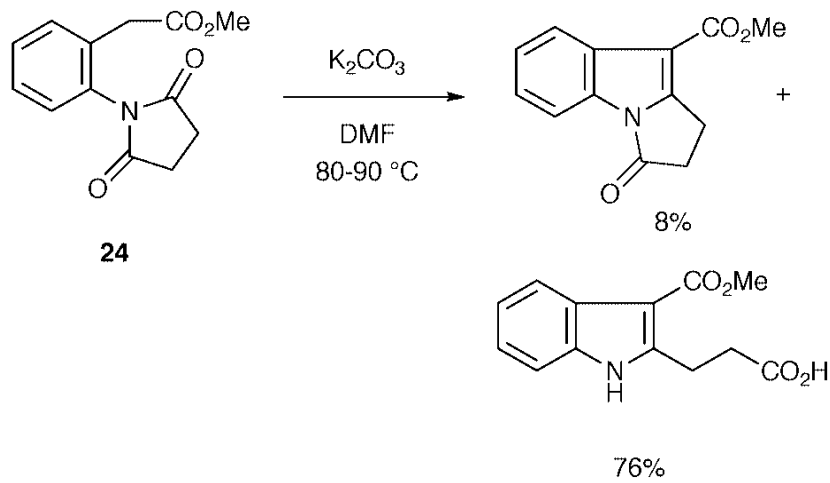


### Reaksiyon Denklemi 14

Ayrıca fenil izosiyanat ürünlerine batırılan karboimidler, baz ile 2-anilinindole siklize olurlar. Bu metot 2-aril-3-(arilsülfonil)indol ve 2-anilino-3-(arilsülfonil)indollerin hazırlanmasında çok iyidir (Reaksiyon Denklemi 15). Fenilasetat imidlerinin siklizasyonu baz etkisi altında meydana gelir (Reaksiyon Denklemi 16) (46).



### Reaksiyon Denklemi 15

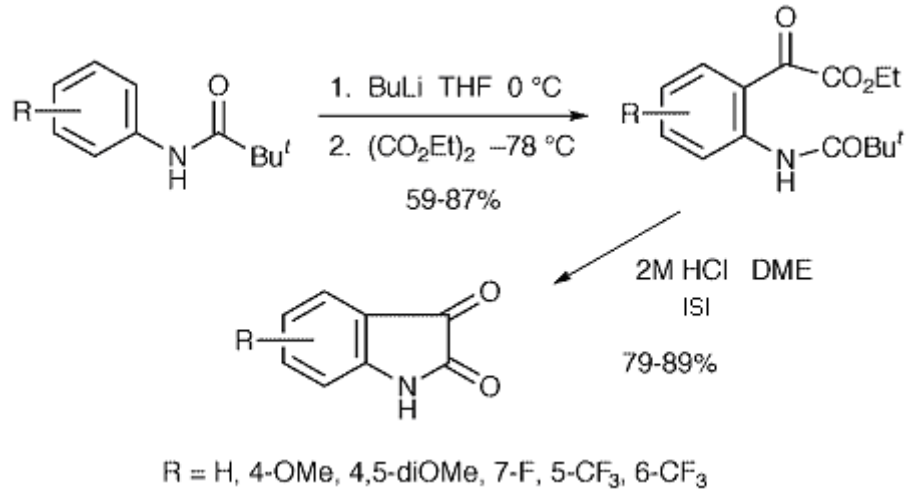


### Reaksiyon Denklemi 16

İmin türevlerini lityum amitlerle triflorometil aril keton ve *o*-toluidinlerle siklize etmek başarılı bir sonuç vermemekte, sadece amidin ürünleri oluşmaktadır (47).

#### 2.2.2.2. Wender İndol Sentezi

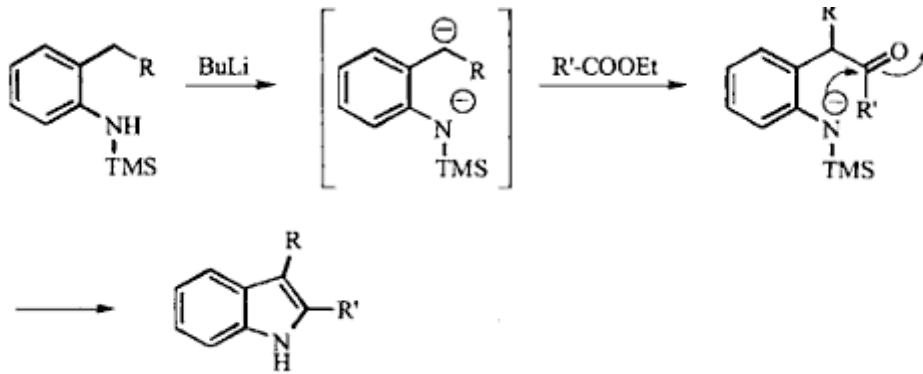
Wender indol sentezi, *N*-fenilaminin orto konuma lityum eklenmesi ile devam eden bir reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 17) (48).



**Reaksiyon Denklemi 17**

### 2.2.2.3. Smith İndol Sentezi

*N*-trimetilsilil-*o*-toluidinin yapılan bir seri reaksiyon sonucu olan non-enabolize esterle yapılan sübtitüe indol sentez yöntemi, Smith indol sentezi adını alır (Reaksiyon Denklemi 18) (49).



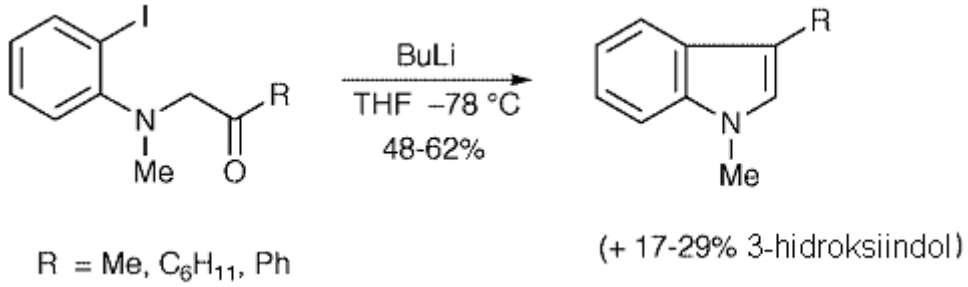
**Reaksiyon Denklemi 18**

### 2.2.2.4. Kihara İndol Sentezi

Khiara ve ark. ları fenil ve alkil *N*-(2-iyodofenil)-*N*-metilaminometil ketonla yapılan intramoleküler Barbier reaksiyonunu içeren bir indol halkası formasyonu tanımlamıştır



(Reaksiyon Denklemi 19). Hidroksiindol eğer elde edilirse, sulu HCl ile indole çevrilebilir (50).

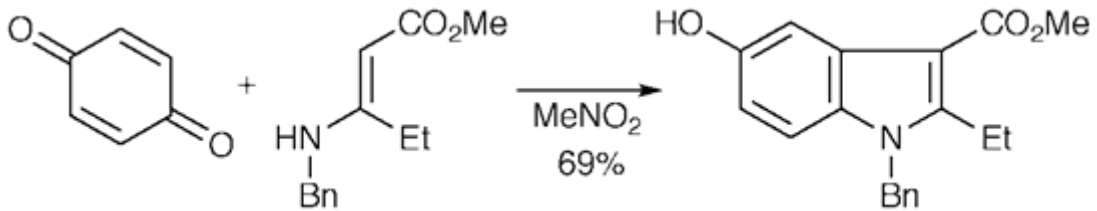


**Reaksiyon Denklemi 19**

### 2.2.2.5. Nenitzescu İndol Sentezi

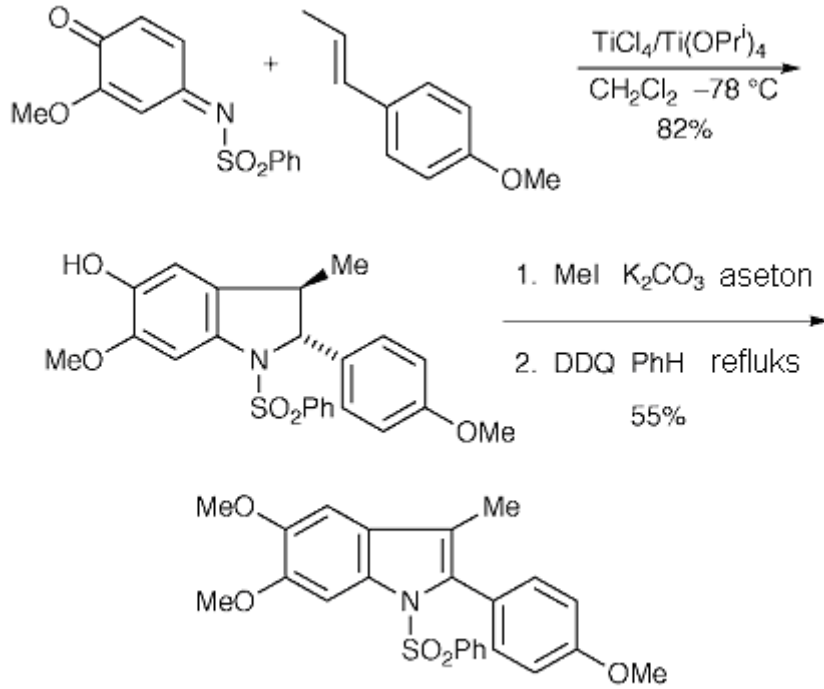
Nenitzescu indol sentezi, benzokinondan ve  $\beta$ -aminokrotonik esterlerden 5-hidroksiindol türevlerinin sentezlenmesini sağlayan bir kimyasal reaksiyondur (51).

Geçen 5 yılda Nenitzescu indol sentezinde bir canlanma görülmeye başlanmıştır. Bu klasik düzen, antitümör etkili indolkinon sentezinde anahtar rol almaktadır. Bu reaksiyon aynı zamanda bir seri olan *N*-aril-5-hidroksiindollerin sentezi ile etkili ve seçici s-PLA2 inhibitörlerinin sentezinde kullanılmaktadır (Reaksiyon Denklemi 20) (52).



### 2.2.2.6. Engler İndol Sentezi

Engler ve ark.ları lewis asitine dayalı yeni bir indol sentez reaksiyonu açıklamışlardır. Bu reaksiyonda enol eterleri ve stirenler ile benzokinon iminler kullanılmıştır. Aşağıda verilen reaksiyon denkleminde de görüldüğü gibi (Reaksiyon Denklemi 21) bu sentez yöntemi Nenitzescu indol halka sentezine benzerlik göstermektedir. Engler indol yerine benzofuranlar elde edilebilmesi için reaksiyonu lewis asitlerini değiştirerek çok güzel yönlendirmektedir (53).

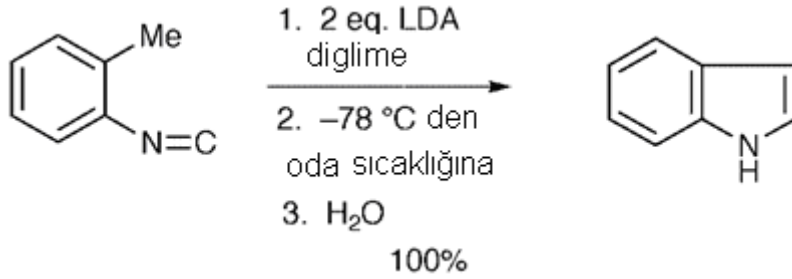


### Reaksiyon Denklemi 21

Kita ve ark. ları Engler sentezine benzer bir indol sentez yöntemi aktarmışlardır. Kita yönteminin değişimleri alfa metil stiren ve fenil vinil sülfidin, fenilyodinyum bistrifloroasetat etkisi altında *p*-metoksi-*N*-tosilanilinle reaksiyonunu içermektedir. Benzokinon ara ürününü veren ortam şartları Engler yöntemindeki ara ürün oluşma şartlarına benzerlik göstermektedir.

### 2.2.2.7. Saegusa İndol Sentezi

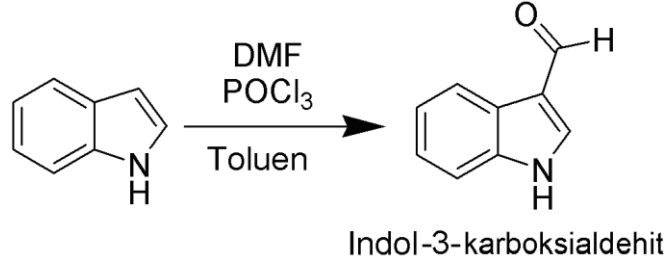
*o*-Tolilizosiyanitin siklizasyonu Saegusa ve ark. ları tarafından 1977 yılında geliştirilen kuvvetli bir indol sentez yöntemidir (Reaksiyon Denklemi 22) (54). Genel bir reaksiyondur ve Makosza ve ark. larının 1,3,4,5-tetrahidrobenzo[*cd*]indol çalışmalarında kullanılmak için 5-aliloksi-3-(4-tolisülfonil)-1*H*-indol sentezinde de bu yöntemden yararlanılmıştır. Gerekli olan izosiyanit prekürsörü Makosza tarafından geliştirilen değişik bir nükleofilik süstitüsyonla sentezlenmiştir.



**Reaksiyon Denklemi 22**

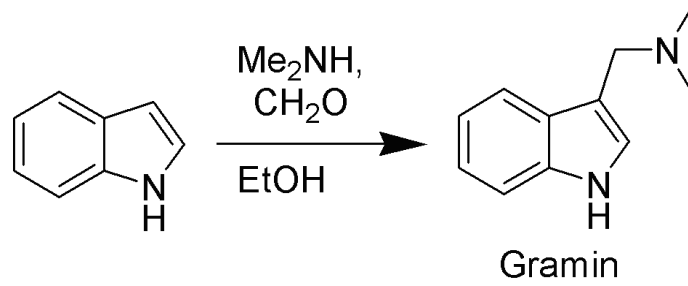
### 2.2.3. Elektrofilik Siklizasyon Reaksiyonları

İndol halkasındaki 3. konumda yer alan karbon atomu elektrofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonları için en aktif konumdur. İndol halkası, benzene göre  $10^{13}$  kat daha reaktiftir. İndol halkasının 3. konumunun reaktivliği indol halkasının formillenmesi reaksiyonu olan Vilsmeier-Haack formülasyon reaksiyonunun oda sıcaklığında 3. konumdan gerçekleşmesi ile örneklenebilir (Reaksiyon Denklemi 23) (55).



**Reaksiyon Denklemi 23**

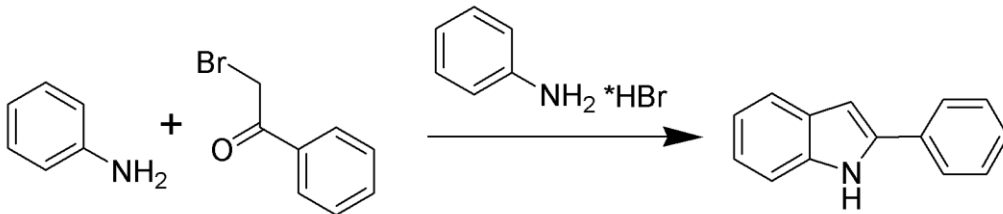
Yine indolün dimetilamin ve formaldehitle yapılan Mannich reaksiyonu sonucu çok kullanılan bir sentetik ara ürün olan Gramin bileşiği eldesindeki reaksiyon da 3. konumdan elektrofilik aromatik süstitüsyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir (Reaksiyon Denklemi 24).



**Reaksiyon Denklemi 24**

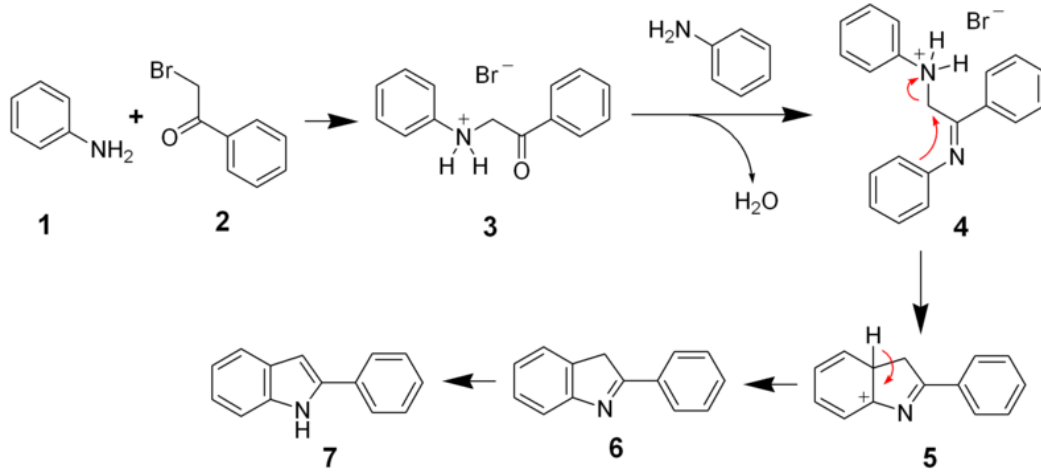
### 2.2.3.1. Bischler İndol Sentezi

Bischler-Möhlau İndol sentezi  $\alpha$ -bromo-asetofenondan ve anilinden 2-aril-indol oluşturan bir kimyasal reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 25) (56).



**Reaksiyon Denklemi 25**

Başlangıç materyalleri çok basit maddeler olmasına rağmen, reaksiyon mekanizması şaşırtıcı derecede karmaşıktır. İlk iki basamak 4 ara ürününü oluşturmak için alfa-bromoasetofenonla anilin molekküllerinin reaksiyonunu içerir. Yüklü anilin formları 5 ara ürününü meydana getirmek için elektrofilik siklizasyonla bir grup bırakır. Bu da hızlı bir aromatisasyon ve tautomerizasyonla tasarlanan indolü (7) verir (Reaksiyon Denklemi 26).

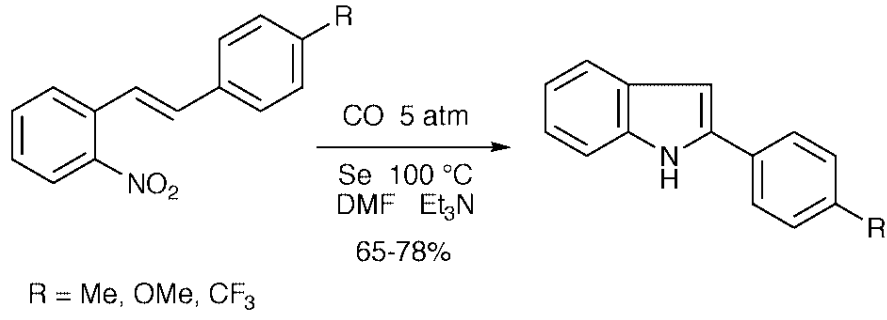


**Reaksiyon Denklemi 26**

### 2.2.3.2. Nitren Siklizasyonu

#### 2.2.3.2.1. Cadoan-Sundberg İndol Sentezi

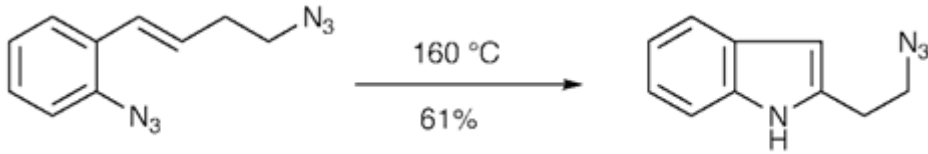
Bu sentez yöntemi ile *o*-nitrostirenler veya *o*-nitrostilbenlerin trietil fosfit ile deoksijenasyonlarını ve siklizasyon sonucu indol halkası elde edilmektedir. Holzapfel ve Dwyer bu metodu birçok karbazol ve 2-metoksikarbonilindolleri sentezlemek için kullanmışlardır. Bir başka grup ise 2-(*o*-nitrostiril)indollerin deoksijenasyon-siklizasyonu ile bir çok 2.2-biindolilleri sentezlemişlerdir. *o*-Nitrostilbenlerden elde edilen nitrenlerin CO ve Se yardımıyla 2-arilindolleri sentezlemek için kullanıldığı etkili bir yöntemdir (Reaksiyon Denklemi 27). Araştırmacılar, dekarboksilasyon ajanı olan karbonil selenidin (COSe) formasyonunu ortaya koymuşlardır. Hem 2- hemde 3-metilindol uygun *o*-nitrostirenlerden %70 ve %69 verimle sentezlenebilmektedirler. İndol halkası ise %55 verimle elde edilmektedir (57).



**Reaksiyon Denklemi 27**

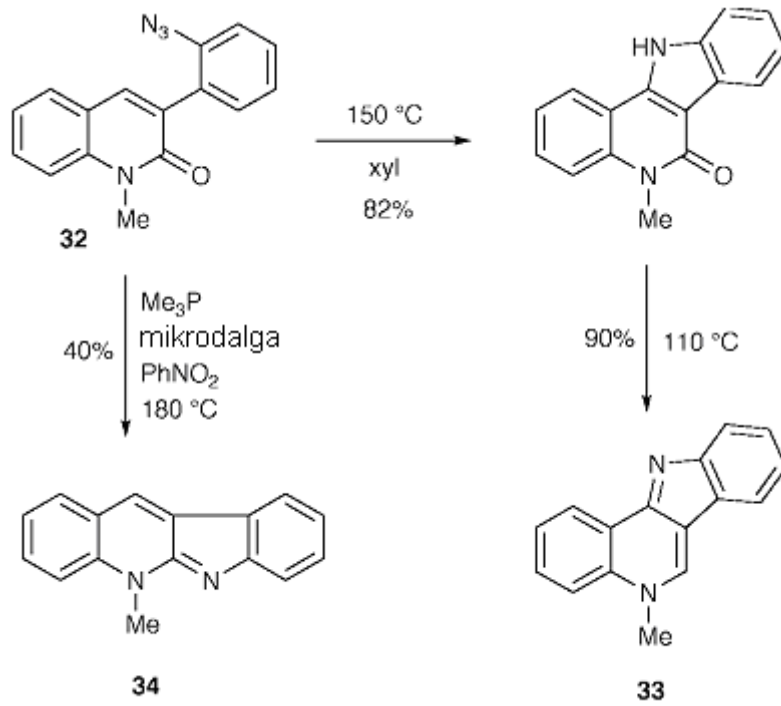
### 2.3.2.2. Sundberg İndol Sentezi

Molina ve ark. ları *o*-azidostirenlerin termolizini ve 2-(2-azidoetil)indol sentezlemek için nitrendenden siklizasyonla indol oluşumunu içeren Sundberg indol sentezini kullanmaktadır ( Reaksiyon denklemi 28 ) (58).



**Reaksiyon Denklemi 28**

Bu araştırma grubu ayrıca bu metodu ortak başlangıç ürünü olan azitten indol alkoloitleri olan kriptosanguin olentin ve türevlerini sentez etmek için kullanmışlardır (Reaksiyon Denklemi 29) (59). Denklem sonucundaki alkoloitleri sentezlemek için kullanılan benzer bir yöntem ise daha önce açıklanan Timari ve ark. larının yöntemidir.

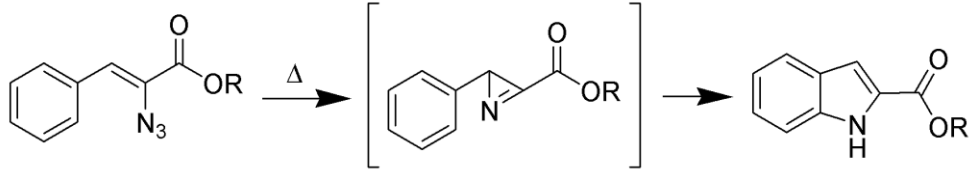


### Reaksiyon Denklemi 29

Çözücüye bağlı olarak 2-amino-2-azidofenil ürününün fotolizi sonucu iki non-indolik ürün olan 4-aminokarbazol ve 4,10-dihidroazepino[2,3-*b*]indol meydana gelmektedir (60). 1-benzopirolün termolizi alfa-karbolini ana ürün yapmaktadır. Reaksiyon bir piridin nitren içermek üzere planlanmıştır. Sundberg indol sentezi, 2-(2-azidofenil)nitroetilenden %54 verimle 2-nitroindol elde etmek için kullanılmaktadır.

### 2.2.3.2.3. Hemetsberger İndol Sentezi

Hemetsberger indol sentezi veyam Hemetsberger-Knittel sentezi, 3-aril-2-azido-propanoik esterini, indol-2-karboksilik esterine dönüştüren bir kimyasal reaksiyondur (61) (Reaksiyon Denklemi 30).



### Reaksiyon Denklemi 30

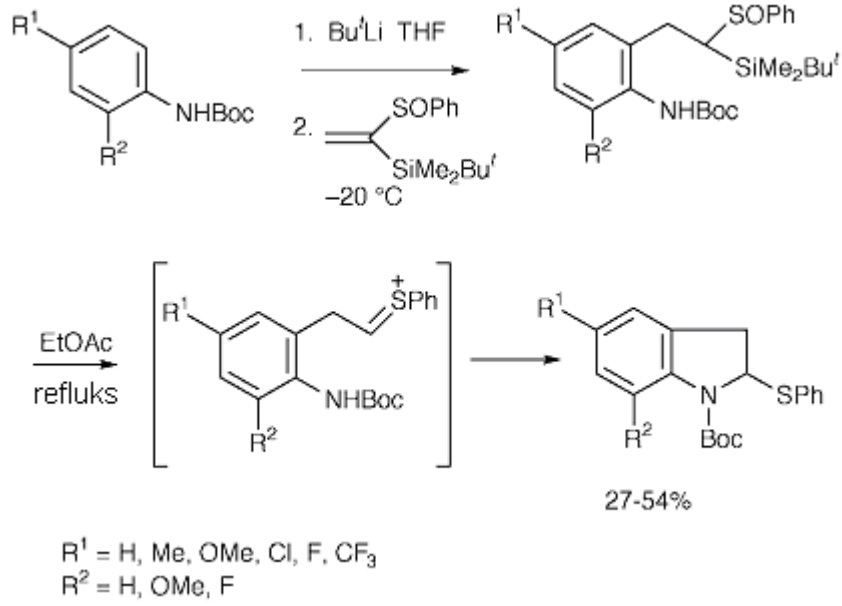
Yukarıdaki reaksiyonun ortalama verimi % 70 olmasına rağmen tercih edilen bir reaksiyon değildir. Çünkü hem stabilizasyon problemi söz konusudur hem de başlangıç maddelerini sentezlemek oldukça zordur.

Mekanizma belirsizdir. Ancak aziridin (62) ara ürünü izole edilebilmektedir. Mekanizmanın nitren ara ürünü üzerinden yürüdüğü tahmin edilmektedir.

#### 2.2.3.5. Iwao İndol Sentezi

Iwao halka formasyonunun ısıya bağlı olduğu yeni bir indol sentez yöntemi geliştirmiştir (Reaksiyon Denklemi 31) (63). 2-Tiyoinolinin MCPBA ile oksidasyonu uygun indollerini meydana getirir. ( $R_1=R_2=H$ , %100) Bu reorganizmana benzer bir sentez yöntemini de Fukuyama indol sentez yöntemidir (64).

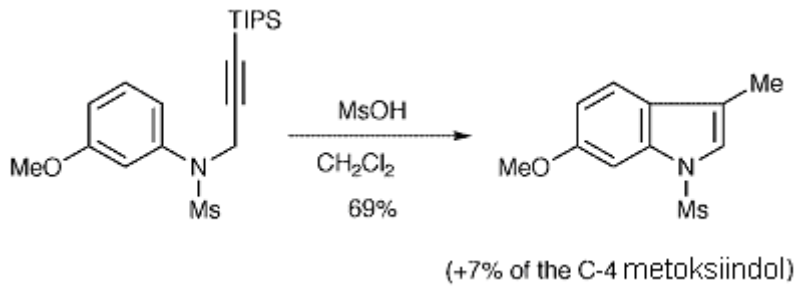




### Reaksiyon Denklemi 31

#### 2.2.3.6. Magnus İndol Sentezi

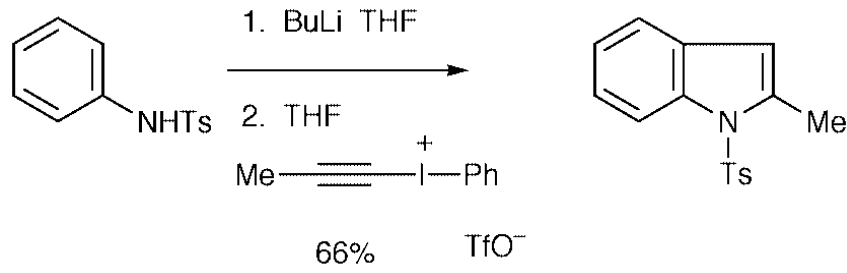
Magnus ve Mitchell triizopropilsilprop-2-inilanilinlerin metansülfonik asit ile muamelesi sonucu 3-metilindollerini oluşturduğunu ortaya koymuştur (Reaksiyon Denklemi 32) (65).



### Reaksiyon Denklemi 32

### 2.2.3.7. Feldman İndol Sentezi

Feldman ve ark.ları fenil(propinil)-iyodonyumun *N*-fenil-*p*-toluensülfonamitle reaksiyonundan bir basamakta indol oluşturduğunu bulmuşlardır (66). Reaksiyonun indol oluşturmak üzere bir vinil karbazolun elektrofilik siklizasyonunu içerdiğine düşünülmektedir (Reaksiyon Denklemi 33) (67).



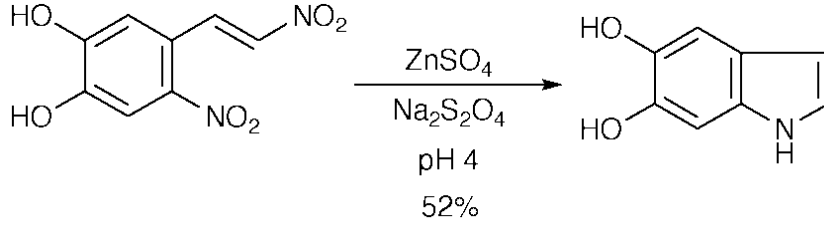
### Reaksiyon Denklemi 33

### 2.2.4. Redüktif Siklizasyon Reaksiyonları

Fischer indol sentezi, Madelung siklizasyonu ve sonucunda indol elde edilen birçok elektrofilik siklizasyonlar gibi, redüktif siklizasyonların da indol sentezinde önemli bir yeri vardır. Bu siklizasyon reaksiyonlarıyla ilgili son yıllarda çok sayıda gelişmeler olmuştur.

#### 2.2.4.1. $\alpha$ , $\beta$ - Dinitrostiren Redüktif Siklizasyonu

$\alpha$ ,  $\beta$ -dinitrostiren redüktif siklizasyonu çinko kontrolünde yapılamakta ve oldukça stabil olan 5,6-dihidroksiindollerin elde edilmesinde kullanılan bir reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 34) (68).



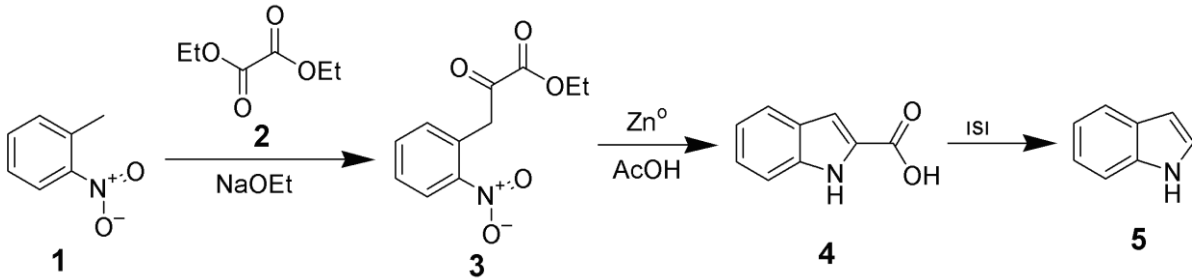
**Reaksiyon Denklemi 34**

### 2.2.4.2. Reissert İndol Sentezi

Reissert indol sentezi o-nitrotolüenden ve dietil oksalattan indol veya süstitüe indol (4 ve 5) sentezlemek için kullanılan kimyasal bir reaksiyondur (69).

Bu reaksiyonda potasyum etoksidin sodyum etoksite göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür (70).

Reissert indol sentezinde ilk basamak, etil o-nitrofenilpiruvat (3) oluşturmak üzere; o-nitrotolüenle (1) dietil oksalatın (2) kondenzasyonudur. (3)'ün asetik asit içindeki çinkoyla indirgenme siklizasyonu indol-2-karboksilik asiti (4) verir. Eğer istenirse, (4) ısı ile dekarboksile edilerek indol (5) elde edilebilir (Reaksiyon Denklemi 35).



**Reaksiyon Denklemi 35**

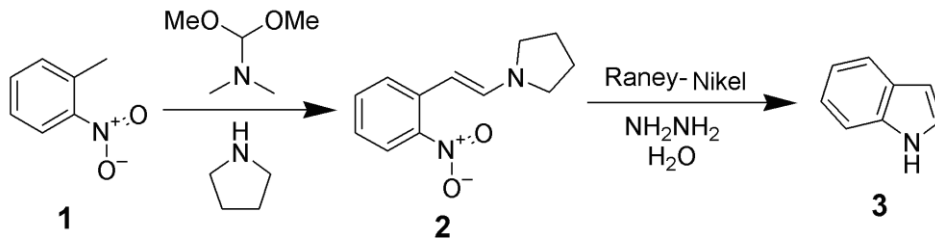
Ayrıca Reissert indol sentezi Shin ve ark.ları tarafından o-nitrofenilpirüvik asitin indol-2-karboksilik asite redüktif siklizasyonunu içeren bir dizi 2-etoksikarbonil-4-alkoksimetilindol sentezlemekte kullanılan bir reaksiyondur. Aynı zamanda Taga ve ark.ları da trisiklik indol türevleri sentezlemek için bu reaksiyon mekanizmasından yararlanmışır (71).

*o*-Nitrofenilasetik asitin veya oksiindol esterlerinin redüktif siklizasyonları Williams ve ark.ları tarafından 6-hidroksi-7-metoksiindole sentezlemek için kullanılmıştır (72).

### 2.2.4.3. Leimgruber-Batcho İndol Sentezi

Bu metod indol ve türevlerini sentezlemek için etkili bir yoldur. Patenti 1976 yılında alınan bu metodla indol türevleri yüksek verimle elde edilmektedir. Bu yöntem özellikle ilaç endüstrisinde kullanılmakta olup, birçok farmasötik ilaç özel süstitüe indollerini senezi için kullanılmaktadır.

The Leimgruber-Batcho indol sentezi, *o*-nitrotoluenden indol sentezlemek için kullanılan organik reaksiyondur (73). İlk basamakta, *N,N*-dimetilformamit dimetil asetal ve pirolidin kullanarak enamin oluşmakta (74) ve tasarlanan indol ikinci basamak olan indirgenme siklizasyonu reaksiyonu ile elde edilmektedir (Reaksiyon Denklemi 36).

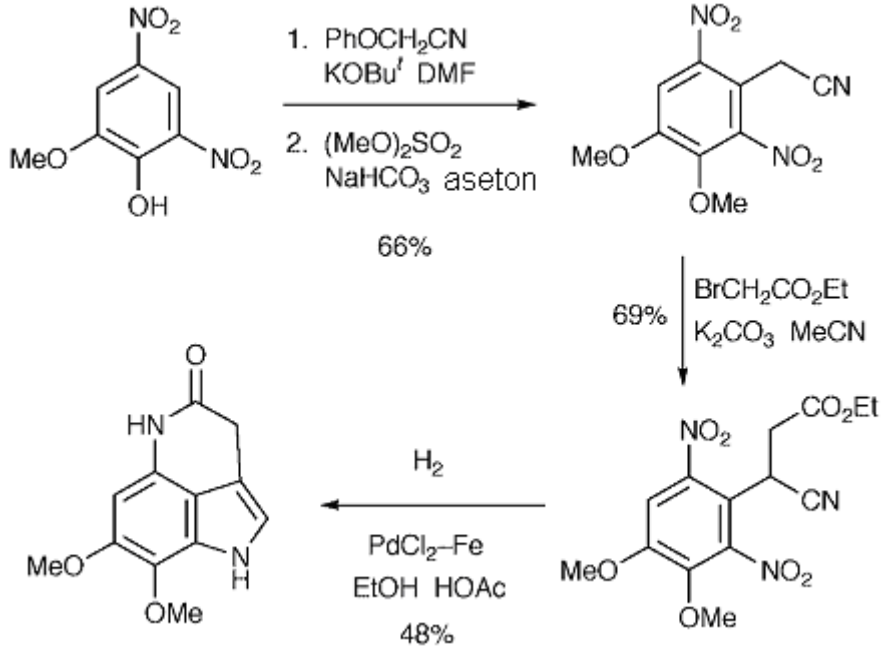


### Reaksiyon Denklemi 36

Yukarıda verilen reaksiyonda indirgenme siklizasyon reaksiyonu raney nikeli ve hidrazin ile tamamlanmıştır. Ayrıca palladium-karbon ve hidrojen, kalay klorür, sodyum ditionit (75) veya asetik asit (76) içindeki demir de etkili indirgeme ajanları olarak kullanılabilir.

#### 2.2.4.4. Makosa İndol Sentezi

Makosa bu sentez yöntemini bir dizi N-hidroksiindoller ve indoller sentezlemek için ve piroloiminokinolin alkaloitlerinin sentezinde kullanmak için birçok pirolo[4,3,2-*de*]kinolinler elde etmede kullanmıştır (Reaksiyon Denklemi 37) (77, 78).



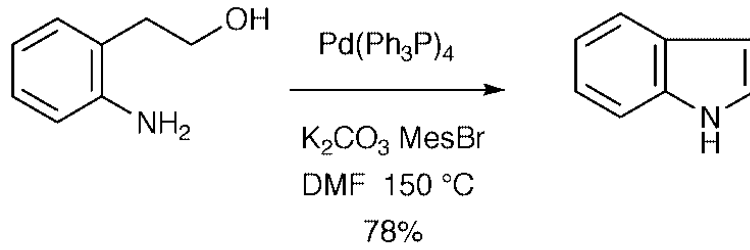
**Reaksiyon Denklemi 37**

Makosza aynı zamanda m-nitroanilin'in 4- ve 6-nitroindollerini sentezlemek için güçlü bazik şartlar altında ketonlarla yoğunlaşmasını açıklamıştır (79).

## 2.2.5. Oksidatif Siklizasyon Reaksiyonları

### 2.2.5.1. Watanabe İndol Sentezi

Watanabe indol sentezi metal katalizörlü olup, anilin ve glikolden ya da etanolaminlerden ve o-aminofenetil alkollerden indol sentezleyen bir yöntemdir (Reaksiyon Denklemi 38). Watanabe, Shim ve çalışma ark.ları bu reaksiyonu genişletmiş ve  $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$  katalizörlü ortamda N-alkilanilinlerin trietanolaminle reaksiyonu sonucu N-alkilindolleri sentezlemişlerdir. Bu N-alkilindollerden N-metilindol %78 ile sentez edilebilmiştir (80,81).

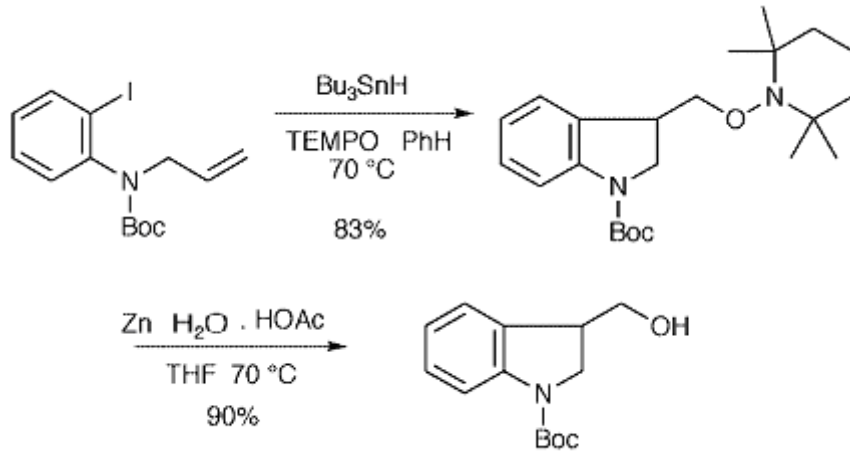


**Reaksiyon Denklemi 38**

## 2.2.6. Radikal Siklizasyon Reaksiyonları

### 2.2.6.1. Kalaylı Ortamda Siklizasyon

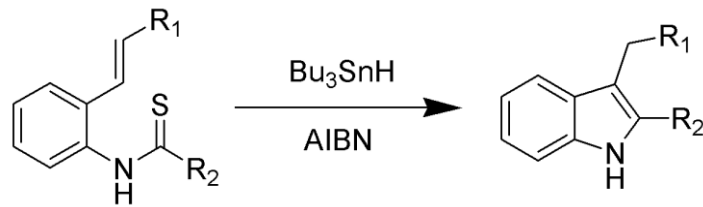
Boger kalay aracılı radikal siklizasyon reaksiyonlarına ilk öncülük eden kişi olmuştur. Özellikle CC-1065 bölgesinde ve düokarmisinin sentetik çalışmalarında bunu elde etmiştir (Reaksiyon Denklemi 39) (82,83).



**Reaksiyon Denklemi 39**

### 2.2.6.2. Fukuyama İndol Sentezi

Fukuyama indol sentezi alkenitiyoanilinlerden 2,3-disübsitüe indolerin sentezinde kullanılan bir reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 40) (84,85). Tributilhidrazin ve indirgenme ajanı azobisisobutironitril (AIBN) genellikle reaksiyonda kullanılır.

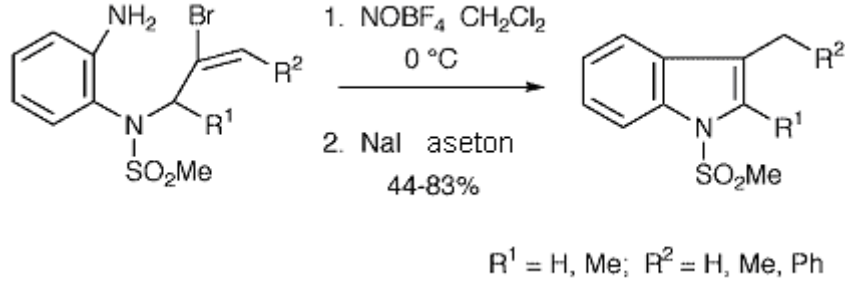


**Reaksiyon Denklemi 40**

Polisübsitüe indollerin sentezi için en kolay yöntemlerden birisidir. Özellikle doğal ürünlerin sentezinde (aspidofitin (86), vinblastin (87), sitriknin (88) gibi) kullanılmaktadır.

### 2.2.6.3. Murphy İndol-İndolin Sentezi

Murphy ve ark. ları indolin veya indol elde etmek için tetahiyafulvalen veya sodyum iyodür kullanılan radikal-polar çapraz geçiş kimyası içeren yeni bir radikal siklizasyon yöntemi bulmuşlardır (Reaksiyon Denklemi 41) (89, 90).

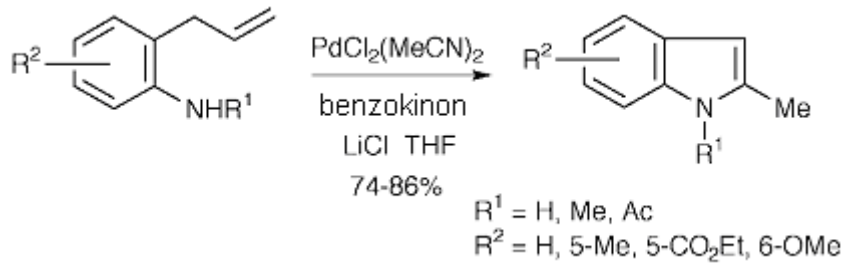


Reaksiyon Denklemi 41

### 2.2.7. Palladyumlu Ortamda Kimyasal Reaksiyonlar

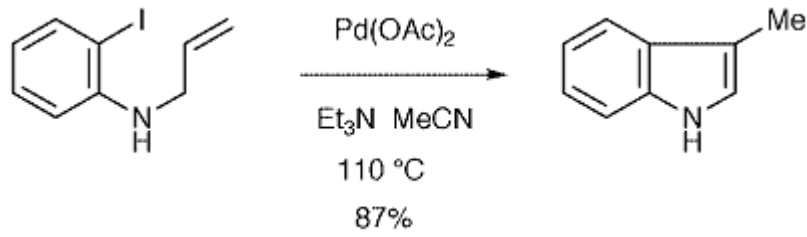
#### 2.2.7.1. Hegedus-Mori-Heck İndol Sentezi

İndol, oksiindol ve indolin sentezi Heck reaksiyonu adı verilerek ortaya konmuştur (91). Bu araştırmada paladyumun *o*-allilanilinlerin ve *N*-allil-*o*-haloanilinlerin indollere siklizasyonları üzerine etki ettiği bulunmuştur (Reaksiyon Denklemi 42,43) (92-95).



Reaksiyon Denklemi 42

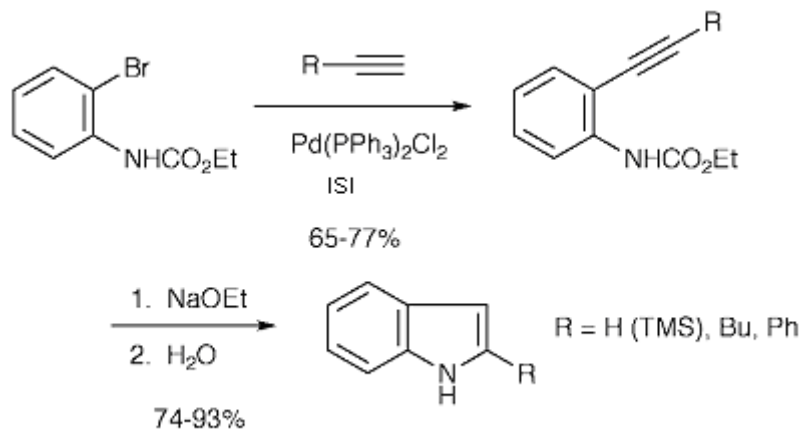




**Reaksiyon Denklemi 43**

### 2.2.7.2. Yamanaka–Sakamoto İndol Sentezi

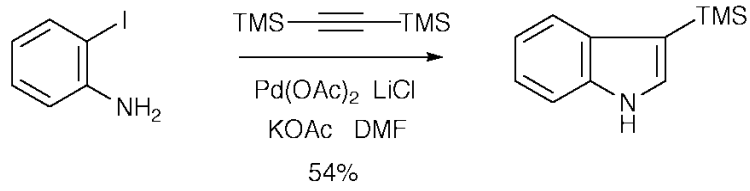
Yamanaka-Sakamoto indol sentezi paladyum katalizörlüğünde bir alken ile bir o-haloanilinindin indol oluşturmak üzere o-alkinilanilin elde etme yöntemidir (Reaksiyon Denklemi 44) (96).



**Reaksiyon Denklemi 44**

### 2.2.7.3. Larock İndol Sentezi

Larock indol sentezi o-haloanilinler ve alkinlerden hareketle indol elde eden paladyum katalizörlü bir basamakta gerçekleşen sentez yöntemidir (Reaksiyon Denklemi 45) (97).

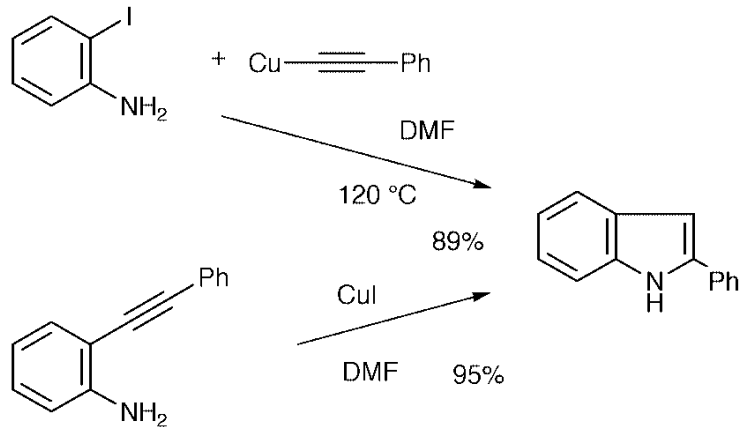


#### Reaksiyon Denklemi 45

### 2.2.8. Bakırlı Ortamda Kimyasal Reaksiyonlar

#### 2.2.8.1. Castro İndol Sentezi

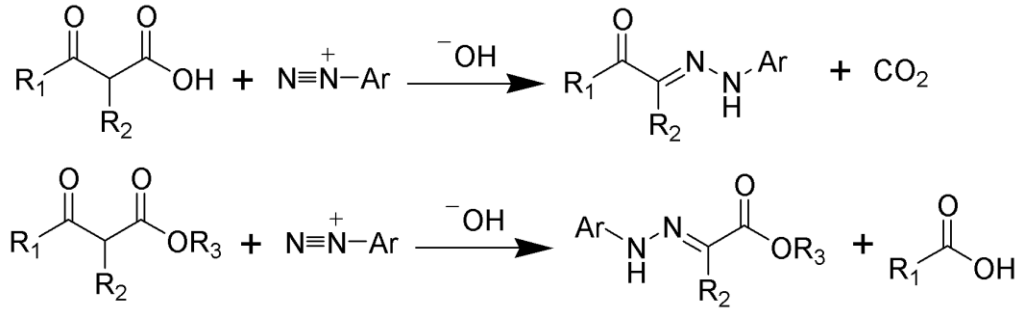
Castro ve ark. ları (98) indol elde etmek için metal katalizörlü o-alkinilanilinlerin siklizasyonunu içeren bunu da bakır kullanarak yapan bir reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 46).



#### Reaksiyon Denklemi 46

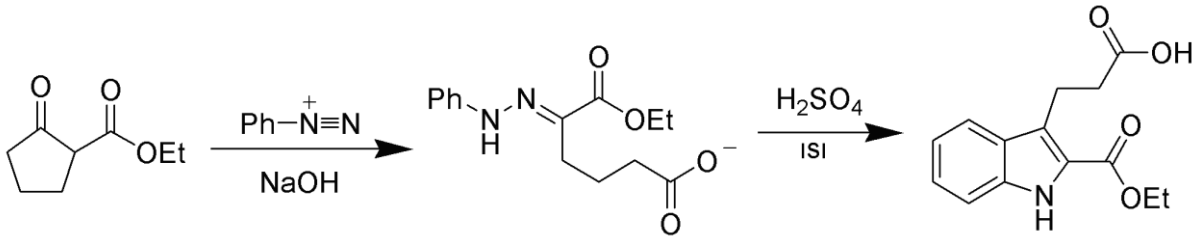
### 2.2.9. Japp-Klingemann İndol Sentezi

Japp-Klingemann reaksiyonu  $\beta$ -keto-asitlerden ( $\beta$ -keto-esterler) ve aril diazoniyum tuzlarından hidrazon sentezlemekte kullanılan bir kimyasal reaksiyondur (Reaksiyon Denklemi 47) (99-102). Reaksiyon, Francis Robert Japp ve Felix Klingemann kimyacılarından sonra adlandırılmıştır.



Reaksiyon Denklemi 47

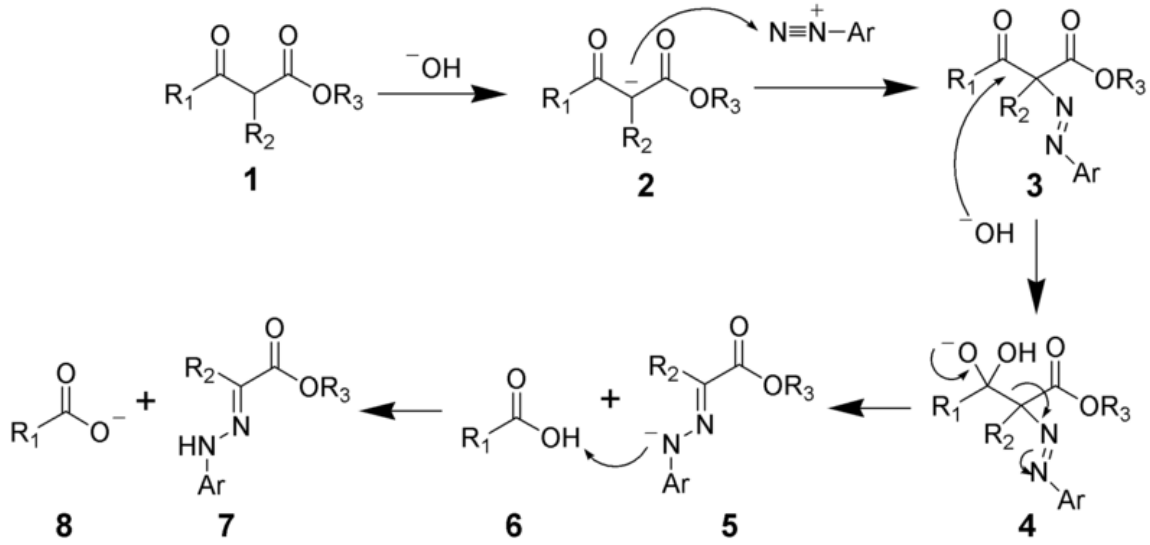
Japp-Klingemann reaksiyonunun hidrazon ürünleri genelde daha kompleks organik moleküllerin sentezlenmesinde ara ürün olarak kullanılmaktadır. Örneğin, bir fenilhidrazon ürünü kuvvetli bir asit varlığında ısıtılarak Fischer İndol sentezi üzerinden indol elde etmekte kullanılabilir (Reaksiyon Denklemi 48) (103, 104).



Reaksiyon Denklemi 48

Reaksiyon Mekanizması:

İlk basamak beta-keto-esterlerin deprotonizasyonudur. Enolat anyonunun 2 diazoniyum tuzuna nükleofilik katılması azo bileşiğini 3 sentezler. Ara ürün 3 nadir durumlarda izole edilebilmektedir. Çoğu durumda ara ürün 3' ün hidrolizi tetrahedral bir ara ürün 4 meydana getirmekte, bu da hızlıca karboksilik asite 6 dekompoze olmaktadır. Hidrojen değişiminden sonra da son ürün hidrazon 7 elde edilmektedir (Reaksiyon Denklemi 49).



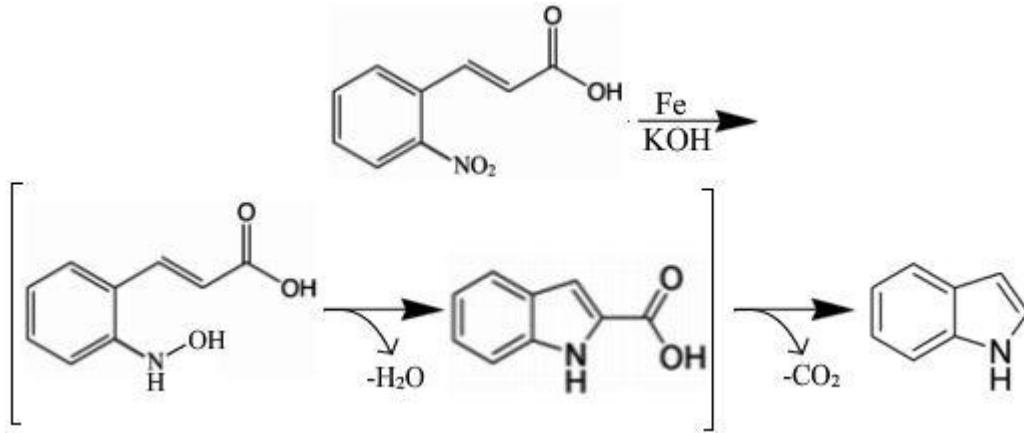
Reaksiyon Denklemi 49

### 2.2.10. Baeyer-Emmerling İndole Sentezi

Baeyer–Emmerling indol sentezi, kuvvetli bazik bir çözeltide sübstitüe veya nonsübstitüe *o*-nitrosinamik asitten ve demir tozundan hareketle indol elde etmekte kullanılan bir yöntemdir (Reaksiyon Denklemi 50). Bu reaksiyon 1869 yılında Adolf von Baeyer ve A. Emmerling tarafından bulunmuştur (105).

Demir ile *o*-nitrosinamik asitin reaksiyonunda ilk olarak sübstitüe hidroksilamin elde edilir. Daha sonra ara ürün olan hidroksilamin, indol-2-karboksilik asit ürününü vermek üzere

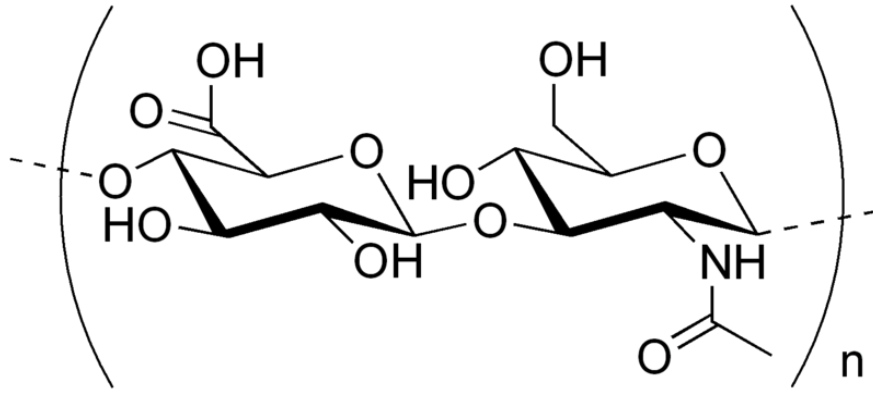
birinci konumdaki 2 numaralı karbon atomuna kondense olur. Bu esnada su dışarı verilir. Oluşan bu karboksilik asit indol elde etmek üzere dekarboksile olabilir.



**Reaksiyon Denklemi 50**

### 2.3. Hiyaluronik Asitin Özellikleri, Sentezi ve Yıkımı

HA (hiyaluronik asit, hiyaluronan, hiyaluronat,) parlak ve transparan görüntüsünden dolayı Yunanca cam anlamına gelen “hyalos” kelimesinden türetilmiş bir terimdir. HA lineer polisakkaritlerden oluşan bir GAG'dır. Bu polisakkaritler tekrarlanan bölümler halinde birbirine bağlanmış D-glukuronik asit (GlcA) ve *N*-asetil-D-glukozamin (GlcNac) monosakkaritlerinin birbiri ardı sıra dizilmesiyle oluşur (Formül 4) (1, 4) .



Formül 4

Hiyaluronik asitin molekül ağırlığı  $2 \times 10^5 - 10 \times 10^7$  Da kadardır. Uzunluğu 2-25  $\mu\text{m}$  dir (4). Düşük molekül ağırlıklı olanları sayısız biyolojik olaylarda rol almakta ve seviyeleri embriyoenez sırasında (106), hücre göçlerinde, yara iyileşmesinde (107), tümör başlangıcında (108), malin göçlerde ve doku kayıplarında artmaktadır. Diğer GAG'lardan farkı; sülfatlanmamış olması ve proteinlere kovalan olarak bağlı olmamasıdır. HA proteinlere iyonik olarak bağlanır. Ayrıca diğer GAG'lardan bir farkı da sentezinin plazma membranının iç yüzünde olmasıdır. Serbest bir polimerdir ve hiçbir protein zarfına ihtiyaç duymaz. Oysaki GAG'ların sentezi golgi enzimleriyle gerçekleşir ve protein zarflarına kovalan olarak bağlanırlar.

Morfolojik başlangıcın ilk aşamalarında, hücre büyüme ve gelişiminin ilerlediği durumlarda HA'in seviyesi artmaktadır (109).

Vücudumuzda birçok biyolojik olaydan sorumlu olan HA eklemlerin sinoviyal sıvılarında, gözün hümör aközünde, kordon kanında ve gevşek bağ dokusunda bulunur. Genel olarak sinir doku, bağ doku, epitelyum dokularında genişçe yayılmıştır.

Tükürükte de bulunan HA'in paratiroid sıvısında yüksek molekül ağırlıklı formları ( $\geq 200.000$  kDa) bulunur (110).

HA, eklemlerde kayganlığı sağlayan, darbelerin etkisini azaltan ve organizmayı bakteri ile diğer mikroorganizmalara karşı koruyan bir yapı olup, ekstraselüler matriksin en büyük bileşenlerinden biridir. Hücrenin adezyon, migrasyon ve proliferasyonunda, inflamasyon cevaplarında rol alırken, aynı zamanda bazı malign tümörlerin gelişmesiyle de ilişkilidir.

Ortalama 70 kg ağırlığında bir bireyin vücudunda 15 gram HA bulunur. Sağlıklı bir bireyde bu miktarın üçte biri her gün yıkılıp yeniden sentezlenir (111).

HA cildi gergin tutucu ve gerdirici özelliklerinden dolayı, en çok tercih edilen dolgu maddesidir. Ayrıca ciltteki kolojen üretimi ve yeniden yapılanma da HA sayesinde hızlanır. Kendi hacminden bin kat fazla su tutabildiği için enjeksiyon edildiği yerde uzun süre şeklini muhafaza edebilir.

Ayrıca HA, dokuların onarımında da rol oynayan derinin major bir komponentidir. Deri, UV ışınlarına aşırı derecede maruz kalınca oluşan deri yanıkları; hücrelerdeki dermis tabakasının HA sentezlemesini durdururken aynı zamanda yıkım hızını da arttırmaktadır. Yıkım ürünleri UV ışınlarına maruz kalınca da artış göstermektedir (112).

HA'nın moleküler düzeyde üç görevi vardır (4). İlki hücre yüzeyinde HA reseptörlerini otokrin tarzda aynı hücre gibi etkilerken, ikinci görevi komşu hücreleri ekstraselüler matriks (ECM) moleküllerinin çeşitliliği ile parakrin tarzda etkilemektir. Bir HA polimeri yüzlerce ECM proteinine bağlanabilir. Üçüncü görevi ise; depolanan HA'nın daha sonra birçok hücre yüzey reseptörleri ile etkileşebilmesidir. Bu reseptörler CD44, hiyaluronan aracılı motilite reseptörü (RHAMM), lenfatik damar endotelial HA reseptörü (LYVE-1), endositozis için reseptör (HARE), karaciğer endotelial hücre reseptörü (LEC) ve TLR-4. Bu etkileşimler üç fizyolojik olayı yönetmektedir. Sinyal transdüksiyonu, periselüler tabakanın formasyonu ve reseptör aracılı internalizasyondur (113-118).

Hayvanlar üzerinde yapılan birçok deneyde epitelyal ve bağ doku kanserlerinin HA'nın yüksek seviyesiyle ilişkilendirilmektedir (116, 119, 120). İnsan kanserlerinde, HA konsantrasyonları genelde normal hücrelerdekine oranla daha yüksek seviyelerdedir. Göğüs, akciğer, prostat, over, nefroblastom ve kolon kanserlerinin HA ile kuvvetlendiği dikkate alınmalıdır (116, 121, 122). Bu tümörlerde HA hücre büyümesini; tümör hücrelerinin çoğalmasını uyarmakla sürdürmektedir. Ayrıca tümör metastazını da ilerleten HA, bunu tümör hücrelerinin adhezyon ve göçünü tetiklemekle yapmaktadır (120, 123).

HA'nın sentezi, hücrelerdeki endoplazmik retikulum ve golgide gerçekleşir. Bir integral membran protein sınıfına ait olan HAS enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzimin 3 formu vardır: HAS1, HAS2, HAS3. Bunlar glikoziltransferaz izoenzimleridir. Bu enzimlerin

aktif kısımları plazma membranının iç yüzünden çıkıntı yapmış durumdadır. HA, sentezlendiği sırada plazma membranından hücre yüzeyine veya ECM'in içine çekilir. Bu olayda bu izoenzimler tektir ve iki enzimatik bileşene sahiptirler. Bunlardan biri GlcUA'ya eklenirken; diğeri de GlcNAc'ye eklenmektedir. Bu izoenzimlerin amino asit dizilim sıraları %50-71 kadar aynıdır, fakat genlerin kromozom sıraları farklı kromozomlar üzerine yerleşmiştir (*hCh19-HAS1*, *hCh8-HAS2*, *hCh16-HAS3*). Bunlar farklı proteini kodlar ve farklı enzimatik özelliklere sahiptirler. HAS3, HA'in daha kısa formlarını ( $\leq 3 \times 10^5$  Da) sentezler ve HAS1 ile HAS2'den daha aktif olduğu düşünülmektedir. HAS1 ve HAS2 daha yüksek molekül ağırlıklı ( $3.9 \times 10^6$  Da) HA moleküllerini sentezlerler.

HA, endoglikozidaz, hiyalüronidaz ve iki ekzoglikozidaz olan beta-glukoluronidaz ve beta-N-asetilglukozamidaz ile yıkılır (124). Bunlardan en önemlisi hiyalüronidaz enzimidir.

Hiyaluronidaz enzimi,  $\beta$ -1-4-endoglukozamidaz enzim ailesinin ekstraselüler matriks degradasyon enzimidir. HA'yı küçük molekül ağırlıklı sakaritlere parçalamaktadır (125).

Hücre düzeyinde HA'yı yıkan iki enzim vardır. Hiyaluronidaz 1 (Hyal 1) ve Hiyaluronidaz 2 (Hyal 2). Hyal 1'in kayıtlarda bulunan altı parçası vardır. Bunların üçü 3p21.3, diğeri üçü 7q31.3 kromozomları üzerinde yerleşmişlerdir (126, 127). Bir çok memeli türünün Hyal 1 aktivitesini yok ettiği bildirilmektedir (128). Bu da Hyal 1'in önemli bir enzim olmadığı fikrini getirmiştir ve diğeri hiyalüronidazların Hyal 1'in yerini tutabileceği sanılmaktadır.

Hyal enzimleri baskın olarak HA'yı yıktıkları gibi, kondroitin ve kondroitin sülfatları da belirli bir seviyede yıka kabiliyetleri vardır. Vertebral dokularda düşük konsantrasyonlarda belirirler. İnsan serumunda seviyeleri 60 ng/ml gibi düşük bir değerde olmasına rağmen yüksek, seçici aktivitelere sahiptirler (6). Hyal 2 aktivitesi hücre yüzeyinde normal, sağlıklı hücrelerle sınırlanmıştır. Bu durum ECM'nin bütünlüğünü korumaktadır. CD44, Hyal 2 ve  $\text{Na}^+$   $\text{H}^-$  dönüşümü kombinasyonu hücre yüzeyindeki lipid tabakalarıyla kompleks oluşturması sonucu yüksek molekül ağırlıklı HA'ya bağlanabilmektedirler (129). Hyal 2'nin baskılanması, astrositoma hücrelerinde tümör oluşumunu hızlandırır (130).



## 2.4. Hiyaluronik Asitin Medikal Kullanımları

HA birçok organizmada önemli, fizyolojik rol oynar. Biyomedikal uygulamalarda kullanımları yaygındır (131-134).

HA tercih edilen bir polimer materyaldir. Çünkü basit şekerlere yıkılabilen doğal bir üründür. Nem çekici ve viskoelastik doğası ile HA, medikal ve farmasötük uygulamalarda kullanılmaktadır (4).

HA osteoartritte, cerrahide ve yara iyileşmesinde, embriyo implantasyonlarında ve hastalık belirteci olarak medikal ve farmasötik alanda kullanılmaktadır. Ayrıca, dizdeki osteoartrit tedavisinde kullanılmaktadır (135).

Osteoartritli hastalarda etkilenen eklemlerde HA azalmış konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Oral yoldan iyi absorbe edilemediği için intraartiküler yoldan uygulanan HA'nın değişik yollarla etki ettiği düşünülmektedir. HA'in viskoelastikliği eklemlerin kayganlığı ve mekanik desteğinden sorumludur. Osteoartritlik eklemlerde, HA'in molekül ağırlığı ve konsantrasyonu pro-inflamatör sitokinlerin ve serbest radikallerin sonucu olara azalabilmektedir (136,137). Sinoviyal sıvıdaki elastikliğin değişimi eklemlerdeki problemlerle sonuçlanmaktadır. HA'in eklem içine enjeksiyonu birçok ülkede (Amerika, Kanada, Japonya ve bazı Avrupa ülkeleri) uygun bulunmaktadır. Kullanılan ürünler uygulamada değişik molekül ağırlıklı sodyum HA içermektedirler. Örnek olarak Hyalgan (Fidia, İtalya), Artz (Sekagaku, Japonya) ve Orthovisc (Arika, Amerika) verilebilir.

HA'in enjeksiyonluk preparatlarının osteoartritlik eklemlerdeki terapötik etkileri *in vitro*, *in vivo* ve kliniksel olarak yaygın şekilde yapılmaktadır (138,139,140). Bu çalışmaların sonucu HA'in kıkırdak bozulmasını baskıladığına, eklem kıkırdağının yüzeyini koruduğuna, sinoviyal sıvının özelliklerini normale döndürdüğüne ve acı duyusunu azalttığına işaret etmektedir. Osteoartritte HA'in analjezik etkisinin kortikosteroidlerle ve nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlarla karşılaştırılabilir düzeyde olduğu veya daha üstün olduğu literatürde kayıtlıdır (138,141). Buna rağmen HA'in buradaki etki mekanizması tam olarak açıklanmamıştır (142). Birçok araştırmacı HA'in mekanik ve kayganlaştırıcı destek verdiğini ve eklem dokularını molekül ağırlığından bağımsız olarak viskozluk (*viscosupplementation*, *viscoaugmentation*, *viscoprotection*) özellikleri sayesinde koruduğunu söylemektedirler. HA'in farmakolojik özelliği de antiinflamatuvar ve immün sistemi koruyucu etkisiyle ilişkilendirilebilir.

HA'nın ilk tıbbi ürünü 1970 ve 1980 yıllarında Pharmacia firması tarafından geliştirilen HEALON® adlı müstahzardır. Bu; göz cerrahisinde doku iyileşmesini teşvik etmek amacıyla üretilmiştir.

HA göz cerrahisinde yapay intraoküler lenslerin ve diğer ticari ürünlerin gözün içine yerleştirilmesinde birleştirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca HA, cerrahi prosedürlerde viskoelastik jel olarak cerrahi yaraların iyileşmesine yardımcı olmak için de kullanılmaktadır. Katarakt ameliyatlarında HA jelleri ameliyat boşluğunu sürdürmek, korneanın endotelial tabakasını ve diğer dokuları fiziksel hasardan korumak (bunu kaydırıcı olarak davranmalarıyla sağlarlar) için kullanılmaktadırlar (143). Bunun yanında HA'nın korneal, diyabetik ayak, tendon, kemik, nazal mukozal ve venöz bacak ülser yara iyileşmelerinde de önemi bulunmaktadır (134, 144). Miyazaki ve ark. (145) 1996 yılında yayınladıkları bir çalışmada HA'in korneal yara iyileşmesini hızlandırdığını, bunu da korneal epitelyumal hücrelerin büyümesini ilerletme kabiliyetine bağlanmaktadırlar. Bunun yanında HA genel cerrahide yapışmayı ve hasarı önleyici ilaç olarak kullanılmaktadır. İnflamasyonlu vücut hücreleri üzerine antioksidan olarak etki eder, vücut hücrelerini serbest radikallerin hasarından korur, immün sistemi germ ve virüslerin hücreler arası hareketini ve hücreler içine girişlerini engelleyerek güçlendirir. Ayrıca HA'nın alveoler yaralanmanın ardından yapılan inhalasyonda nötrofil elastazlarının miktarını azalttığı da rapor edilmektedir (134). Bu koruma mekanizmasının HA ve akciğer elastik fibrilleri arasındaki spesifik bağlanmasına dayandığı düşünülmektedir. Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber özetle HA kornea transplantasyonu, katarakt ameliyatı, glokom ameliyatı ve retinal ayırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

HA'in ovülasyon sırasındaki yüksek konsantrasyonu embriyonik gelişimin döllenme önceki döneminde fonksiyonu olduğu görüşünü ortaya koymuştur. İn vivo döllenme için kültür ortamında HA'in albuminle yer değiştirme için uygun olduğu görülmüştür (146).

Diş hekimliğinde de kullanım alanı olan HA, temporomandibular eklemden bağlantı yerlerindeki semptomları azaltmada enjeksiyon yoluyla verilerek kullanılmaktadır (147).

Prostat ve göğüs kanserinde tümör marker olarak kullanılmaktadır. Hastalıkların gelişiminin izlenmesinde rol oynamaktadır. HA birçok şekilde kan dolaşımında ve lenfatik sistemde serbestçe dolaşmakta ve ECM ile gevşek olarak karşılıklı etkileşmektedir. Normalde HA düşük konsantrasyonlarda kan dolaşımında bulunmaktayken dokularda miktarı artmaktadır. Yara iyileşmesinin çok erken aşamalarında ortaya çıkmaktadır (148, 149). HA'in dolaşımında hızla yükselmesi strese bağlı olarak, kan kaybında, şoklarda,

iskemik darbelerde ve ağır travmayı takiben görülen kan zehirlenmelerinde, büyük cerrahi girişimlerde ve geniş yanıklarda belirir (150, 151, 152). HA'nın serumda artışı karaciğer sirozu ve fibrozunun, diz osteoartritin ve karaciğer transplantasyon reddinin en erken belirteçlerinden biridir. HA artışı büyük yaralanmalarda ve birçok hastalıkta hayati bir mekanizmayla hızlı bir cevap sağlamaktadır (151). Bir biyomarker olan HA görüntüleme ilaçlarının kullanıldığı hastalıklarda ve yaralanmalarda ortaya çıkan değişimleri belirlemede etkin olarak klinikte kullanılmaktadır.

Diğer bir kullanım alanı kozmetik ürünlerdir. HA'nın kozmetik ürünlerde kullanımı nemlendirici, kırışıklık giderici, gerdirici özelliğinden dolayıdır. Gözle görülür derecede cildin üst katmanlarının sıkışmasını sağlar. İnce çizgiler hemen düzgünleşir ve ince dudakların dolgunlaştırılmasında kullanılır. Aynı zamanda da antiinflamatuvar etkisi ile göz torbalarını yok eder. Botoksta kullanılan botulinum toksini yerine tercih edilen HA'nın enjeksiyon formları vardır. HA'nın tüm canlı organizmalarda bulunan bir madde olması da tercih edilme nedenidir.

2003 yılında yumuşak doku hasarlarını doldurmak için hiyaluronik asit enjeksiyon formu olarak piyasaya çıkan RESTYLANE® son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Hiyaluronik asit içeren diğer kozmetik ürünler ise; PERLANE®, HYALOFORM®, PURAGEN® dir.

## 2.5. Hiyaluronidaz Enzimi, Biyolojisi ve Tedavi Edici Özellikleri

Hiyaluronidaz enzimi, ilk kez 1928 yılında insan ve hayvanların testikular ekstraktlarında viral ajanların yayılmasını arttırıcı etkisi üzerine yapılan bir çalışma ile tespit edilmiştir (153).

Daha sonra hiyaluronan enzimi olarak tanımlanmış, günümüzde ise hiyaluronidaz adını almıştır.

1947 yılında Fishman ve ark. ları testislerde bulunan bu enzim ile tümör hücrelerinde aynı enzimin bulunduğunu göstermişlerdir (154).

1971 yılında Meyer (155) hiyalüronidaz enzimini biyokimyasal analizlerine ve üretilen son ürünlerine göre üç gruba ayırmaktadır.

1. Memeli hiyaluronidazı (testis tipi): Bu endo-beta-N-asetilhekzoaminidaz'dır.
2. Hiyaluronat-3-glikanohidrolaz: Bu endo-beta-D-glukuronidaz'dır.
3. Mikrobiyal hiyaluornidaz: Bu sınıftaki enzimler bir ve ikinci gruptakilerden farklı olarak aktivitelerini gösterirken hidroliz aşamasını kullanmazlar.

Hiyaluronidaz enzimi pH'larına göre de sınıflandırılabilirler:

\_Asit aktif hiyaluronidazlar pH 3-4 arasında aktiftir. Bu insan karaciğeri ve serum hiyaluronidazını içemektedir.

\_Nötral aktif hiyaluronidazlar pH 5-8 arasında aktiftir. Ph 20 de de aktiflik vardır. Bunlar yılan ve arı venomu hiyaluronidazlarıdır (111, 156, 157).

Transforme büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) proteinleri, embriyojenez, ekstraselüler matriks protein sentezi, hücre çoğalması ve ölümü, immün hücrelerinin fonksiyonlarının yenilenmesi gibi çok sayıdaki biyolojik olaylarla hiyaluronidaz enzimi ilişkilidir (158-160).

Hiyaluronidaz enzimi, hiyaluronik asitin hücre yüzeyine bağlanması için gerekli olan ve kanserli hücrelerin metastazında rol oynayan CD44 proteinini de modüle etmektedir.

Hiyaluronidaz enzimi endometriyum, ovaryum, meme kanserlerinin metastazını arttırırken, prostat kanserinin ilerlemesine neden olmaktadır. Ayrıca tümör hücrelerinde *in vivo* anjiyojenezini tetiklediği bildirilmektedir (7, 8, 161).

## 2.6 Hiyaluronidaz Enziminin Kanseri Gelişimi Üzerindeki Rolü

Tümör uzun yıllardır çare aranan klinik bir olgudur. Tarih boyunca insanlar diğer hastalıklara karşı olduğu gibi kansere karşı da ilaç geliştirmek için uğraş vermişler ve vermeye de devam etmektedirler. Tedaviye giren ilaçlar ile bazı kanser türlerine karşı başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen kanser metastazı önemini hala devam ettirmektedir.

Metastaz; normal konakçı hücrelerinin küçük lenfatik veya vasküler kanallardaki invazyon ve infiltrasyonu penetrasyon ile olmaktadır. Tümör hücrelerinin yayılması tek ya da küme halindeki hücrelerin sirkülasyona girmesi ile gerçekleşir. Yayılma işlemi sirkülasyondan kurtularak devam eder. Bu hücreler uzak organlar tarafından yakalanır. Lenfatik veya kan damarı hücre duvarlarına penetrasyona bağlı olarak da tümör hücrelerinin yayılması gerçekleşir. Bu bilgiler ışığında, kanser tedavisinde ve teşhisinde hiyaluronidaz enziminin varlığının göz önünde tutulması gerektiği fikri ileri sürülebilir.

Sonuç olarak, hiyaluronidaz inhibitörlerinin kanser tedavisi için yeni terapötik ajanlar olarak kullanılması mümkün görülmektedir.

## 2.7. Doğal ve Sentetik Hiyaluronidaz Enzim İnhibitörü Bileşikler

TNP-470, Marimastat, SU5416 gibi doğal ve sentetik bileşiklerin antihiyaluronidaz aktiviteye sahip oldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (11-13).

Apigenin'in, doğal kaynaklı hiyaluronidaz inhibitörü ve anjiyogenez inhibitörü olduğu literatürde bildirilmektedir (14,15).

Heparin de HA'yı yarışmasız bir mekanizmayla inhibe ederken enzimin katalitik kısmına bağlanmayan bir hiyaluronidaz enzim inhibitörüdür. Düşük konsantrasyonlarda heparin, venom hiyaluronidazını kemik hiyaluronidazına oranla daha fazla inhibe etmektedir (162). Aynı zamanda heparin sülfat ve dermatan sülfat da insan serum ve venom hiyaluronidazını inhibe eden bileşikler arasındadır (163-165). Ayrıca polisakkaritler, aljinik asit, pektin, kumarin, kurkumin (166), GAG'lar, flavonoidler (167-169), antioksidanlar (164 ), glisirizin, alkaloidler (164,170), saponinler hiyaluronidaz enzimini inhibe etmektedirler.

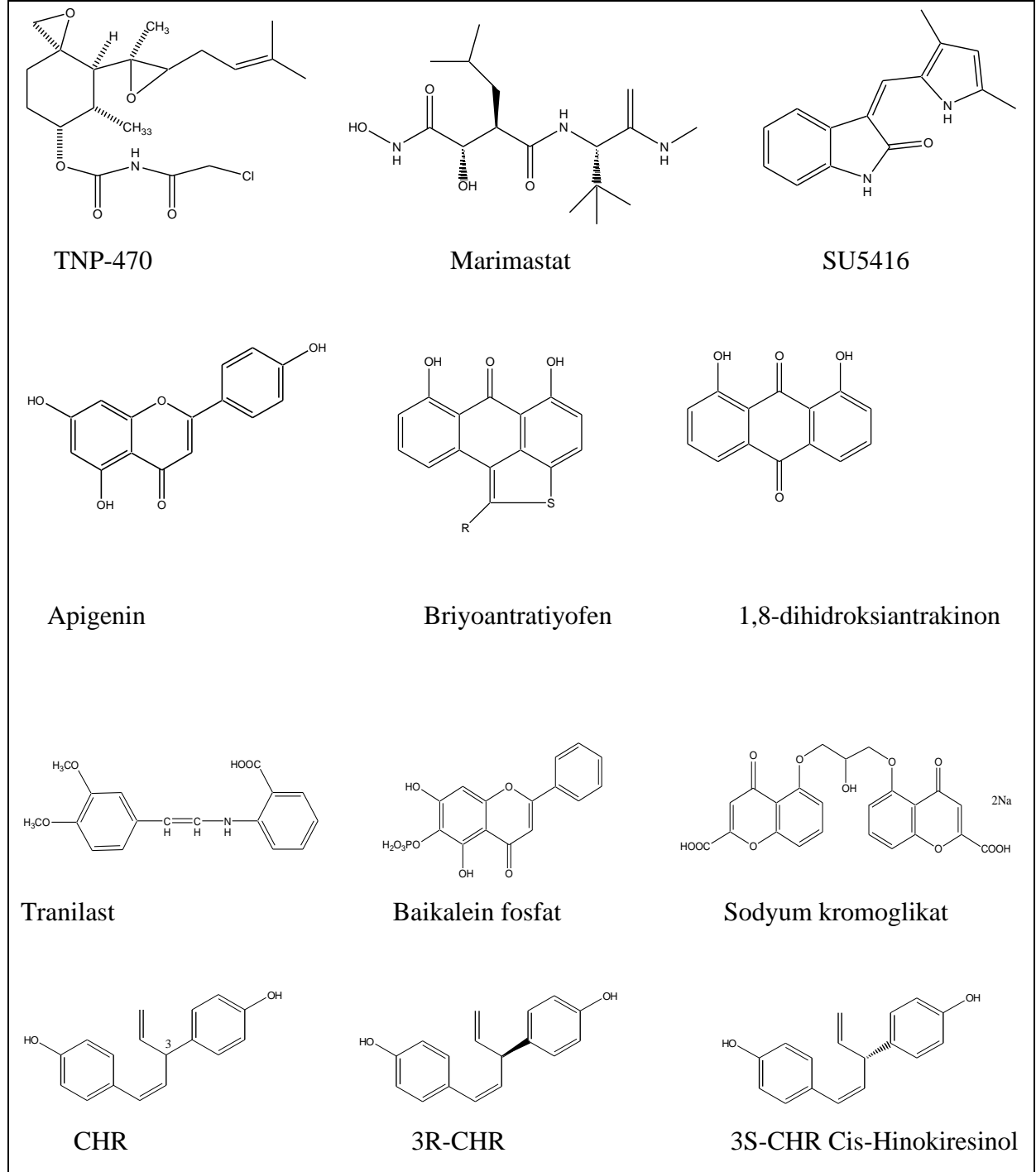
Antialerjik bileşik olan tranilast, trakson, baikalein fosfat ve sodyum kromoglikat, kortizon ve dezoksikortikosteron asetat, kortikotropin, kükörük asit, dekstran sülfat gibi bileşiklerinde antihiyaluronidaz aktiviteye sahip oldukları literatürde kayıtlıdır (171, 172).

Polidietilstilbestrol fosfat ve polimerik fosfatlardan olan dinesterol, hekzasterol ve benzasterolün de antihiyaluronidaz aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (173).

CHR (cis-Hinokiresinol)'de hiyaluronidaz enzim inhibitörü etkiye sahip bir bileşiktir (174).

Briyoantratiyofen, 5,7- dihidroksi-1-metoksikarbonil-6- okso-6*H*-antra(1,9-bc)tiyofen ve 1,8-dihidroksiantrakinon doğal bileşiklerinin anjiyogenez inhibitörü aktiviteye sahip oldukları ve bu bileşiklerden 1,8-dihidroksiantrakinon bileşiğinin Bovin Aortic Endothelial Cell (BAEC) kanser hücrelerinde en önemli antianjiyogenik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (175).

Çizelge 1: Doğal ve sentetik hiyaluronidaz enzmi inhibitörü bazı bileşikler



Kanser tedavisi için çok ciddi miktarda bütçelerin harcandığı bilinmektedir. Ayrıca bütün bu büyük harcamalara karşın kanser, kesin tedavi ile sonuçlanan hastalıklar arasında yer almamaktadır. Çok sayıda araştırma grupları yeni ilaç molekülü geliştirme çabalarını sürdürmektedir.

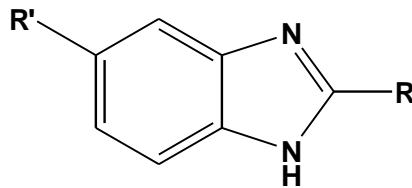
Çalışma grubumuzda bu konuda üzerinde yaptığı çalışmalarda indol ana yapısı taşıyan bileşikler üzerinde araştırmalar yapmaktadır.

Bu araştırmaların indol ana yapısı üzerinde sürdürülme nedenleri;

- Bu yapıların yaşam için gerekli olan biyolojik moleküllerin yapısında yer alması ve bu moleküllerin biyolojik fonksiyonların yürütülmesinde anahtar rolü oynadığının belirlenmiş olmasıdır.

- Üzerinde birçok çalışma yapılmış olan ve halen antineoplastik (vinblastin sülfat, vinkristin sülfat, vinorelbin ditartarat, lanreotid), antiemetik (tropisetron HCl), antihiperkolesterol (fluvastatin sodyum), antihipertansif (indapamid), antiinflamatuvar (indometazin, asemetazin,), antiaritmik (pindolol), antimigren (eletriptan HBr, naratriptan HCl, rizatriptan, sumatriptan), etkileri nedeni ile kullanılmakta olan bazı ilaçların da (176) yapısında yer alan indol halka sisteminin canlı organizmanın tanıdığı bir yapı olmasıdır.

2007 ve 2008 yıllarında grubumuz tarafından, 2-süstitüe benzimidazol (Formül 5), benzimidazol, benzotiyazol ve indol türevi bir grup bileşiğin *in vitro* antihyaluronidaz aktivitesi araştırılmıştır.



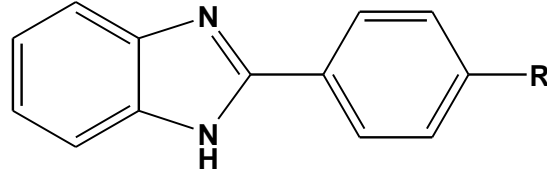
**Formül 5**

**R=** Hidrojen, metil, etil, hidroksimetil, merkaptometil, aminometil

**R'=**Hidrojen, metil, klor



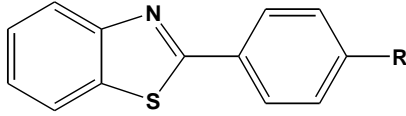
Daha sonra 2-aril süstitüe türevleri sentezlenip (Formül 6) aktivitelerine bakılmış ve aktivitenin 2-alkil süstitüsyonuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (10,177).



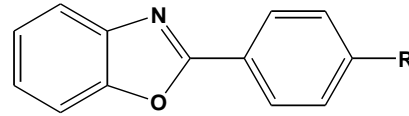
**Formül 6**

**R=** Hidrojen, fluor, metoksi

Aktivitenin ana halkadan mı yoksa hetero atomdan mı kaynaklandığını tespit etmek için benzotiyazol (Formül 7) ve benzoksazol (Formül 8) türevi bileşiklerin aktivitelerine bakılmış fakat 2-aril süstitüsyonundaki aktiviteden yüksek aktivite gözlenmemiştir (10, 177).



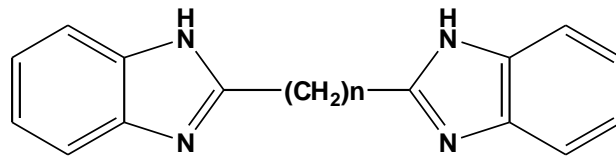
**Formül 7**



**Formül 8**

**R=** Hidrojen, metoksi

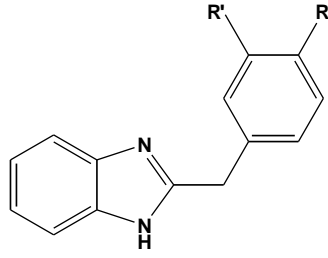
Bunlara paralel olarak sürdürülen bisbenzimidazol türevlerinde ise (Formül 9) aradaki karbon köprüsüne bağlı olduğu düşünölen yüksek aktivite gözlenmiştir. Bu aktivitenin özellikle  $n=1$  türevlerinde olması, halkalar arasındaki bir tane karbonun önemini düşündürmektedir (10).



**Formül 9**

**n=** 0,1,2

2. konuma bağılı alkil köprüsü üzerinden bağlanan benzil türevi bileşiklerin de yüksek aktivite göstereceği fikrinin savunulmasını sağlamıştır. Fakat 2-benzil türevinde aktivitenin düşük olması bu yaklaşımın doğru olmadığını göstermiştir (Formül 10) (177).

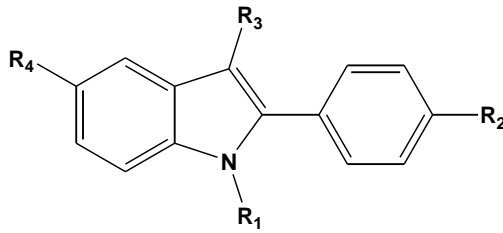


**R=** Hidrojen, metoksi

**R'=** Hidrojen, metoksi

**Formül 10**

Sonra biyoizoster olan indol üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Formül 11). Bu moleküllerin bisbenzimidazollerden daha düşük olmakla birlikte aktivitelerinin olduğu gözlenmiştir (177).



**R<sub>1</sub>**= Hidrojen, metil

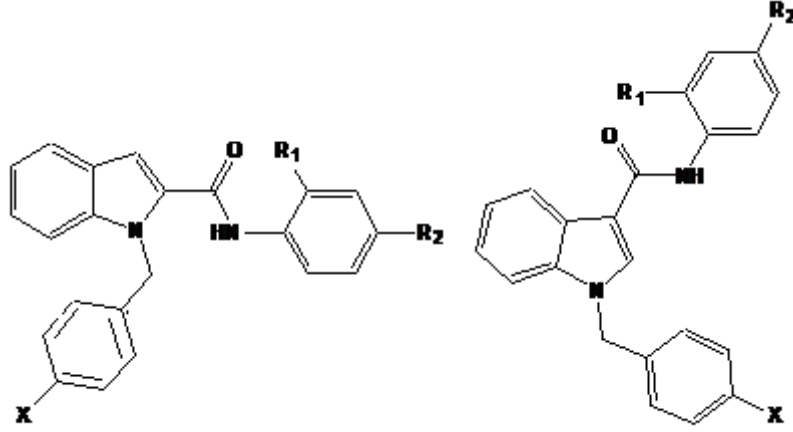
**R<sub>2</sub>**= Hidrojen, hidroksil

**R<sub>3</sub>**= Hidrojen, metil , fenil

**R<sub>4</sub>**= Hidrojen, metil

**Formül 11**

Yine indol halkasının 1,2 ve 1,3 disüstitüe türevlerinde antihiyaluronidaz aktiviteye bakılmıştır (Formül 1) . İndol-2- ile indol-3-karboksamit türevlerinin antihiyaluronidaz aktiviteleri araştırılmış ve indol azotuna bağlı p-fluoro veya klorobenzil grubu taşıyan bileşiklerin en aktif bileşikler olduğu bildirilmiştir (10).



<u>X</u>	<u>R1</u>	<u>R2</u>
H, F	H, F, Cl	H, F, Cl

**Formül 1**

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Kimyasal Çalışmalar

#### 3.1.1. Materyal

Çalışmada kullanılan tüm çözücüler (Merck) teknik ya da analitik niteliktedir. Sentez başlangıcı maddeleri olarak fenilhidrazin hidroklorür (Merck), propiyofenon (Aldrich), trikloroasetik asit (Aldrich), *p*-toluenhidrazin hidroklorür (Merck), 1-metil-1-tolilhidrazin (Merck), benzil-4-hidroksifenilketon (Merck), benzil-4-bromofenilketon (Merck), *p*-Tolilhidrazin HCl (Merck), 4'-kloro-2-fenilasetofenon (Merck), Etanol (Merck), Metanol (Merck), HCl (Merck) kullanıldı.

Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR spektrumlarının alınmasında DMSO (Merck), ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmalarında Kieselgel 60 F 254 ile 0.2 mm kalınlığında kaplanmış hazır alüminyum plaklar (Merck) kullanıldı. Lekelerin belirlenmesi amacıyla UV ışığı, metalik iyot (Merck) ve Dragendorff belirtecinden yararlandı.

#### 3.1.2. Yöntem

##### 3.1.2.1 Di veya Trisüstitüe İndol Türevi Bileşiklerin Genel Sentez Yöntemi:

Di veya Trisüstitüe indol türevi bileşiklerin sentezinde iki yöntem izlendi.

A) Her bileşik, 4 mmol hidrazin türevi ve 4 mmol uygun keton türevlerinin 12 mmol trikloroasetik asit içinde yağ banyosu üzerinde, geri çeviren soğutucu altında 100 °C'de 2-4 saat arasında değişen sürelerde magnetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtılmasıyla elde edildi. Reaksiyonun tamamlanması İTK ile izlendi. Hazır plaklar kullanılarak yapılan İTK çalışmalarında, lekelerin belirlenmesinde ultraviyole ışığı, metalik iyot ve Dragendorff belirtecinden yararlandı. Reaksiyonun karışımı oda ısısına kadar soğutuldu ve üzerine soğuk su eklendi. Oluşan çökelek süzüldü. Daha sonra elde edilmek istenen bileşiğe göre seçilen uygun bir çözücünden kristallendirildi. Oluşan kristal halindeki bileşik süzülerek alındı ve vakum desikatöründe kurutuldu.

**B)** Her bileşik, elde edilmek istenen bileşiğe göre seçilen 1 mmol keton türevi 10 mL etanol içerisinde çözüldü. Aynı bir balonda 1mmol p-tolilhidrazin hidroklorür 0.8 ml HCl ve 10 ml etanol içerisinde çözüldü ve magnetik ısıtıcı karıştırıcı üzerinde geri çeviren soğutucu altında 100 °C’de refraks olana kadar ısıtılmaya başlandı. Sonra keton türevi içeren balon içerisindeki çözelti p-tolilhidrazin hidroklorür üzerine damla damla ilave edildi. Daha sonra 20 ml etanol ilave edilerek ısıtılarak karıştırıldı. Reaksiyonun tamamlanışı İTK ile izlendi. 24-48 saat süreler sonunda reaksiyona son verildi. Hazır plaklar kullanılarak yapılan İTK çalışmalarında, lekelerin belirlenmesinde ultraviyole ışığı ve Dragendorff belirtecinden yararlanıldı. Reaksiyon karışımı buz banyosu içine alınarak, diklorometan ile ekstre edildi ve doymuş NaCl çözeltisi ile yıkandı. Çözelti kuruluğa kadar uçurulduktan sonra, elde edilmek istenen bileşiğe göre seçilen uygun bir çözücünden kristallendirildi. Oluşan kristal halindeki bileşik süzülerek alındı ve vakum desikatöründe kurutuldu.

### **3.2. Analitik Çalışmalar**

#### **3.2.1. Erime Noktası Tayini**

Sentezleri yapılan bileşiklerin erime dereceleri, Electrothermal 9200 erime derecesi tayin cihazı ile saptandı.

#### **3.2.2. İTK ve Kolon Kromatografisi ile Yapılan Kontroller**

##### **3.2.2.1. Materyal**

Plaklar: İnce tabaka Kromatografisi çalışmalarında Kieselgel 60 F254 ile 0.2 mm kalınlığında kaplanmış hazır alüminyum plaklar (Merck) kullanıldı.

Çözücü sistemleri: Sentezlerini yaptığımız bileşiklerin kromatografik kontrollerinde aşağıdaki çözücü sistemleri kullanıldı. Kolon kromatografisinde ise silika jel kullanıldı.

C-1: Kloroform-metanol (90:10)

C-2: Heksan-etilasetat (70:30)

Lekelerin belirlenmesi: Kromatogramlarda sentez ürünleri ve başlangıç maddelerine ait lekelerin belirlenmesinde UV ışığı, Dragendorff belirteci, iyot buharından yararlanıldı.

### **3.2.3. Spektroskopik Kontroller**

#### **3.2.4.1. IR Spektrumları**

Spektrumlar, sentezlenen bileşiklerinin Varian 1000 FT-IR spektrofotometresinde alındı ve dalga sayısı ( $\text{cm}^{-1}$ ) cinsinden değerlendirildi.

#### **3.2.4.2. $^1\text{H}$ NMR Spektrumları**

Bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR Spektrumları, DMSO (Merck) içindeki çözeltileri ile Varian Mercury 400 FT-NMR spektrofotometrisinde alınıp kimyasal kayma değerleri  $\delta$  skalasında değerlendirildi. Eşleşme sabitleri Hz olarak verildi.

### 3.3. BİYOLOJİK ÇALIŞMALARI

#### 3.3.1. Metod

##### 3.3.1.1. Morgan-Elson Testi

0.1 M sodyum format içeren tampon çözeltisi ve 0.1 M NaCl inkübasyon tamponu hazırlanarak ve formik asit ile pH 3.5' e ayarlandı. Bovine serum albumin (BSA), 0.2 mg/mL lik konsantrasyonda kullanıldı. Borik asit çözeltisi hazırlamak için 4.94 g borik asit ve 1.98 g KOH 100 mL su içinde karıştırıldı. 6.25 mL 10 N HCl içindeki 5 g dimetilamino benzaldehit (DMAB) 50 ml'ye glasiyel asetik asit ile seyreltildi.

Stok çözelti karanlıkta ve soğuk ortamda saklandı. Hiyaluronidaz enziminin saf tozu (3110 U/mg), 800 U/ml hiyaluronidaz çözeltisi hazırlamak için inkübasyon tamponunda çözüldü ve inhibitör maddeler, son konsantrasyon 100 mmol/ml olacak şekilde DMSO içinde çözümlü seyreltilerek hazırlandı.

HA'nın 5mg/ml'lik stok çözeltisi, HA'nın su içinde çözülmesiyle hazırlandı. İnhibitör / enzim çözeltisi, inhibitör çözeltilerin enzim çözeltisine eklenmesiyle 25 µM, 75 µM ve 100 µM'lık konsantrasyonlarda hazırlandı. Bu çözeltilerin 37 °C de 1 saatlik inkübasyonlarından sonra santrifüjleme yapıldı.

Sonraki aşamada, 100 ml BSA çözeltisi, 100 ml inkübasyon tamponu, 150 ml su, 50 ml inhibitör / enzim çözeltisi bir reaksiyon tüpünde karıştırılıp analiz, 50 ml HA çözeltisi ilavesiyle başlamış oldu.

Sıfırıncı dakikada ilk veriyi almak için, bu karışımdan 45 µL mikrofüj tüpüne pipetle aktarıldı ve 10 ml borik asit çözeltisi eklendi. Daha sonra mikrofüj tüpü 100 °C'de 4.5 dakika ısıtıldı. Bu ısıtılan çözeltinin tamamı, buz üzerine yerleşmiş bulunan mikroplate içine transfer edildi.

300 ml stain çözelti, stain yöntemine başlamak için her hücreye ilave edilerek ve 37°C'de 20 dakika mikroplate inkübasyona bırakıldı.

Absorpsiyon 590'nm de microplate reader (Mithras LB940, Berthold, Germany) ile izlendi.

İnhibitör bileşik içeren ve kontrol çözeltileri, inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon farkları kaydedilip standardizasyon eğrisi yoluyla enzim aktiviteleri

değerlendirildi. Ayrıca inhibitör çözeltisi yerine saf DMSO ile yapılan aktivite kontrolleri % 100 olarak kabul edildi.

### 3.3.1.2. Stain-all Testi

0.2 M ve 50 M'lık iki fosfat tampon çözeltisi hazırlanıp pH'ları hidroklorik asit ile 7.0'a ayarlandı. 3310 U/mg hiyaluronidaz enzimi tozu 50 nM fosfat tamponu içinde çözülüp 50 U/ml hiyaluronidaz konsantrasyonuna tamamlandı. İnhibitör bileşikler, DMSO içinde 10 mmol/ml çözünürlüğünde hazırlanıp HA'nın 2mg/ml'lik stok çözeltisi suda çözünerek hazırlandı. Enzim/inhibitör çözeltisi; 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonlardaki inhibitör çözeltilerinden, enzim çözeltisine katılarak hazırlandı 37 °C de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra saydam bir çözelti elde etmek için santrifüj edildi.

22.4 mg stains-all karışımı, 35.2 mg askorbik asit, 23 mL glasiyel asetik asit ve 1.3 mg bütillenmiş hidroksi toluen; 100 ml dioksan ve 100 mL su karışımı içinde çözülerek hazırlanan stok çözeltisi karanlıkta saklandı.

Ana çözelti 0.2 M'lık 390 ml fosfat tamponu, 110 mL HA çözeltisi ve 500 ml su karışımından hazırlandı, sonra bu çözelti 37°C de 10 dakika ısıtıldı. İnhibitör / enzim çözeltisinden 12.5 µL, bir mikroplate içinde 12.5 µL ana çözelti ile karıştırıldı ve reaksiyon 112.5 mL stain çözeltisi ve 62.5 µL su ilavesiyle başlamış oldu.

Absorpsiyon 650'nm de microplate reader (Mithras LB940, Berthold, Germany) ile izlendi.

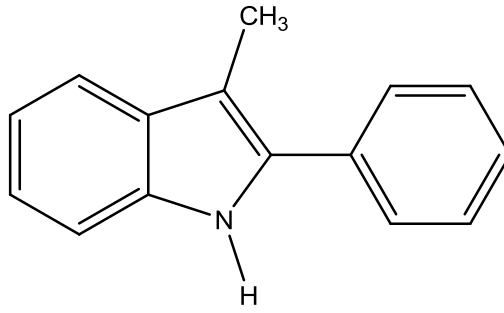
İnhibitör bileşik içeren ve kontrol çözeltileri, inkübasyon öncesi ve sonrası absorpsiyon farkları kaydedilip standardizasyon eğrisi yoluyla enzim aktiviteleri değerlendirildi. Ayrıca inhibitör çözeltisi yerine saf DMSO ile yapılan aktivite kontrolleri % 100 olarak kabul edildi ve IC<sub>50</sub> hesaplanmadı. Moleküllerin protonize olmalarından dolayı IC<sub>50</sub> değerlerinin hesaplanması mümkün olmamaktadır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. KİMYASAL BULGULAR

#### 4.1.1. 3-Metil-2-fenil-1*H*-indol (Bileşik No: 1)



0.578 g (4 mmol) Fenilhidrazin hidroklorür, 0.53 mL (4 mmol) propiyofenon ve 1.960 g (12 mmol) trikloroasetik asit azot gazı altında 100°C'de 2 saat süre ile ısıtılarak, genel sentez yöntemi A göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, metanolden kristallendirilerek 0.571 g saf bileşik elde edildi.

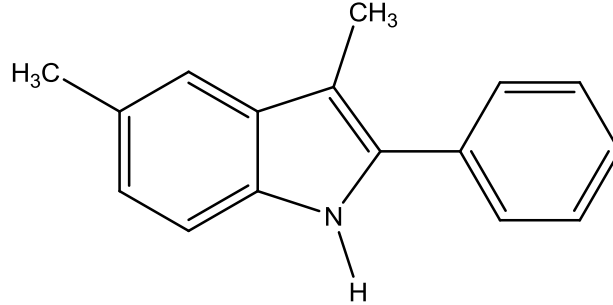
Verim : % 70

Erime Noktası: 88 °C (Lit: 91-91.5 °C ) (178)

IR spektrumu (cm<sup>-1</sup>), 3420 (N-H gerilim), 3000 (aromatik =C-H gerilimleri), 1600 (C=N gerilim), 1460 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim plan dışı) bantları görüldü.

<sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO- d<sub>6</sub>) δ ppm, 2.39 (s, 3H), 6.97-7.14 (m, 2H), 7.36-7.38 ( m, 3H), 7.47-7.54 (d, 2H), 7.67 (d, 2H), 11.16 (yayvan s, 1H, -NH) pikleri görüldü.

#### 4.1.2 3,5-Dimetil-2-fenil-1H-indol ( Bileşik No: 2)



0.634 g (4 mmol) *p*-toluenfenilhidrazin hidroklorür, 0.53 mL (4 mmol) propiyofenon ve 1.960 g (12 mmol) trikloroasetik asit azot gazı altında 100°C’de 2 saat süre ile ısıtılarak, genel sentez yöntemi A göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, metanolden kristallendirilerek 0.620 g saf bileşik elde edildi.

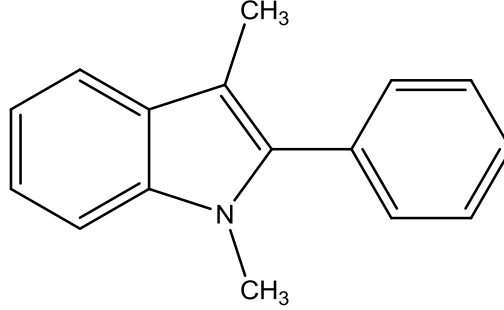
Verim : % 78

Erime Noktası: 105°C (Lit: 105-108 °C) (178)

IR spektrumu (cm<sup>-1</sup>), 3395 (N-H gerilim), 3049 (aromatik =C-H), 1454 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik –C-H eğilim), 718 (benzen =C-H plan-dışı eğilim) bantları görüldü.

<sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO- d<sub>6</sub>) δ ppm, 2.5 ( s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 6.95-6.97 (dd, 1H), 7.29-7.57 (m, 3H), 7.49 (t, 2H), 7.66 (d, 2H), 10.91 (s, 1H, -NH) pikleri görüldü.

#### 4.1.3 1,3-Dimetil-2-fenil-1*H*-indol (Bileşik No: 3)



0.469 mL (4 mmol) 1-metil-1-fenilhidrazin, 0.53 mL (4 mmol) propiyofenon ve 1.960 g (12 mmol) trikloroasetik asit azot gazı altında 100°C’de 3 saat süre ile ısıtılarak, genel sentez yöntemi A göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, metanolden kristallendirilerek 0.431 g saf bileşik elde edildi

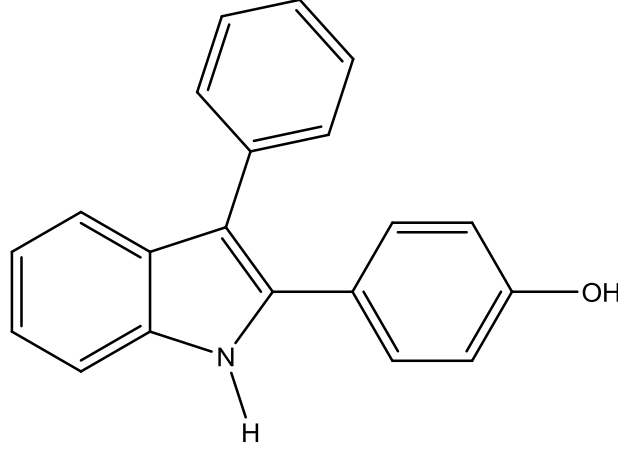
Verim : % 70

Erime Noktası: 69 °C (Lit: 66-67.5 °C) (178)

IR spektrumu (cm<sup>-1</sup>), 3409 (N-H gerilim), 3050 (aromatik = C-H), 1445 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 739 (benzen =C-H plan-dışı eğilim) bantları görüldü.

<sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO- d<sub>6</sub>) δ ppm, 2.21 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 3.59 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7.03-7.21 (m, 3H), 7.42-7.60 (m, 6H) pikleri görüldü.

#### 4.1.4 4-(3-Fenil-1H-indol-2-il)fenol (Bileşik No: 4)



0.578 g (4 mmol) fenilhidrazin hidroklorür, 0.849 g (4 mmol) benzil-4-hidroksifenilketon ve 1.960 g (12 mmol) trikloroasetik asit azot gazı altında 100°C'de 4 saat süre ile ısıtılarak, genel sentez yöntemi A göre yürütülen reaksiyonu ile elde edildi. Elde edilen ham ürün, metanol/sudan kristallendirilerek 0.685 g saf bileşik elde edildi

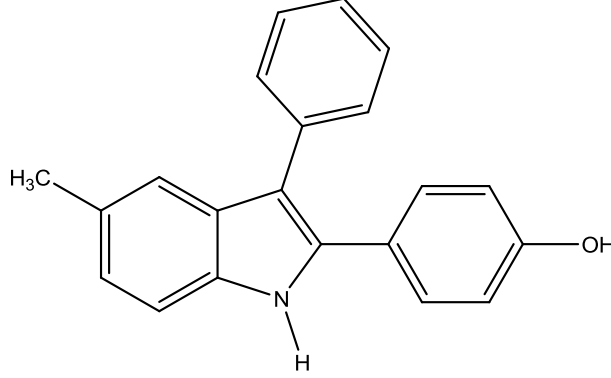
Verim : % 75

Erime Noktası: 147 °C (Lit: 147 °C) (178)

IR spektrumu ( $\text{cm}^{-1}$ ), 3395 (N-H gerilim), 3450-3020 (O-H gerilim, =C-H gerilim, aromatik =C-H gerilim), 1454 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 718  $\text{cm}^{-1}$  (benzen =C-H plan-dışı eğilim).

$^1\text{H}$  NMR spektrumu (DMSO-  $\text{d}_6$ )  $\delta$  ppm, 4.85 (yayvan s, 1H), 6.74 (d, 2H), 7.28 - 7.47 (m, 9H), 6.97-7.15 (m, 2H), 11.38 (s, 1H, -NH) pikleri görüldü.

#### 4.1.5 4-(5-Metil-3-fenil-1H-indol-2-il)fenol (Bileşik No: 5)



0.158 g (1 mmol) p-Tolilhidrazin HCl ve 0.212 g (1 mmol) benzil-4-hidroksifenil keton 0,8 mL HCl ve 16 mL etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak, genel sentez yöntemi B göre yürütülen reaksiyonu ile 24 saatte elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanolden kristallendirilerek 0.185 g saf bileşik elde edildi.

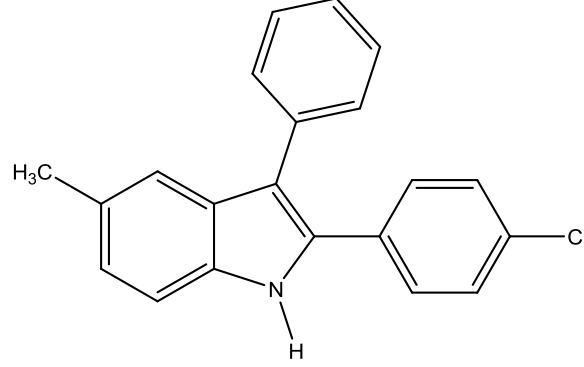
Verim : % 61

Erime Noktası: 148-150°C

IR spektrumunda ( $\text{cm}^{-1}$ ), 3446 (O-H gerilim), 3374 (N-H gerilim), 3051 (aromatik = C-H), 2922 (alifatik -C-H gerilimleri), 1597-1439 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 767 (benzen =C-H plan-dışı eğilim) bantları görüldü.

$^1\text{H}$  NMR spektrumu (DMSO)  $\delta$  ppm, 2.43 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.90 (yayvan s, 1H), 6.75-6.77 (d, 2H), 7.03-7.06 (1H, dd), 7.25-7.44 (m, 9H), 8.06 (s, 1H, -NH) pikleri görüldü.

#### 4.1.6 2-(4-Klorofenil)-5-metil-3-fenil-1H-indol (Bileşik No: 6)



0.158 g (1 mmol) *p*-tolilfenilhidrazin HCl ve 0.230 g (1 mmol) 4'-kloro-2-fenilasetofenon 0.8 mL HCl ve 20 mL etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak, genel sentez yöntemi B göre yürütülen reaksiyonu ile 24 saatte elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanolden kristallendirilerek 0.250 g saf bileşik elde edildi.

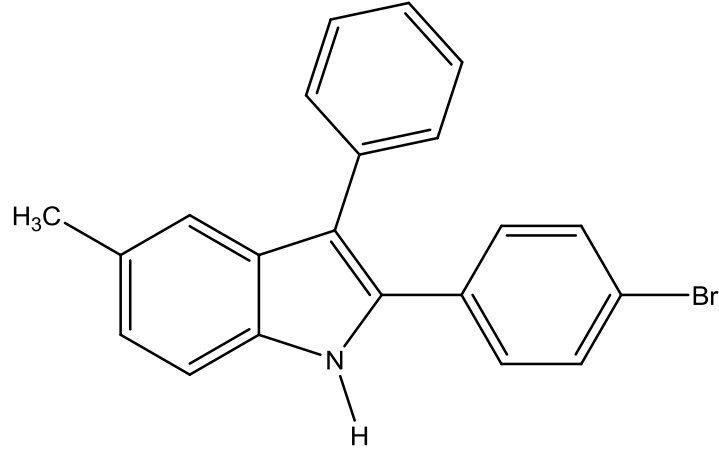
Verim : % 78

Erime Noktası: 131-133 °C

IR spektrumunda ( $\text{cm}^{-1}$ ), 3395 (N-H gerilim), 3021 (aromatik = C-H), 2917 (alifatik -C-H gerilimleri), 1598-1401 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 766 (benzen =C-H plan-dışı eğilim) bantları görüldü.

$^1\text{H}$  NMR spektrumu (DMSO)  $\delta$  ppm, 2.43 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) 7.06-7.08 (1H, dd), 7.24-7.43 (m, 11H), 8.09 (1H, s, -NH) pikleri görüldü.

#### 4.1.7 2-(4-Bromofenil)-5-metil-3-fenil-1H-indol (Bileşik No: 7)



0.158 g (1 mmol) *p*-tolilfenilhidrazin HCl ve 0.275 g (1 mmol) benzil-4-bromofenilketon 0.8 mL HCl ve 20 mL etanol içerisinde geri çeviren soğutucu altında ısıtılarak, genel sentez yöntemi B göre yürütülen reaksiyonu ile 48 saatte elde edildi. Elde edilen ham ürün, etanolden kristallendirilerek 0.260 g saf bileşik elde edildi.

Verim : % 71

Erime Noktası: 139-141°C

IR spektrumunda ( $\text{cm}^{-1}$ ), 3370 (N-H gerilim), 3050 (aromatik = C-H), 2942 (alifatik -C-H gerilimleri), 1597-1439 (aromatik C=C gerilimleri, N-H eğilim, alifatik -C-H eğilim), 767 (benzen =C-H plan-dışı eğilim) bantları görüldü.

NMR spektrumunda (DMSO)  $\delta$  ppm, 2.43 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>) 7.06-7.09 (dd, 1H), 7.25-7.32 (m, 5H), 7.39-7.40 (m, 6H), 8.09 (s, 1H, -NH) pikleri görüldü.

## 4.2. BİYOLOJİK BULGULAR

Bu çalışmada indol halkasının 1, 2, 3 ve 5 numaralı konumlarında -H/ -CH<sub>3</sub> / -fenil veya p-sübstütüefenil grupları taşıyan 7 adet indol türevi bileşik hiyaluronidaz enzim inhibitör etkileri karşılaştırılmak amacıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen indol türevi bileşikler ve standart madde olarak kullanılan askorbik asit palmitat tuzu pH 3.5 ve 7’de uygulanan modifiye edilmiş “Morgan-Elson” ve “Stains-all” testleri kullanılarak elde edilen *in vitro* hiyaluronidaz inhibitör etki sonuçları Çizelge 2’de verilmektedir.

Çizelge 2: Sentezlenen Bileşiklerin Hiyaluronidaz İnhibitör Etkileri

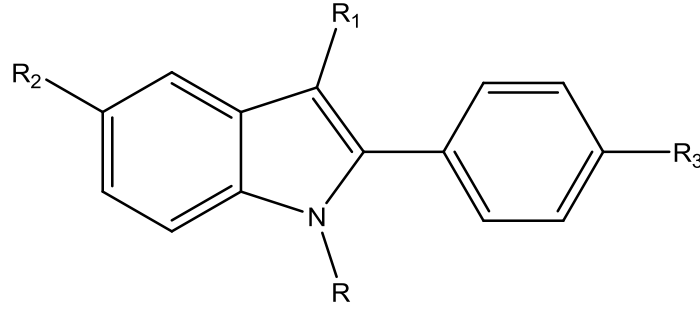
Bileşik No	% inhibisyon (100 µM)		IC <sub>50</sub> [µM]	
	pH7	3.5	pH7	3.5
1	17	14	t.e	t.e
2	16	8	t.e	t.e
3	16	9	t.e	t.e
4	48	42	107	107
5	84	103	t.e	t.e
6	83	103	t.e	t.e
7	86	98	t.e	t.e
<b>Askorbik asit Palmitat</b>	99%	99%	18	8



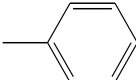
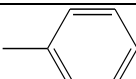
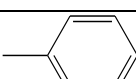
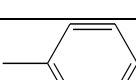
## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 1 numaralı konumlarında hidrojen atomu, metil grupları, 2 numaralı konumlarında fenil, *p*-hidroksifenil, *p*-klorofenil, *p*-bromofenil grupları, 3 numaralı konumlarında metil ve fenil grupları ile 5 numaralı konumlarında hidrojen atomu veya metil taşıyan 7 adet indol türevi bileşik sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin formülleri Çizelge 3'de verilmiştir.

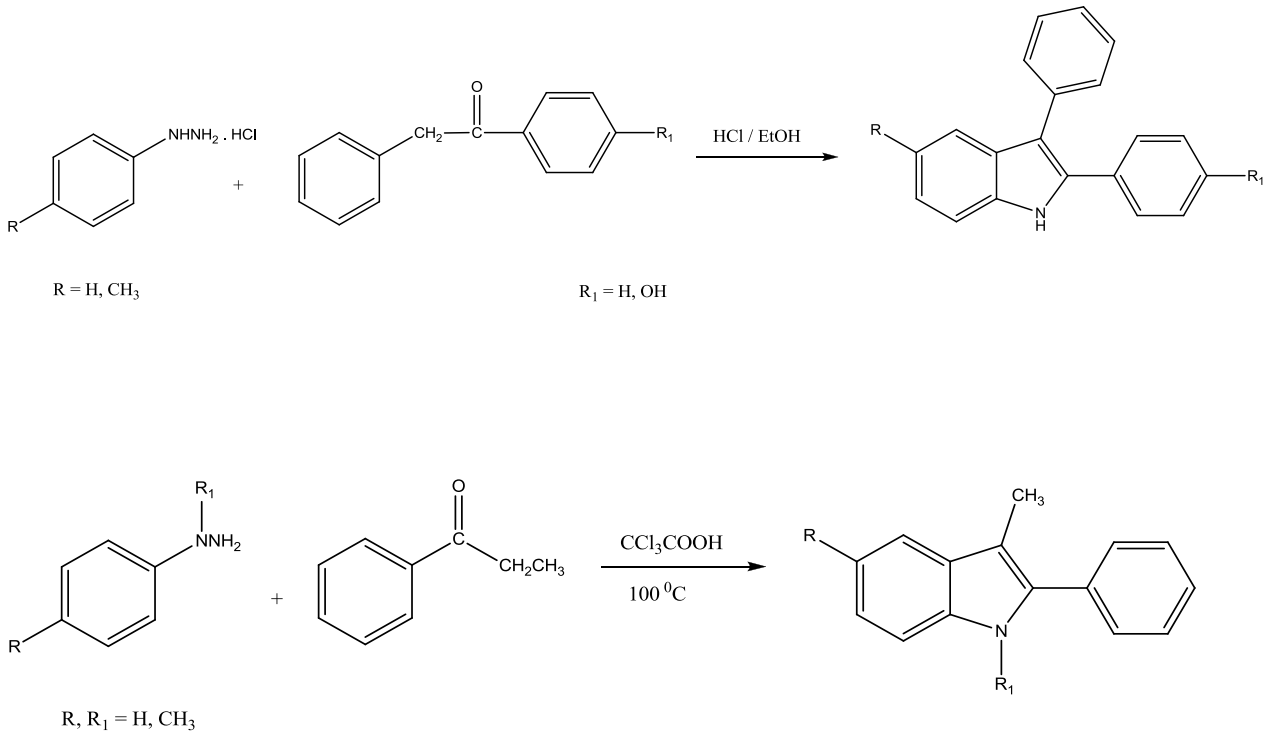
Çizelge 3: Sentezlenen Bileşiklerin Formülleri



Çizelge 3: Sentezlenen Bileşiklerin Formülleri

Bileşik No	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
2	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H
3	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	-H
4	-H		-H	-OH
5	-H		-CH <sub>3</sub>	-OH
6	-H		-CH <sub>3</sub>	-Cl
7	-H		-CH <sub>3</sub>	-Br

Sentezi yapılan bileşiklerden 1-4 daha önce sentezlenmiş, literatürde kayıtlı bileşiklerdir (178). Bileşik 5-7 ise ilk kez sentezlenmiş bileşiklerdir. Bileşiklerin sentezi indol türevlerinin eldesi için kolaylığı, sentez veriminin yüksek oluşu gibi nedenler ile çok kullanılan bir yöntem olan Fischer indol sentezi modifiye edilerek yapılmıştır. (Şema (1)'de bu çalışmada sentezlenen bileşiklerin sentez şeması verilmektedir.



Şekil 1: Bileşiklerin Sentez Şeması

Sentezlenen bileşiklerinden literatürde kayıtlı olanların erime dereceleri, IR ve <sup>1</sup>H-NMR spektrumları literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Bileşiklerin IR spektrumları FT-IR spektrofotometresi ile ATR yardımıyla toz veya kristal örnek üzerinde alınmıştır. Bileşiklere ait spektrumların 3500-2300 cm<sup>-1</sup> bölgesinde kuvvetli, yayvan multipllet absorpsiyon bandları görülmektedir. Bu bölgede bileşiklerin 2 numaralı konumlarındaki süstitütüente bağlı olarak O-H gerilim, N-H gerilim, aromatik =C-H gerilim ve alifatik C-H gerilim bandları yer almaktadır. Bu bandların yerlerini her zaman tam olarak belirlemek zordur (144).

Bileşiklerin IR spektrumlarında incelenen ikinci bölge 1700-1300 bölgesidir. Bu bölgede bileşiklerin C=N gerilim, C=C gerilim, N-H eğilim ve 2 numaralı konumlarında -CH<sub>2</sub> grubu taşıyan bileşikler için, C-H eğilim bandları görülmektedir.

Elde edilen bileşiklerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumları DMSO-d<sub>6</sub> içinde alınmıştır. İndol halkasına ait N-H protonu spektrumları δ 8.06 ile 9.38 ppm arasında bir singlet halinde görülmektedir.

İndol halkası ve aromatik sübsitüe fenil halkalarının protonları çok yakın yerlerde pik vermelerinden dolayı bu hidrojenlere ait pikler multipler halinde 6.95-7.67 ppm aralığında görülmektedir.

Bileşik 4 ve 5 yer alan p-hidroksifenil halkasındaki OH grubuna ait pikler 4.85 ve 4.90 ppm'de yayvan pikler halinde görülmektedir.

Ayrıca Bileşik 1-3'ün 1., 3. ve 5. konumlarında yer alan CH<sub>3</sub> gruplarına ait piklerde 2.21-3.59 ppm aralığında singlet pikler halinde görülmektedir.

Çözücü olarak kullanılan DMSO-d<sub>6</sub> içinde H<sub>2</sub>O'ya ait 3.34 ppm civarında ve kullanılan DMSO-d<sub>6</sub>'nın en iyi şartlarda % 99.9 oranında döteryum içermesi nedeni ile CD<sub>3</sub>SOD<sub>2</sub>H'a ait δ 2.50 ppm'de gözlenen pikler tüm spektrumlarda vardır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada sentezlenen 7 adet indol türevi bileşiklerin *in vitro* antihiyaluronidaz aktivite çalışmalarında başlıca üç konunun araştırılması amaçlanmıştır.

1. Sentezlenen indol türevi bileşiklerin *in vitro* antihiyaluronidaz etkiye sahip olup olmadıklarının belirlenmesi
2. İndol halkasının 2 numaralı konumundaki fenil grubunun para konumundaki süstitütentler ile indol halkasındaki 5 numaralı konumlarındaki süstitütentlerin aktivite üzerindeki rolünün araştırılması
3. İndol halkasının 3 numaralı konumunda yer alan alifatik ve aromatik grupların aktivite üzerindeki rolünün araştırılması

Bu amaçla sentezlenen 7 adet indol türevi bileşiklerin “Morgan-Elson” ve “Stains-all” testleri kullanılarak pH 3.5 ve 7’de *in vitro* hiyaluronidaz inhibitör etki çalışması sonuçları Tablo 2’de verilmiştir.

Sentezlenen bileşiklerin 100 µM konsantrasyonda % inhibisyon değerleri incelendiğinde, Bileşik 1-7 pH 7’de %16-86 arasında pH 3’te is % 8-103 aralığında olduğu görülmektedir. Aktivite çalışması sırasında BSA’nın ortama eklenmesinin ardından BTH’ın aktivitesinin gerek pH 7’de gerekse pH 3.5’de beklenenin çok üzerine çıkması hiyaluronidaz inhibitörü bileşiklerimizin inhibisyon değerlerini etkileyebileceği, %100’ün üzerinde bir inhibisyon görülmesine neden olmaktadır (1).

İndol halkasının 3 numaralı konumunda aromatik bir süstitüsyon aktivitenin artmasına neden olmaktadır. 3 Numaralı konumlarında aromatik süstitüent taşıyan türevlerin (Bileşik 4-7) metil süstitüsyon taşıyanlara göre (Bileşik 1-3) daha aktif olduğu görülmektedir. Ayrıca indol halkasındaki N atomuna bağlı hidrojen atomunun veya süstitüsyonunun aktivitede önemli bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir.

İndol halkasının 5 numaralı konumundaki metil sübstitüsyonunun aktivitede önemli değişikliklere neden olduğu görülmektedir. İndol halkasının 5. konumda sübstitüsyon olmaması durumunda aktivite çok yüksek olmadığı halde, metil sübstitüsyonun aktivite yükselmektedir. Ancak bu aktivite artışının metil sübstitüentine mi bağlı olduğu sadece bu çalışmanın sonuçlarına dayalı olarak yorumlamak mümkün görünmemektedir.

İndol halkasının 2. konumundaki fenil halkasının para pozisyonundaki OH, Br veya Cl sübstitüsyonunun aktivitede önemli bir değişiklik meydana getirmediği, ancak her üç sübstitüenti taşıyan bileşiklerin önemli aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bu konumlardaki sübstitüsyonun aktiviteye büyük bir katkısının olup olmadığı ancak farklı sübstitüsyonları taşıyan bileşiklerin sentezlenerek aktivitelerinin net olarak belirlenmesiyle ortaya konulabilir.

Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerden sadece Bileşik 4'ün IC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir. Diğer bileşiklerin protonizasyonundan dolayı bu çalışmalar yapılamamış ve değerlere ulaşılamamıştır. Bileşikler aktivite çalışmaları sırasında protonlanmaya uğramalarından dolayı uzun süre BTH'nin aktif kısmına bağlı kalmaktalar. Bu durumda inhibisyon değerlerinin ölçümünde beklenmedik sonuçlara sebep olmaktadır. Bu beklenmedik sonuçlara literatürde de rastlanmakta olup, bu durumun aktivite deney ortamından kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilir (1). Ancak elde edilen bu sonuçların antihyaluronidaz aktiviteye sahip bileşiklerin *in vitro* antihyaluronidaz etkilerinin belirlenmesi konusunda yapılacak daha ileri çalışmaları destekleyeceği kansındayız. İndol ana yapısı taşıyan antihyaluronidaz aktivite çalışmalarının devamı niteliğinde olan bu çalışmanın bundan sonraki çalışmalara yol göstereceğine inanmaktayız. Ayrıca araştırma grubumuzun bundan sonraki çalışmalarının daha etkin bileşiklerin bulunmasının yanı sıra kanser metastazının etki mekanizmalarının açıklaması ve antihyaluronidaz-metastaz ilişkisinin ortaya konulmasında katkıda bulunacağı kanısındayız.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Kaessler A, Nourrisson MR, Duflos M, Jose J.** Indole carboxamides inhibit bovine testes hyaluronidase at pH 7.0 and indole acetamides activate the enzyme at pH 3.5 by different mechanisms. *J. Enzyme Inh. and Med. Chem*, **2008**; 23(5): 719-727.
2. **Takahashi T, Kawai MI, Okuda R, Suzuki K.** A Fluorometric Morgan-Elson Assay method for hyaluronidase activity. *Anal. Biochem*, **2003**; 322: 257-263.
3. **Lee JY, Spicer AP.** Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol*, **2000**; 12(5): 581-586
4. **Girish KS, Kemparaju K.** The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase. *Life Sciences*, **2007**; 80: 1921-1943
5. **Stern R.** Hyaluronan Metabolism: A major paradox in cancer biology. *Pathol Biol*, **2005**; 53: 372-382
6. **Stern R.** Hyaluronidases in cancer biology. *Semin Cancer Biol*, **2008**; 18: 275-280
7. **Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdingerm G.** Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res*, **1999**; 59: 6246-6250.
8. **Madan AK, Pang Y, Wilkiemeyer MB, Yu D, Beech DJ.** *J. Oncol. Rep*, **1999**; 6: 1431-1433.
9. **Olgen S, Kaessler A, Jose J.** New potent indole derivatives as hyaluronidase inhibitors. *Chem. Biol & Drug Design*, **2007**; 70(6): 547-551.
10. **Kaessler A, Algül O, Jose A** microplate based screening of benzimidazole derivatives on hyaluronidase inhibition at pH 7 and 3.5. *J. Lett. Drug Design & Discovery*, **2007**; 4: 562-569.
11. **D. Inberg et al.** Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *J. Nature*, **1990**; 348: 555-557.
12. **Gore M, A'Hern R, Stankiewicz M, Slevin M.** Tumour marker levels during marimastat therapy *Lancet*, **1996**; 348: 263-264.
13. **Fong TAT, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim HY, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G.** SU5416 Is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization and growth of multiple tumor types. *Cancer Res*, **1999**; 59(1): 99-106.
14. **Jeong SJ, Ahn NH, Kim YC, Inagaki M, Miyamoto T, Higuchi R.** Norlignans with hyaluronidase inhibitory activity from *anemarrhena asphodeloides*. *Planta Med*, **1999**; 65: 367-368.

15. **Trochon V, Blot E, Cymbalista F, Engelmann C, Tang RP, Thomaidis A, Vasse M, Soria J, Lu H, Soria C.** Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G2/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression. *Int. J. Cancer*, **2000**; 85(5): 691-696.
16. **William J. Houlihan, Houlihan WJ, Remers WA.** Indoles. The chemistry of heterocyclic compounds. *Wiley-Interscience*, **1971**: Cilt 1.
17. Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Indole>.
18. **Heaney H, Ley SV.** 1-Benzylindole. *Org Synth*, **1974**; 54-58. <http://www.orgsyn.org/orgsyn/prep.asp?prep=cv6p0104>.
19. **Bergman J, Venemalm L.** Efficient Synthesis of 2-chloro-, 2-bromo-, and 2-iodoindole. *J. Org. Chem*, **1992**; 57: 2495-2497.
20. **Baeyer A.** Ueber die reduction aromatischer verbindungen mittelst zinkstaub. *Ann*, **1866**; 140: 295.
21. **Baeyer A, Emmerling A.** Synthese des indols. *Chemische Berichte*, 1869; 2: 679.
22. **Van Order RB, Lindwall HG.** Indole. *Chem. Rev*, **1942**; 30: 69–96.
23. **Gribble GW.** Recent developments in indole ring synthesis methodology and applications. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, **2000**; 1: 1045.
24. **Cacchi S, Fabrizi G.** Synthesis and functionalization of indoles through palladium-catalyzed reactions. *Chem. Rev*, **2005**; 105: 2873.
25. **Humphrey GR, Kuethe, J T.** Practical methodologies for the synthesis of indoles. *Chem. Rev*, **2006**; 106: 2875.
26. **Robinson B.** The Fischer Indole Synthesis. *Chem. Rev*, **1963**; 63(4): 373–401.
27. **Orden V, Lindwell RB.** Indole. *Chem. Rev*. **1942**; 30: 69-96.
28. **Robinson B.** Studies on the Fischer indole synthesis. *Chem. Rev*. **1969**; 69(2): 227-250.
29. **Gassman PG, Van Bergen TJ, Gilbert DP, Cue BW.** General method for the synthesis of indoles. *J. Am. Chem. Soc*, **1974**; 96: 5495-5508.
30. **Gassman PG, Van Bergen TJ, Van Bergen TJ.** Oxindoles. New, general method of synthesis. *J. Am. Soc*, **1974**; 96: 5508-5512.
31. **Gassman PG, Gruetzmacher G, Van Bergen TJ.** Use of halogen-sulfide complexes in the synthesis of indoles, oxindoles and alkylated aromatic amines. *J. Am. Chem. Soc*, **1973**; 95: 6508-6509.
32. **Gassman PG, Gruetzmacher G, Van Bergen TJ.** Generation of azasulfonium salts from halogen-sulfide complexes and anilines. Synthesis of indoles, oxindoles, and alkylated aromatic amines bearing cation stabilizing substituents. *J. Am. Chem. Soc*, **1974**; 96: 5512-5517.
33. **Bartoli G, Palmieri G, Bosco M, Dalpozzo R.** The reaction of vinyl grignard reagents with 2-substituted nitroarenes: A new approach to the synthesis of 7-substituted indoles. *Tetrahedron Lett*, **1989**; 30: 2129–2132.
34. **Bartoli G, Bosco M, Dalpozzo R, Palmieri G, Marcantoni E.** Reactivity of nitro- and nitroso-arenes with vinyl grignard reagents: synthesis of 2-(trimethylsilyl) indoles. *J. Chem. Soc, Perkin Trans*, **1991**; 1: 2757–2761.
35. **Dobbs AP, Voyle M, Whittall N.** Synthesis of novel indole derivatives: Variations in the Bartoli Reaction. *Synlett*, **1999**: 1594–1596.

36. **Dobson D, Todd A, Gilmore J.** The Synthesis of 7-alkoxyindoles. *Synth Commun*, **1991**; 21: 611–617.
37. **Dobson DR, Gilmore J, Long DA.** Synthesis of 7-formylindole using the Bartoli Indole methodology. *Synlett*, **1992**; 79–80.
38. **Bosco M, Dalpozzo R, Bartoli G, Palmieri G, Petrini M.** Mechanistic studies on the reaction of nitro- and nitrosoarenes with vinyl Grignard reagents. *J. Chem. Soc, Perkin Trans 2*, **1991**; 5: 657-663.
39. **Thyagarajan BS, Hillard JB, Reddy KV, Majumdar KC.** A novel synthesis of indole derivatives via a claisen rearrangement. *Tetrahedron Lett*, **1974**; 15(23): 1999-2002.
40. **Majumdar KC, Jana GH, Das U.** Studies of amine oxide rearrangement: an unusual product from the reaction of 4-[N-alkylanilino]but-2-yn-1-ol with *m*-chloroperoxybenzoic acid. *Chem. Commun*, **1996**; 517-518.
41. **Balasubramanian T, Balasubramanian KK.** Tandem transformations of *N*-alkyl-*N*-allenyl methylanilines to *N*-alkyl-2-ethenylindoles. *J. Chem. Soc, Chem. Commun*, **1994**; 1237-1238.
42. **Baudin JB, Julia SA.** Synthesis of indoles from *N*-aryl-1-alkenylsulphinamides. *Tetrahedron Lett*, **1986**; 27(7): 837-840.
43. **Houlihan WJ, Parrino AV, Uike Y.** Lithiation of *N*-(2-alkylphenyl)alkanamides and related compounds. A modified Madelung indole synthesis. *J. Org. Chem*, **1981**; 46: 4511-4515.
44. **Hughes I.** Application of polymer-bound phosphonium salts as traceless supports for solid phase synthesis. *Tetrahedron Lett*, **1996**; 37(42): 7595-7598.
45. **Clark RD, Muchowski JM, Souchet M, Repke DB.** Synthesis of Protected Indoles from *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-2-alkylanilines. *Synlett*, **1990**; 207-208.
46. **Takahashi M, Suga D.** Synthesis of 2-aryl-3-arylsulfonylindoles and 2-anilino-3-arylsulfonylindoles from 2-(arylsulfonyl)methylanilines using the aza-wittig reaction of iminophosphoranes. *Synthesis*, **1998**; 986-990.
47. **Kiselyov AS.** Unexpected behavior of imines derived from trifluoromethylaryl ketones under basic conditions: Convenient synthesis of 2-arylbenzimidazoles and 2-arylbenzoxazoles. *Tetrahedron Lett*, **1999**; 40(22): 4119-4122.
48. **Wender PA, White AW.** Methodology for the facile and regio-controlled synthesis of indoles *Tetrahedron*, **1983**; 39(22): 3767-3776.
49. **Mundy BP, Ellerd MG, Favaloro FG.** Name reactions and reagents in organic synthesis. Second Edition. *John Wiley & Sons*. **2005**: 311.
50. **Kihara M, Iwai Y, Nagao Y.** A new synthesis of 3-substituted indolines and indoles. *Heterocycles*, **1995**; 41(10):2279-2287.
51. **George R, Allen Jr, Pidacks C, Weiss MJ.** The Mitomycin Antibiotics. Synthetic Studies. XIV. The Nenitzescu Indole Synthesis. Formation of isomeric indoles and reaction mechanism. *J. Am. Chem. Soc*, **1966**; 88(11): 2536-2544.
52. **Pawlak JM, Khau VV, Hutchison DR, Martinelli MJ.** A Practical, Nenitzescu-Based synthesis of LY311727, the first potent and selective s-PLA<sub>2</sub> inhibitor. *J. Org. Chem*, **1996**; 61: 9055-9059.
53. **Engler TA, Wanner J.** Lewis Acid-directed reactions of benzoquinone mono-/bis-imines: Application to syntheses of substituted β- and γ-tetrahydrocarbolines. *Tetrahedron Lett*, **1997**; 38: 6135-6138.



54. **Ito Y, Kobayashi K, Saegusa T.** An efficient synthesis of indole. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**; 99: 3532-3534.
55. **Mallegol T, Gmouh S, Meziane MAA, Blanchard-Desce M, Mongin O.** Practical and efficient synthesis of tris(4-formylphenyl)amine, a key building block in materials chemistry. *Synthesis*, **2005**; (11): 1771-1774.
56. **Nelson KL, Seefeld RL.** The mechanistic fate of carbonyl oxygen in the rearrangement of 2-anilino-1-phenyl-1-propanone. *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**; 80: 5957-5958.
57. **Nishiyama Y, Maema R, Ohno K, Hirose M, Sonoda N.** Synthesis of indoles: selenium-catalyzed reductive *N*-heterocyclization of 2-nitrostyrenes with carbon monoxide. *Tetrahedron Lett*, **1999**; 40(32): 5717-5720.
58. **Molina P, Alcántara J, López-Leonardo C.** Regiospecific preparation of  $\gamma$ -carbolines and pyrimido[3,4-*a*]indole derivatives by intramolecular ring-closure of heterocumulene-substituted indoles. *Tetrahedron*, **1996**; 52(16): 5833-5844.
59. **Fresneda PM, Molina P, Delgado S.** A divergent approach to cryptotackieine and cryptosanguinolentine alkaloids. *Tetrahedron Lett*, **1999**; 40 (40): 7275-7278,
60. **Bhatti IA, Busby RE, bin Mohamed M, Parrick J, Shaw CJG.** Pyrolysis of 1-substituted pyrazoles and chloroform at 550 °C: formation of  $\alpha$ -carboline from 1-benzylpyrazoles *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**; 3581-3586.
61. **Gribble GW.** Recent developments in indole ring synthesis-methodology and applications. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**; 7: 1045-1075.
62. **Gilchrist TL.** Activated 2H-azirines as dienophiles and electrophiles. *Aldrichimica Acta*, **2001**; 34: 51-55.
63. **Iwao M.** A new method for the construction of indole nucleus. *Heterocycles*, **1994**; 38 (1): 45-50.
64. **Fukuyama T, Chen X.** Stereocontrolled synthesis of (-)-hapalindole G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**; 116: 3125-3126.
65. **Magnus P, Mitchell IS.** Synthesis of 3-methylindoles from *N*-aryl-*N*-(3-triisopropylsilylpropargyl)sulfonamides. *Tetrahedron Lett*, **1998**; 39 (26): 4595-4598.
66. **Feldman KS, Bruendl MM, Schildknecht K.** Preparation of five-membered nitrogen-containing heterocycles via [Three-Atom + Two-Atom] combination of tosylamide anions with phenyl(propynyl)iodonium triflate. *J. Org. Chem.*, **1995**; 60 (24): 7722-7723.
67. **Feldman KS, Bruendl MM, Schildknecht K, Bohnstedt AC.** Inter- and intramolecular addition/cyclizations of sulfonamide anions with alkynyliodonium triflates. Synthesis of dihydropyrrole, pyrrole, indole and tosylenamide heterocycles. *J. Org. Chem.*, **1996**; 61 (16): 5440-5452.
68. **Novellino L, d'Ischia M, Protà G.** Expedient synthesis of 5,6-dihydroxyindole and derivatives via an improved Zn(II)-assisted 2,6-dinitrostyrene approach. *Synthesis*, **1999**; 793-796.
69. **Noland WE, Baude FJ.** Ethyl indole-2-carboxylate. *Organic Syntheses*, **1973**; 5: 567
70. **Johnson JR, Hasbrouck RB, Dutcher JD, Bruce WF, Gliotoxin V.** The structure of certain indole derivatives related to gliotoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**; 67(3):, 423-430.

71. **Taga M, Ohtsuka H, Inoue I, Kawaguchi T, Nomura S, Yamada K, Date T, Hiramatsu H, Sato Y.** Synthesis of aminobenzo[*b*]pyrrolizinone and aminobenzo[*b*]indolizinone derivatives. *Heterocycles*, **1996**; 42 (1): 251-263.
72. **Cushing TD, Sanz-Cervera JF, Williams RM.** Stereocontrolled total synthesis of (+)-paraherquamide B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**; 118: 557-559.
73. **Clark RD, Repke DB.** The Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. *Heterocycles*, **1984**; 22(1): 195-221.
74. **Maehr H, Smallheer JM.** A new approach to 4-substituted indoles. *J. Org. Chem.*, **1981**; 46: 1752-1755.
75. **Garcia EE, Fryer RI.** A new synthesis of *o*-nitrobenzylketones. Intermediates for the synthesis of 2-substituted indoles. *J. Heterocycl. Chem.*, **1974**; 11(2): 219-221.
76. **Ponticello GS, Baldwin JJ.** Useful synthesis of 4-substituted indoles. *J. Org. Chem.*, **1979**; 44 (22): 4003-4005.
77. **Wróbel Z, Makosza M.** Synthesis of 1-hydroxyindoles and indoles from *ortho*-nitroarylethanes. *Tetrahedron*, **1997**; 53(15): 5501-5514.
78. **Makosza M, Stalewski J, Maslennikova OS.** Synthesis of 7,8-dimethoxy-2-oxo-1,3,4,5-tetrahydropyrrolo[4,3,2-*de*]quinoline: A key intermediate en route to makaluvamines, discorhabdin C and other marine alkaloids of this group via vicarious nucleophilic substitution of hydrogen. *Synthesis*, **1997**; 10: 1131-1133.
79. **Moskalev N, Makosza M.** A novel method of indole ring system construction: One-pot synthesis of 4- and 6- nitroindole derivatives *via* base promoted reaction between 3-nitroaniline and ketones. *Tetrahedron Lett*, **1999**; 40(29): 5395-5398.
80. **Shim SC, Youn YZ, Lee DY, Kim TJ, Cho CS, Uemura S, Watanabe Y.** Synthesis of indoles from *N*-substituted anilines and triethanolamine by a homogeneous ruthenium catalyst. *Synth. Commun*, **1996**; 26(7): 1349-1353.
81. **Lee DY, Cho CS, Kim JH, Youn YZ, Shim SC, Song H.** Ruthenium complex-catalyzed synthesis of indoles from *N*-substituted anilines and alkanolamines. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **1996**; 17: 1132-1135.
82. **Boger DL, Garbaccio RM, Jin Q.** Synthesis and evaluation of CC-1065 and duocarmycin analogues incorporating the Iso-CI and Iso-CBI alkylation subunits: Impact of relocation of the C-4 carbonyl. *J. Org. Chem.*, **1997**; 62: 8875-8891.
83. **Boger DL, Boyce CW, Garbaccio RM, Searcey M.** Synthesis of CC-1065 and duocarmycin analogs via intramolecular aryl radical cyclization of a tethered vinyl chloride. *Tetrahedron Lett*, **1998**; 39(16): 2227-2230.
84. **Tokuyama H, Yamashita T, Reding MT, Kaburagi Y, Fukuyama T.** Radical cyclization of 2-alkenylthioanilides: A novel synthesis of 2,3-disubstituted indoles. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**; 121: 3791-3792.
85. **Fukuyama T, Chen X, Peng G.** A novel tin-mediated indole synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**; 116: 3127-3128.
86. **Sumi S, Matsumoto K, Tokuyama H, Fukuyama T.** Enantioselective total synthesis of aspidophytine. *Org. Lett*, **2003**; 5(11): 1891-1893.
87. **Yokoshima S, Ueda T, Kobayashi S, Sato A, Kuboyama T, Tokuyama H, Fukuyama T.** Stereocontrolled total synthesis of (+)-Vinblastine. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**; 124: 2137-2139.

88. **Kaburagi Y, Tokuyama H, Fukuyama T.** Total synthesis of (-)-strychnine. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**; 126(33): 10246–10247.
89. **Murphy JA, Rasheed F, Gastaldi S, Ravishanker T.** Synthesis of functionalised indolines by radical-polar crossover reactions. *J. Chem Soc, Perkin Trans 1*, **1997**; 10: 1549-1558.
90. **Fletcher R, Kizil M, Lampard C, Murphy JA, Roome SJ.** Tetrathiafulvalene-mediated stereoselective synthesis of the tetracyclic core of *Aspidosperma* alkaloids. *J. Chem. Soc, Perkin Trans. 1*, **1998**; 15: 2341-2352.
91. **Terpko MO, Heck RF.** Rearrangement in the palladium-catalyzed cyclization of .alpha.-substituted N-acryloyl-o-bromoanilines. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**; 101: 5281-5283.
92. **L. S. Hegedus.** Transition metals in the synthesis and functionalization of indoles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**; 27(9): 1113-1126.
93. **T. Sakamoto, Y. Kondo and H. Yamanaka.** Synthesis of condensed heteroaromatic compounds using palladium-catalyzed reaction. *Heterocycles*, **1988**; 27(9): 2225-2249.
94. **Ikeda M, El Bialy SAA, Yakura T.** Synthesis of heterocycles using the intramolecular heck reaction involving a 'foramI' anti-elimination process. *Heterocycles*, **1999**; 51(8): 1957-1970.
95. **Li JJ.** Name Reactions: A collection of detailed reaction mechanisms. Edition: 2nd. Publisher(s): Springer Verlag. **2003**.
96. **Takeda A, Kamijo S, Yamamoto Y.** Indole synthesis via palladium-catalyzed intramolecular cyclization of alkynes and imines. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**; 122(23): 5662–5663.
97. **Larock RC, Yum EK, Refvik MD.** Synthesis of 2,3-disubstituted indoles via palladium-catalyzed annulation of internal alkynes. *J. Org. Chem.* **1998**; 63: 7652-7662.
98. **Castro CE, Gaughan EJ, Owsley DC.** Indoles, benzofurans, phthalides and tolanes via copper(I) acetylates. *J. Org. Chem.* **1966**; 31: 4071-4078.
99. **Japp FR, Klingemann F.** Ueber benzolazo- und benzolhydrazofettsäuren". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* , **1887**; 20(2): 2942–2944.
100. **Japp FR, Klingemann F.** Zur kenntniss der benzolazo- und benzolhydrazopropionsäuren. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft*, **1887**; 20(2): 3284–3286
101. **Japp FR, Klingemann F.** Ueber sogenannte »gemischte azoverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft*, **1887**; 20(2): 3398–3401.
102. **Japp R, Klingemann F.** Ueber die constitution einiger sogenannten gemischten azoverbindungen. *liebig's annalen der chemie*, **1888**; 247(2): 190–225.
103. **Bowman RE, Goodburn TG, Reynolds AA.** 1,3,4,5-Tetrahydrobenz[cd]indoles and related compounds. Part I. A new synthesis of 3,4-dihydrobenz[cd]indol-5(1H)-one (Uhle's ketone). *J. Chem. Soc. Perkins Trans 1*, **1972**; 1121-1123.
104. **Meyer MD, Kruse LI.** Ergoline synthons: Synthesis of 3,4-dihydro-6-methoxybenz[cd]indol-5(1H)-one (6-methoxy-Uhle's ketone) and 3,4-dihydrobenz[cd]indol-5(1H)-one (Uhle's ketone) via a novel decarboxylation of indole-2-carboxylates. *J. Org. Chem.* **1984**; 49: 3195–3199.
105. **Foster HM, Hein DW.** Notes- Phenol-Formaldehyde Condensation. *J. Org. Chem.* **1961**; 26(7). 2539-2541.

106. **Toole BP, Gross J.** The extracellular matrix of the regenerating new limb: Synthesis and removal of hyaluronate prior to differentiation. *Dev Biol*, **1971**; 25: 57-77
107. **Longaker MT, Chiu ES, Adzick NS, Stern M, Harrison MR, Stern R.** Studies in fetal wound healing. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann Surg*, **1991**; 213: 292- 296.
108. **Knudson W, Biswas C, Li XQ, Nemece RE, Toole BP.** The role and regulation of tumor associated hyaluronan. *Ciba Found Symp*, **1989**; 143: 150- 169.
109. **Toole BP.** Morphogenetic role of glycosaminoglycans (acid mucopolysaccharides) in brain and other tissues. In Neuronal recognition. *Barondes SH ed, Plenum Press, New York*, **1976**; 275-329.
110. **Pogrel MA, Low MA, Stern R.** Hyaluronan and its regulation in human saliva by hyaluronidase and its inhibitor. *Journal of Oral Science*, **2003**; 45(2): 85-91.
111. **Stern R.** Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol*, **2004**; 83 (7): 317-325.
112. **Averbeck M, Gebhardt CA, Voigt S, Beilharz S, Anderegg U, Termeer CC, Sleeman JP, Simon JC.** Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol*, **2007**; 127(3): 687-697
113. **Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR.** Serum hyaluronan as a disease marker. *Annals of Medicine*, **1996**; 28: 241-253.
114. **Vercruyse KP, Ziebell MR, Prestwich GD.** Control of enzymatic degradation of hyaluronan by divalent cations. *Carbohydrate Research*, **1999**; 318: 26-37.
115. **Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW.** Signaling properties of hyaluronan receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **2002**; 277: 4589-4592.
116. **Toole BP.** Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews, Cancer*, **2004**; 4: 528-539.
117. **Spicer AP, Tien JYL.** Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Research C Embryo Today*, **2004**; 72: 89-108.
118. **Taylor KR, Gallo RL.** Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB Journal*, **2006**; 20: 9-22.
119. **Toole BP, Hascall VC.** Hyaluronan and tumor growth. *American Journal of Pathology*, **2002**; 161: 745-747.
120. **Paiva P, Damme MV, Tellbach M, Jones RL, Jobling T, Salamonsen LA.** Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, **2005**; 98: 193-202.
121. **Adamia S, Maxwell CA, Pilarski LM.** Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic target in cancer. Current Drug Targets. *Cardiovascular & Haematological Disorders*, **2005**; 5: 3-14.
122. **Heldin P.** Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2003; 36: 967-973.
123. **Itano N, Sawai T, Atsumi F, Miyaishi O, Taniguchi S, Kannagi R, Hamaguchi M, Kimata K.** Selective expression and functional characteristics of three mammalian hyaluronan synthases in oncogenic malignant transformation. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**; 279: 18679-18687.
124. **Roden L, Campbell P, Fraser JRE, Laurent TC, Pertoft H, Thompson JN.** Enzymatic pathways of hyaluronan catabolism. *Ciba Found Symp*, **1989**; 143: 60-86.

125. **Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, Nadji M, Lokeshwar BL.** Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, **2001**; 276(13): 11922-11932.
126. **Csoka AB, Scherer SW, Stern R.** Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics*. **1999**; 60:356-61.
127. **Csoka AB, Frost GI, Stern R.** The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol*, **2001**; 20:499-508.
128. **Fiszer- Szafarz B, Szafarz D, Vannier P.** Polymorphism of hyaluronidase in serum from men, various Mouse strains and other vertebrate species revealed by electrophoresis. *Biol Cell*, **1990**; 68: 95-100.
129. **Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E.** CD44 interaction with Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem*, **2004**; 279: 26991-7007.
130. **Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G.** Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res*, **1999**; 59: 6246-6250.
131. **Larsen NE, Balazs EA.** Drug delivery systems using hyaluronan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1991**; 7: 279-293.
132. **Vercruyse KP, Prestwich GD.** Hyaluronate derivatives in drug delivery. *Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **1998**; 15: 513-555.
133. **Moreland LW.** Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hyaluronidase for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Research and Therapy*, **2003**; 5:54-67.
134. **Liao YH.** Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Delivery*, **2005**; 12: 327-342.
135. **Dagenais S.** Intra-articular hyaluronic acid (viscosupplementation) for knee osteoarthritis. *Emerg Health Technol*, **2006**; 94: 1-4.
136. **Balazs EA, Denlinger JL.** Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *Journal of Rheumatology*, **1993**; 20: 3-9.
137. **Stern R.** Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*, **2003**; 13: 105-115.
138. **Altman RD.** Intra-articular sodium hyaluronate in osteoarthritis of the knee. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **2000**; 30: 11-18.
139. **Uthman I, Raynauld JP, Haraoui B.** Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgraduate Medical Journal*, **2003**; 79: 449-453.
140. **Hamburger MI, Lakhanpal S, Mooar PA, Oster D.** Intra-articular hyaluronans: a review of product-specific safety profiles. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **2003**; 32: 296-309.
141. **Kirwan J.** Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? *Knee*, **2001**; 8: 93-101.
142. **Ghosh P, Guidolin D.** Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **2002**; 32: 10-37.

143. **Ghosh P, Jassal M.** Use of polysaccharides fibres for modern wound dressings. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, **2002**; 27: 434-450.
144. **Miller JA, Ferguson RL, Powers DL, Burns JW, Shalaby SW.** Efficacy of hyaluronic acid/nonsteroidal anti-inflammatory drug systems in preventing postsurgical tendon adhesion. *Journal of Biomedical Material Research*. **1997**; 38: 25-33.
145. **Miyazaki T, Miyauchi S, Nakamura T, Takeshita S, Horie K.** The effect of sodium hyaluronate on the growth of rabbit cornea epithelial cells *in vitro*. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **1996**; 12: 409-415.
146. **Simon A, Satran A, Revel A, Aizenman E, Reubinoff B, Porat-Katz A, Lewin A, Laufer N.** Hyaluronic acid can successfully replace albumin as the sole macromolecule in a human embryo transfer medium. *Fertility and Sterility*, **2003**; 79: 1434-1438.
147. **Basterzi Y, Sari A, Demirkan F, Ünal Ş, Arslan E.** Intraarticular hyaluronic acid injection for the treatment of reducing and nonreducing disc displacement of the temporomandibular joint. *Ann Plast Surg*, **2009**; 62: 265–267.
148. **Lee JY, Spicer AP.** Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*, **2000**; 12: 581-586.
149. **Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB.** Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, **1997**; 242: 27S-33S.
150. **Berg.** Hyaluronan turnover in relation to infection and sepsis. *Journal of Internal Medicine*, **1997**; 242: 73-77.
151. **George J, Stern R.** Serum hyaluronan and hyaluronidase: very early markers of toxic liver injury. *Clinica Chimica Acta*, **2004**; 348: 189-197.
152. **Al'qteishat A, Gaffney J, Krupinski J, Rubio F, West D, Kumar S, Kumar P, Mitsios N, Slevin M.** Changes in hyaluronan production and metabolism following ischaemic stroke in man. *Brain*, **2006**; 30: 11-18.
153. **F. Duran-Reynals CR.** *Soc. Biol.* **1928**; 99: 6.
154. **W. H. Fishman and A. J. Anlyan.**  $\beta$ -Glucuronidase activity in human tissues. Some correlations with processes of malignant growth and with the physiology of reproduction. *Cancer Res*, **1947**; 7: 808-817.
155. **Meyer K.** Hyaluronidases. In : Boyer PD (Ed). *The Enzymes*. *Academic Press, New York*, **1971**; 307-320.
156. **Kreil G.** Hyaluronidases-a group of neglected enzymes. *Protein Science*, **1995**; 4: 1666-1669.
157. **Kemparaju K, Girish KS.** Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochemistry and Function*, **2006**; 24: 7-12.
158. **Dijke T, Miyazono PK, Heldin CH.** Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci*, **2000**; 25: 64-70.
159. **Letterio JJ, Roberts AB.** Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol*, **1998**; 16: 137-161.
160. **Roberts AB, Mccune BK, Sporn MB.** TGF-beta-regulation of extracellular-matrix. *Kidney Int.*, **1992**; 41: 557-559.
161. **Bertrand P, Girard N, Duval CC, D'Anjou J, Cahuzi C, Menard J F, Delpech B.** Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. *Int. J. Cancer*, **1997**; 73,327-331.

162. **Mio K, Stern R.** Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biology*, **2002**; 21: 31-37.
163. **Afify AM, Stern M, Guntenhoener M, Stern R.** Purification and characterization of human serum hyaluronidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1993**; 305: 434-441.
164. **Girish KS, Kemparaju K.** A low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochemistry (Moscow)*, **2005**; 70: 708-712.
165. **Girish KS, Kemparaju K.** Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochem (Moscow)*, **2005**; 70: 948-952.
166. **Tonnesen HH.** Studies on curcumin and curcuminoids. XIV. Effect of curcumin on hyaluronic acid degradation *in vitro*. *Int J Pharmacol*, **1989**; 50: 91-95.
167. **Kuppusamy UR, Das NP.** Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*, **1991**; 47: 1196-2000.
168. **Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes EC.** A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom isolation characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*, **2001**; 39: 1495-1504.
169. **Hertel W, Peschel G, Ozegowski JH, Muller PJ.** Inhibitory effects of triterpens and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid splitting enzymes. *Arch Pharm Chem. and Life Sciences*, **2006**; 339: 313-318.
170. **Szary SH, Kowalczyk-Bronisz, Geldanowski J.** Indomethacin as inhibitor of hyaluronidase. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warszawa)*, **1975**; 23: 131-134.
171. **Koda A, Nagai H, Watanabe S, Yanagihara Y, Sakamoto K.** Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N (3',4'-dimethoxycinnamoyl)anthranilic acid (N-5'). *J. Allergy Clin. Immunol*, **1976**; 57: 396-407.
172. **Dirscherl W, Bergmeyer HU, Kruskemper HL.** Effects of steroid hormones on catalase preparation of different degrees of purity. *Biochemische Zeitschrift*, **1952**; 322:269-279.
173. **Diczfalusy E, Femo OB, Fex HJ, Hogberg B, Kneip P, Leo AB, Halsingborg SS.** *Acta Chemica Scandinavica*, **1959**; 13: 1011-1018.
174. **Balazs EA, Euler JV.** The Hyaluronidase Content of Necrotic Tumor and Testis Tissue. *Cancer Res.*, **1952**; 12: 326-329.
175. **Jeong SJ, Higuchi R, Miyamoto T, Ono M, Kuwano M, Mawatari SF.** Bryoanthrathiophene, a new antiangiogenic constituent from the bryozoan *Watersipora subtorquata* (d'Orbigny, 1852). *J. Nat.Prod.*, **2002**; 65: 1344-1345.
176. **RXMediaPharma®** 2009 İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Sürüm 9.5.0.0, İzmir: GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik Sanayi ve Tic. A.Ş. **2009**.
177. **Algul O, Kaessler A, Apçin Y, Yılmaz A, Jose J.** Comparative studies on conventional and microwave synthesis of some benzimidazole, benzothiazole and indole derivatives and testing on inhibition of hyaluronidase. *Molecules*, **2008**; 13: 736-748.

## ÖZGEÇMİŞ

20 Temmuz 1984 tarihinde İskenderun'da doğmuştur. İlköğretimine İskenderun Mithatpaşa İlkokulu'nda (1990-1995), orta öğrenimi ve liseyi İstiklal Makzume Anadolu Lisesi'nde bitirmiştir (1995-2002). Lisans eğitimini ise Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde dönem birinciliğiyle (2003-2007) tamamlamıştır. 2007-2008 yılları arası Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalında Araştırma görevliliği yapmış, şu anda da Hatay İskenderun Devlet Hatanesi'nde eczacı olarak görev yapmaktadır.